

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

RONALDO LEAL CARNEIRO

**OTIMIZAÇÃO DE CULTIVO DE *Microcystis aeruginosa* KÜTZ EMEND.
ELEKIN E *Cylindrospermopsis raciborskii* (WOLOSZYNSKA)
SEENAYA & SUBBA RAJU (CIANOBACTERIA) PARA PRODUÇÃO DE
PADRÕES DE MICROCISTINA-LR E CILINDROSPERMOPSINA**

Dissertação de Mestrado

Rio de Janeiro - 2005

RONALDO LEAL CARNEIRO

Otimização de cultivo de *Microcystis aeruginosa* KÜTZ EMEND.
ELEKIN (CIANOBACTERIA) E *CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII*
(WOLOSZYNSKA) SEENAYA & SUBBA RAJU
(CIANOBACTERIA) para produção de padrões de microcistina-LR e
cilindropermopsina

Dissertação de mestrado apresentada
ao Curso de Pós graduação em
Biotecnologia Vegetal do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte
dos requisitos necessários para
obtenção do grau de mestre em
Ciências Biológicas, área de
concentração Biotecnologia Vegetal

Orientadores: Sandra Maria Feliciano Oliveira e Azevedo
Co orientador: Valéria Freitas de Magalhães

Rio de Janeiro
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Carneiro, Ronaldo Leal

Otimização de cultivo de *Microcystis aeruginosa* Kütz Emend. Elekin (Cianobacteria) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju (Cianobacteria) para produção de padrões de microcistina-LR e cilindrospermopsina/ Ronaldo Leal Carneiro. – 2005. 113 f + i-x.: 24 figuras, 25 tabelas.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Biotecnologia Vegetal, Rio de Janeiro, 2005.

Orientador: Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo
Co orientador: Valéria Freitas de Magalhães

1- Cianobactérias. 2- *Microcystis aeruginosa*. 3- *Cylindrospermopsis raciborskii*. 4- Intensidade luminosa 5- Padrões 6- Microcistina-LR 7- Cilindrospermopsina

I. Azevedo, Sandra M. F. O; Magalhães; V. F. II. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho; Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Doutor em Ciências; Doutor em Ciências.

RONALDO LEAL CARNEIRO

Otimização de cultivo de *Microcystis aeruginosa* Kütz Emend. Elekin (Cianobacteria) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju (Cianobacteria) para produção de padrões de microcistina-LR e cilindrospermopsina

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós graduação em Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia Vegetal

Aprovada em

(Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo – Doutor em Ecologia e Recursos Naturais-UFRJ) - Presidente

(Alexandre Soares Rosado - Doutor em Ciências/ Microbiologia - UFRJ)

(Renato José Reis Molica- Doutor em Ciências Biológicas/Biofísica - ITEP)

(Ricardo Machado Kuster - Doutor em Química de Produtos Naturais - UFRJ)

(Yocie Yoneshigue Valentin - Doutor em Ciências - UFRJ) – Revisora e Suplente

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado o dom de viver, pensar, ser feliz e sonhar com um futuro melhor.

A Ricardo Luis Marques de Oliveira meu amigo, companheiro e irmão, que sempre apostou em mim e me faz viver cada dia com muita felicidade.

A professora Fernanda Reinert que me proporcionou à busca por uma nova área de trabalho, quando eu tinha poucas perspectivas. Sem você este trabalho não poderia ser realizado por mim.

A professora Sandra Azevedo que mesmo sem me conhecer apostou em mim. Obrigado por todos os ensinamentos, orientação, amizade e incentivo em minha carreira.

A professora Valéria Magalhães pela paciência, amizade e carinho, agüentando todos os meus momentos de desespero e por me fazer crescer muito com seus ensinamentos durante as análises de HPLC.

Aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias pelas horas de descontração e ajuda: Alessandra, Isabel, Jobson, João, Raquel, Ricardo e Rodrigo.

As amigas Andréia, Alessandra Delazari e Simone pelo muitos incentivos.

A amiga Márcia Varrichio por me desvencilhar dos meus problemas me proporcionado horas de descontração.

Em especial a uma grande amiga que me acompanha desde a graduação. Bianca Ortiz obrigado simplesmente por ser minha amiga.

Aos professores que aceitaram compor a banca examinadora deste trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma me auxiliaram na realização deste trabalho.

RESUMO

Carneiro, Ronaldo Leal. Otimização de cultivo de *Microcystis aeruginosa* Kütz Emend. Elekin e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju (cianobacteria) para produção de padrões de microcistina-LR e cilindrospermopsina. Rio de Janeiro, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Biotecnologia Vegetal). Programa de Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

As cianotoxinas microcistina-LR e cilindrospermopsina são hepatotoxinas produzidas por cianobactérias e já foram relacionadas com casos de intoxicação animal e humana. O Ministério da Saúde do Brasil adota como limite máximo aceitável (VMA) de microcistinas em água para consumo humano o valor de 1 µg/L e recomenda a análise de cilindrospermopsina cuja VMA é de 15 µg/L para (Funasa, 2004), obrigando os responsáveis pelo abastecimento público monitorar a presença de cianotoxinas em mananciais de abastecimento. Este estudo procurou colaborar com o estabelecimento de condições otimizadas para a produção destas cianotoxinas purificadas, visando permitir a exequibilidade da produção nacional de padrões de microcistina-LR e cilindrospermopsina, para auxiliar no controle da qualidade da água. Foram estudadas as variações na síntese de microcistina-LR, por uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (NPJB-1) e na síntese de cilindrospermopsina, em uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYP 011K) em culturas submetidas a diferentes regimes de irradiância. Para acompanhar o estado fisiológico das cepas foram avaliados o crescimento celular, através da contagem de células e a concentração de clorofila a, com extração em metanol 100%, conteúdo intracelular de carboidratos e excreção de carboidratos (carboidratos extracelulares), pelo método fenol ácido sulfúrico. A produção destas toxinas nas diferentes condições de cultivo foi avaliada na fase exponencial e estacionária de crescimento, por técnicas específicas de HPLC, com a detecção para ambas toxinas sendo feitas em UV e com o auxílio de um fotodetector de arranjo de diiodo. As maiores taxas de crescimento e maior síntese de microcistina-LR, em 10⁶ células da cepa NPJB-1 (*M.aeruginosa*), foram encontradas nas culturas mantidas sob a intensidade luminosa de 100 µmoles fótons.m⁻².s⁻¹. A idade da cultura influenciou na concentração de microcistina-LR por células. O conteúdo foi maior na fase exponencial de crescimento e diminuiu na fase estacionária sendo observada uma relação direta entre a síntese de clorofila a e a produção de microcistina-LR por esta

cepa. De acordo com os dados obtidos, as condições mais propícias de cultivo da cepa NPJB-1 para produção de padrões de microcistina-LR são 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, com cinco dias de cultivo. As maiores taxas de crescimento da cepa CYP 011K (*C. raciborskii*), foram encontradas nas culturas mantidas sob a intensidade luminosa de 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Houve uma tend\^encia a diminui\~c\~ao do comprimento dos tricomas de *C. raciborskii* ao final da fase exponencial de crescimento, nas culturas submetidas \~a maiores intensidades luminosas (60 e 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$). A maior produ\~c\~ao de cilindrospermopsina em 10^6 c\^elulas de *C. raciborskii* ocorreu nas culturas submetidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, tanto no meio da fase exponencial de crescimento, quanto ao final dos cultivos. As condi\~c\~oes mais prop\^icias de cultivo da cepa CYP 011K de *C. raciborskii* para produ\~c\~ao de padr\~oes de cilindrospermopsina s\~ao 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, com doze dias de cultivo.

ABSTRACT

Carneiro, Ronaldo Leal. Optimization of cultivation of *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) for production of microcystin-LR and cylindrospermopsin standards. Rio de Janeiro, 2005. Dissertation (Master's degree in Ciências Biológicas/Biotecnologia Vegetal). Program of Vegetable Biotechnology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

Hepatotoxinas microcystin-LR and cylindrospermopsin produced by cyanobacteria have already been associated with cases of animal and human intoxication. The Brazilian Ministry of Health adopts as the acceptable maximum level 1 $\mu\text{g/L}$ of microcystins in water for human consumption and recommend 15 $\mu\text{g/L}$ of cylindrospermopsin (Funasa, 2004). Additionally, drinking water for public provisioning must be monitored for the presence of cyanotoxins. This study aimed to collaborate with the establishment of optimized conditions for production of these two cyanotoxins to allow the possibility of the national production of microcystin-LR and cylindrospermopsin standards, which is crucial for water quality control process. We studied the variation on microcystin-LR synthesis, by a strain of *Microcystis aeruginosa* (NPJB-1) and in the cylindrospermopsin synthesis, by a strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYP 011K) in batch cultures submitted to different irradiance levels. Growth rate and physiological conditions of each strain were determined by daily cell counting, chlorophyll *a* concentration (extraction with methanol 100%), intracellular and extracellular carbohydrates concentration (using the phenol sulfuric acid method). The production of these two toxins was quantified in the exponential and stationary growth phases by specific HPLC techniques using UV detection and photodiodearray detector. The best conditions for growth and microcystin-LR production in 10^6 cells of strain NPJB-1 (*M.aeruginosa*) were found in the cultures maintained under 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The age of culture influenced in the cellular microcystin-LR concentration. The content was higher in the exponential phase and it decreased in the stationary phase. There was a direct relationship between chlorophyll *a* synthesis and microcystin-LR production by this strain. According to these results, the most favorable culture conditions for production of microcystin-LR standards by NPJB-1 strain are 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for five days of cultivation. The highest growth rate of CYP 011K (*C. raciborskii*) strain was found in the cultures maintained under of 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A

decrease of the length of *C. raciborskii* filaments was observed at the end of exponential growth phase for the cultures submitted to the highest light treatments (60 and 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). The highest cylindrospermopsin production in 10^6 cells of *C. Raciborskii* was observed in the cultures submitted to 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ in the middle of exponential growth phase as well as in the end of culture period. According to these results, the most favorable culture conditions for production of cylindrospermopsin standards are 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for twelve days of cultivation.

SUMÁRIO

	Página
Agradecimentos	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
1 - Introdução	01
1.1 - Considerações iniciais	01
1.2 - Eutrofização e florações de cianobactérias	02
1.3 - Toxinas de cianobactérias (cianotoxinas)	03
1.4 - Estudos sobre florações tóxicas	04
1.5 - Algumas evidências de intoxicações humanas por cianobactérias	07
1.6 - Microcistinas e cilindrospermopsinas.....	08
1.7 - Limites aceitáveis de cianotoxinas em água para consumo.....	12
2 - Objetivos	15
3 - Material e Métodos	16
3.1 - Manutenção das cepas	16
3.2 - Condições de cultivo	17
3.3 - Parâmetros fisiológicos analisados	20
3.3.1 - Crescimento celular	20
3.3.2 - Biomassa (peso seco)	21
3.3.3 - Análise de clorofila <i>a</i>	22
3.3.4 - Análise de carboidratos	23
3.3.5 - Análise das cianotoxinas	25
3.3.5.1 - Cepa NPJB-1 (<i>Microcystis aeruginosa</i>).....	25
3.3.5.2 - Cepa CYP 011K (<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>)	27
3.4 – Purificação de microcistina-LR e cilindrospermopsina.....	31
3.4.1 - Purificação de microcistina-LR.....	31
3.4.2 - Purificação de cilindrospermopsina.....	32
3.5 - Análise estatística dos dados	34

4 - Resultados e Discussão.....	35
4.1 - Crescimento celular	35
4.2 - Produção de clorofila <u>a</u>	50
4.3 - Produção de carboidratos.....	57
4.4 - Produção de microcistina-LR pela cepa NPJB-1 (<i>Microcystis aeruginosa</i>)... 68	
4.5 - Produção de cilindrospermopsina pela cepa CYP 011K (<i>Cilindrospermopsis raciborskii</i>)	80
4.6 - Melhor condição de cultivo da cepa NPJB-1 (<i>Microcystis aeruginosa</i>) para produção de microcistina-LR purificada	90
4.7 - Melhor condição de cultivo da cepa CYP 011K (<i>Cilindrospermopsis raciborskii</i>) para produção de cilindrospermopsis purificada	95
4.8 – Considerações Finais	100
5 - Conclusões	102
Referências Bibliográficas	104

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Cianobactérias são microrganismos procarióticos, aeróbios e fotossintetizantes, planctônicos ou bentônicos que podem ser encontrados em condições extremas como: fontes termais (temperaturas superiores a 70°C), desertos, ambientes de altas salinidades e de pH ácidos (em torno de 4), além de serem encontradas em associações com fungos (líquens) ou vegetais superiores (Azevedo, 2002). Para manter seu metabolismo necessitam somente de luz, água, dióxido de carbono e substâncias inorgânicas. O processo fotossintético é similar ao encontrado nas algas e nos vegetais superiores, tendo a clorofila *a* como principal pigmento de captação de luz.

Em termos morfológicos existem espécies unicelulares, coloniais, filamentosas e formadas por tricomas (uma cadeia de células que podem estar ou não envoltas por uma matriz (bainha) de polissacarídeos). Os grupos coloniais estão imersos em uma bainha que confere um contorno irregular ou esférico às colônias.

Em função da liberação de oxigênio molecular para a biosfera, as cianobactérias tiveram papel fundamental na formação da mesma (Bold & Wynne, 1985; Tandeau de Marsac & Houmard, 1993). Alguns grupos são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico tornando-se independentes de fontes orgânicas externas de nitrogênio. A fixação é feita em células vegetativas modificadas, os heterocitos, com paredes espessadas que criam um ambiente livre de oxigênio necessário à ação da nitrogenase (responsável pelo processo de fixação do nitrogênio). A amônia gerada nessas estruturas é transferida às células adjacentes em forma de glutamina.

A característica mais marcante desses microrganismos é o fato de serem capazes de crescer nos mais diferentes ambientes, tendo sido identificados em praticamente todos os ecossistemas aquáticos (Gibson & Smith, 1982; Tandeau de Marsac & Houmard, 1993). Porém, apresentam um melhor crescimento em águas doces, neutro-alcalinas, com temperatura entre 15° e 30° C e alta concentração de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo). Em termos de adaptação a diferentes intensidades luminosas, conseguem se desenvolver desde ambientes com baixas irradiâncias até ambientes onde ocorrem elevados níveis de radiação solar (Van Liere & Mur, 1979; Tilzer, 1987; Paerl *et al.*, 1983 e 1985).

1.2 – EUTROFIZAÇÃO E FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS

A eutrofização é o processo de enriquecimento por nutrientes nos ambientes aquáticos. Esse processo vem sendo favorecido pela crescente utilização destes ambientes para descarga de esgotos domésticos e industriais, além da poluição difusa gerada pela agricultura, causando uma eutrofização artificial. Este enriquecimento com nutrientes pode ocasionar um aumento na ocorrência de florações de cianobactérias em superfícies de rios, lagos e reservatórios artificiais. O termo floração é utilizado para designar o crescimento intenso de microalgas e cianobactérias na superfície e sub-superfície dos corpos d'água. As florações de cianobactérias chegam a formar uma densa camada de células, muitas vezes com vários centímetros de profundidade (Azevedo, 2002).

Em termos de qualidade de água, a eutrofização pode causar redução de oxigênio dissolvido, morte extensiva de peixes, perda de qualidade cênica (características estéticas do ambiente e seu potencial para o lazer) e aumento da

incidência de florações de microalgas e cianobactérias. Como resultado geram conseqüências negativas sobre a eficiência e custo do tratamento da água de mananciais de abastecimento público (Azevedo, 2002).

As florações acarretam, ainda, graves conseqüências à saúde pública, uma vez que várias cianobactérias produzem metabólitos secundários com ações tóxicas (cianotoxinas) sobre diferentes tipos celulares (Gleason & Wood, 1987; Cohen, 1986; Carmichael, 1988). Por sua ação farmacológica, as cianotoxinas são caracterizadas em hepatotoxinas e neurotoxinas.

No Brasil, a ocorrência de florações é favorecida pelo precário sistema de tratamento e fiscalização dos efluentes de esgotos domésticos e industriais, aliados, geralmente, às características edafo-climáticas (níveis altos de radiação solar e ventos fracos) e águas com temperatura amena e pH propício (6-9) ao crescimento intenso de cianobactérias durante todo o ano.

1.3 – TOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS (CIANOTOXINAS)

Várias espécies de cianobactérias formadoras de florações produzem toxinas. Essas cianotoxinas constituem uma grande fonte de produtos naturais que, embora ainda não sejam claros os motivos de sua produção, têm sido relacionadas como sendo compostos que servem para proteção contra a herbívoros desses microrganismos (Carmichael, 1992).

Algumas dessas toxinas apresentam uma ação rápida, causando a morte de mamíferos e aves por parada respiratória após alguns minutos de exposição e são classificadas como alcalóides ou organofosforados neurotóxicos. Outras agem mais lentamente e são identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos. Alguns

gêneros também podem produzir toxinas irritantes ao contato. Essas têm sido identificadas como lipopolissacarídeos (LPS), que também são comumente encontradas em membranas de bactérias Gram negativas, sendo endotoxinas pirogênicas com toxicidade menor que as produzidas por bactérias, como por exemplo, *Salmonella* (Chorus & Bartram, 1999).

1.4 – ESTUDOS SOBRE FLORAÇÕES TOXICAS

A ocorrência de florações tóxicas está bem relatada em todo o mundo. Cerca de 50% das florações testadas em diferentes países mostraram-se tóxicas em bioensaios (Carmichael & Gorham, 1981; Repavich *et al.*, 1990; Sivonen, *et al.* 1990; Lawton & Codd, 1991; Watanabe *et al.*, 1991; Costa & Azevedo, 1994). O maior número de relatos desses casos estão em países do hemisfério norte, onde há maior interesse de investimento nesta linha de pesquisa, e preocupação com o potencial de intoxicação das cianobactérias (Azevedo, 2002).

Segundo Sant'Anna & Azevedo (2000) já foi registrada a ocorrência de pelo menos 20 espécies de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas, distribuídas em 14 gêneros, em diferentes ambientes aquáticos de diferentes regiões brasileiras. Esses autores indicam *Microcystis aeruginosa* (Fig. 1.1) como a espécie com maior distribuição no Brasil e *Anabaena* como gênero com maior número de espécies potencialmente tóxicas (*A. circinalis*, *A. flos-aquae*, *A. planctonica*, *A. solitaria* e *A. spiroides*). Porém, na última década, vem sendo observado um grande aumento na ocorrência da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (Fig. 1.2) em diferentes regiões brasileiras (Bouvy *et al.*, 1999; Branco & Senna, 1994; Huszar *et al.*, 2000; Jardim *et al.*, 1999; Kómarkóva *et al.*, 1999). No Brasil, das cepas de *C.*

raciborskii isoladas até o momento, nenhuma apresentou a produção de cilindrospermospina, apesar de já ter sido identificada a presença desta toxina no carvão ativado das clínicas de diálise, como no caso da tragédia de Caruaru (Carmichael *et al.*, 2001). Por outro lado, 75% das cepas de outros gêneros de cianobactérias isoladas de diferentes corpos d'água do Brasil, mostraram-se hepatotóxicas após a realização de bioensaios com camundongos (Costa & Azevedo, 1994).

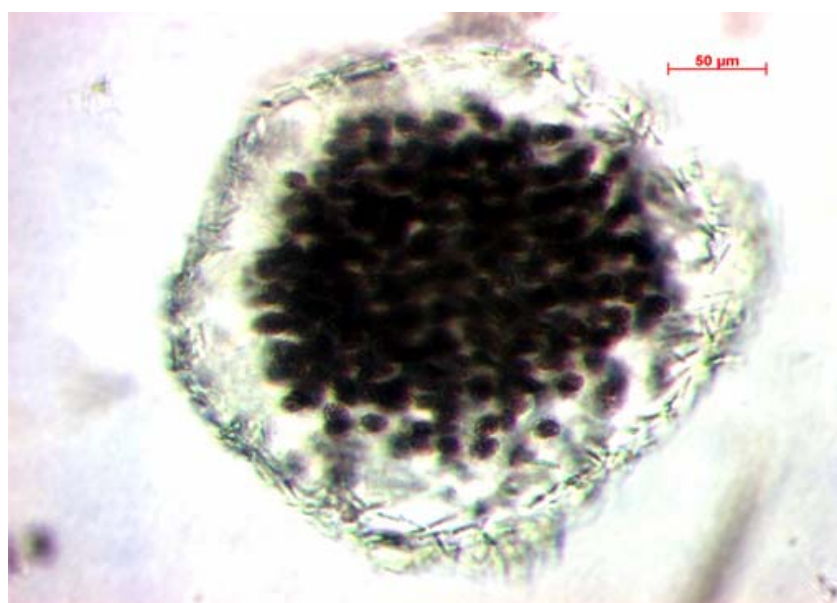


Figura 1.1 – *Microcystis aeruginosa*.

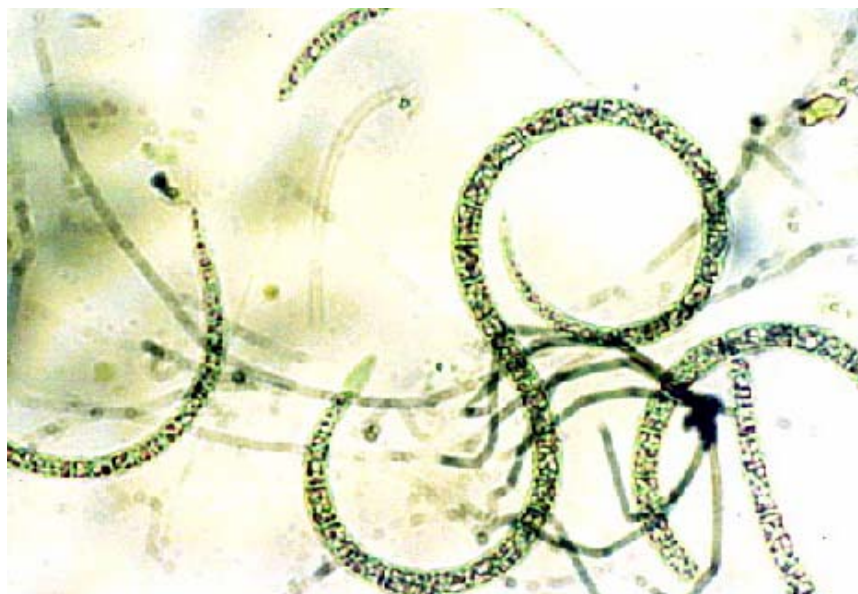


Figura 1.2 – *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Azevedo (2002) cita que estudos realizados no IBBCF^o - UFRJ têm confirmado a ocorrência de cepas tóxicas de cianobactérias em corpos d'água (reservatórios de abastecimento público, lagos artificiais, lagoas salobras e rios) dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pará, Paraná, Bahia, Pernambuco e no Distrito Federal, com aproximadamente 82% destas cepas apresentando toxicidade em bioensaios. O aumento do conhecimento toxicológico e fisiológico, na última década, está possibilitando a otimização da pesquisa destes organismos, de modo a fornecer bases científicas para o estudo de cianotoxinas e para a produção de padrões comerciais nacionais de microcistina-LR e cilindrospermopsina com fins de controle da qualidade da água, em mananciais brasileiros de abastecimento público.

1.5 – ALGUMAS EVIDÊNCIAS DE INTOXICAÇÕES HUMANAS POR CIANOBACTÉRIAS

As intoxicações de populações humanas pelo consumo oral de água contaminada por cianobactérias tóxicas já foram descritas em países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul (Azevedo, 2002). Na Austrália, Hawkins *et al.* (1985) relacionaram a hepatotoxina cilindrospermopsina a casos de intoxicação humana em uma ilha australiana.

No Brasil, em 1988 cerca de duas mil pessoas foram hospitalizadas em consequência de um quadro de gastroenterite, no estado da Bahia. Esta grave epidemia resultou na morte de oitenta pessoas. Estudos de Teixeira *et al.* (1993) relacionaram esta ocorrência com o consumo de água contaminada por cianobactérias produtoras de toxinas. A água captada para região de ocorrência (Paulo Afonso-BA) provinha da barragem de Itaparica, onde ocorreu, na época, uma grande floração dos gêneros *Microcystis* e *Anabaena*.

Em 1996, cento e vinte e três doentes renais, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise em uma clínica de Caruaru, no estado de Pernambuco, apresentaram um quadro clínico compatível com uma grave hepatotoxicose. Sessenta destes pacientes faleceram em decorrência do agravamento da intoxicação. Os estudos confirmaram a presença de microcistinas e cilindrospermopsina, no carvão ativado utilizado no sistema de purificação de água da clínica e de microcistinas em amostras de sangue e fígado dos pacientes intoxicados, confirmando como causa da morte a exposição a microcistinas durante o tratamento renal. (Jochimsen *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001 e Azevedo *et al.*, 2002).

1.6 – MICROCISTINAS E CILINDROSPERMOPSINA

Microcistinas e cilindropermopsina são toxinas produzidas por cianobactérias com ação hepatotóxica. Determinar de maneira segura a presença destas toxinas em águas para consumo é de suma importância devido à sua grande toxicidade e ao seu potencial de contaminação de águas de abastecimento público.

As Microcistinas (Fig. 1.3) são heptapeptídeos cíclicos com estrutura geral com sete aminoácidos ligados; D-Alanina¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glutamato⁶-Mdha⁷, onde X e Z são L-aminoácidos variáveis, D-MeAsp é D-eritro ácido metilaspártico e Mdha é N-metildeidroalanina; Adda é o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico, determinado como responsável por sua atividade biológica (Chorus & Bartram, 1999).

Essas hepatotoxinas já foram identificadas em espécies dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc*, *Anabaenopsis* e do gênero terrestre *Hapalosiphon* (Chorus & Bartram, 1999). A nomenclatura das microcistinas foi proposta por Carmichael *et al.* (1988), observando apenas variações qualitativas em seus dois L-aminoácidos. Por exemplo, microcistina-LR (leucina-arginina); microcistina-RR (arginina-arginina); microcistina-YA (tirosina-alanina). Já se tem conhecimento de mais de 60 variantes de microcistinas devido a variações qualitativas também no grau de metilação dos aminoácidos e variações isoméricas no aminoácido Adda (Chorus & Bartram, 1999).

A toxicidade das microcistinas em animais (ratos) de laboratório apresenta a DL₅₀¹ por injeção intraperitoneal (i.p.) entre 50 e 1.200 µg/Kg de peso corpóreo e entre 5.000 e 10.900 µg/Kg de peso corpóreo por administração oral (Chorus & Bartram, 1999). As microcistinas agem sobre os hepatócitos, onde chegam por meio

de receptores dos ácidos biliares (Runnegar *et al.*, 1981; Eriksson *et al.* 1990; Falconer, 1991). Nestes promovem a desorganização do citoesqueleto (Runnegar & Falconer, 1996). O resultado é a desorganização do tecido hepático que desenvolve lesões graves, pois sem contato entre os hepatócitos, os espaços gerados são preenchidos por sangue, provocando uma hemorragia intra-hepática (Hooser *et al.*, 1991; Carmichael, 1994; Lambert *et al.*, 1994).

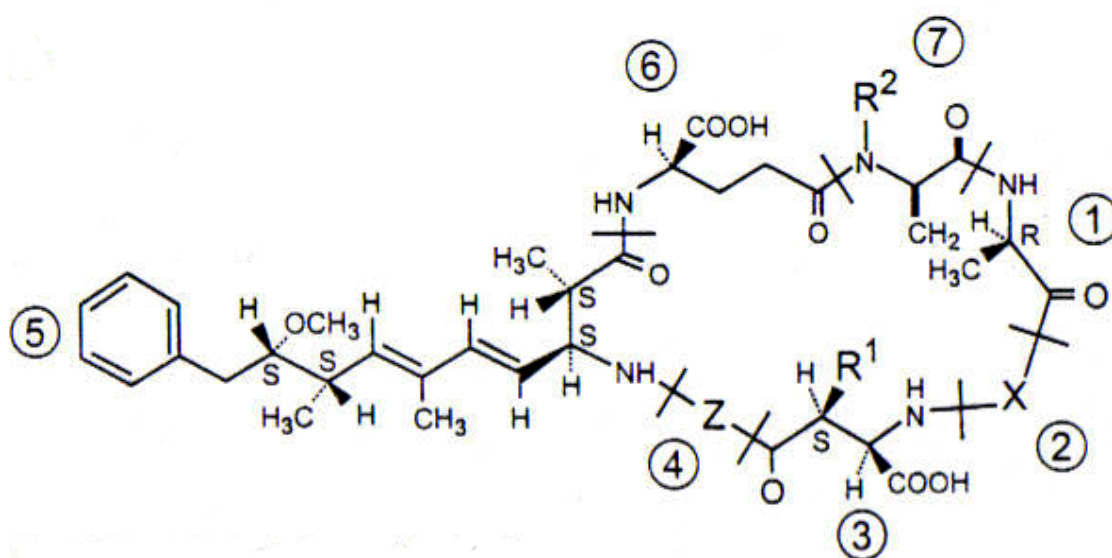


Figura 1.3 – Estrutura química geral das microcistinas, onde Z e X representam os dois L-aminoácidos variáveis e R¹ e R² são os locais de possíveis metilações. Fonte: Chorus & Bartram (1999).

¹DL₅₀ – representa a dose letal média, sendo o valor estimado que causa a morte de 50% da população que foi exposta à toxina.

Cilindrospermopsina (Fig. 1.4) é um alcalóide guanidínico cíclico que já foi identificado em espécies dos gêneros *Cylindrospermopsis* (Hawkins *et al.*, 1985), *Aphanizomenon* (Banker *et al.*, 1997 e Shaw *et al.*, 1999), *Umezakia* (Harada *et al.*, 1994) e *Rhaphidiopsis* (Li *et al.*, 2001). Ainda, já foi identificada a ocorrência de dois análogos da cilindrospermopsina, denominados deoxy-cilindrospermopsina com um décimo de toxicidade (Norris *et al.*, 1999) e 7-epicilindrospermopsina com toxicidade similar a da cilindrospermopsina (Banker *et al.*, 2000).

A DL₅₀ (i.p.) até 24 horas de administração é 52000 µg de peso seco de células por quilograma de peso corpóreo, o que equivale a 300 µg de toxina/Kg peso corpóreo (Chorus & Bartram, 1999). Com 7 dias após a administração esse valor decaí para 32000 µg de peso seco de células por quilograma de peso corpóreo, equivalente a 180 µg de toxina/Kg peso corpóreo (Chorus & Bartram, 1999).

A administração da toxina purificada em ratos mostrou também uma diminuição na toxicidade após administração. Com 24 horas a DL₅₀ (i.p.) é de 2100 µg/ Kg peso corpóreo e com 5 a 6 dias passa a ser 200 µg /Kg peso corpóreo (Chorus & Bartram, 1999). Por administração via oral, a DL₅₀ após 5 dias é de aproximadamente 4400 a 6900 µg/Kg de peso corpóreo (Seawright *et al.*, 1999).

A cilindrospermopsina atua como inibidor da síntese de proteínas (Terao *et al.*, 1994). Seawright *et al.* (1999) trabalhando com ratos, demonstraram que ocorre aumento do tamanho do fígado, muitas vezes com necrose periácinar (uma necrose aguda nos túbulos renais), atrofia no córtex do timo e no folículo linfóide do baço, hemorragias epicardial e miocardial, e múltiplas ulcerações em partes do esôfago e da mucosa gástrica, com a morte dos animais em torno de 2 a 6 dias após administração da toxina.

Ocorre ainda dano severo em células renais, como redução do número de eritrócitos nos glomérulos, com conseqüente aumento de espaços interglomerulares, aumento no diâmetro dos túbulos renais, necrose epitelial no túbulo proximal e a presença de material proteináceo no túbulo distal, com ação máxima observada em torno de 2-3 dias após administração da toxina nos animais testados (ratos) (Chorus & Bartram, 1999).

Shen *et al.* (2002) demonstraram a ação genotóxica da cilindrospermopsina. Nos animais testados, a administração desta toxina induziu a ruptura das fitas de DNA.

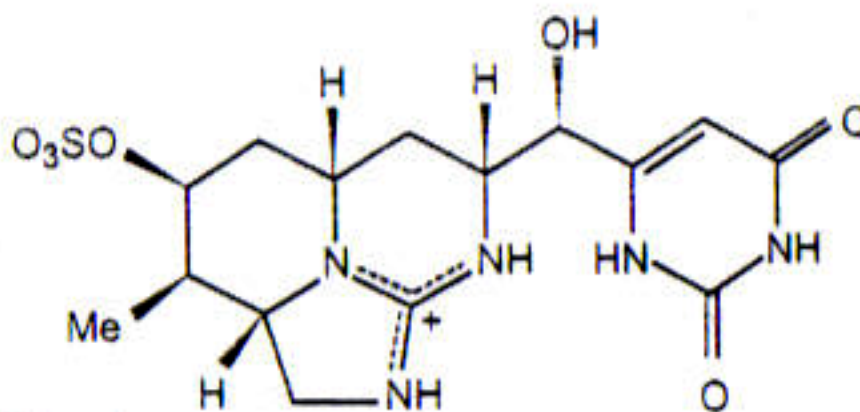


Figura 1.4 – Estrutura química da cilindrospermopsina. Fonte: Chorus & Bartram (1999).

1.7 – LIMITES MÁXIMOS ACEITÁVEIS DE CIANOTOXINAS EM ÁGUA PARA CONSUMO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou como limite máximo aceitável² de microcistina em água para consumo humano, o valor de 1 µg/L, incorporado no adendo das Normas para Qualidade da Água tratada (“Guideline for Drinking Water Quality”, WHO – 1998). Esse valor foi calculado com base em estudos com camundongos (Fawell *et al.*, 1994) e com porcos (Falconer *et al.*, 1994) que estabeleceram como ingestão diária aceitável (“Tolerable daily intake” – TDI) para microcistina-LR, o valor de 0,04 µg/Kg de peso corpóreo (Chorus & Bartram, 1999).

Segundo Chorus e Bartram (1999) não existem dados suficientes que estabeleçam um limite aceitável para cilindrospermopsina e saxitoxinas³ em água para consumo humano. Estudos toxicológicos sugerem o limite de 15 µg/L de cilindrospermopsina (Shaw *et al.*, 2000) e o limite de 3 µg/L para saxitoxinas na água potável (Fitzgerald *et al.*, 1999).

²Limite máximo aceitável (ou valor máximo aceitável, VMA) = $TDI \times pc \times P / V$

Onde: TDI = 0,04 µg/Kg de peso corpóreo; pc = 60 Kg – média de peso corpóreo de um indivíduo adulto; P = 0,8 – proporção da ingestão diária total de água proveniente da água tratada; V = 2 – volume de água, em litros, ingerido por dia. Isso resultou num valor de 0,96 µg/L, que foi aproximado para 1 µg/L.

³Saxitoxinas são neurotoxinas produzidas por cianobactérias.

De acordo com o artigo 14 da Portaria n.º 518/2004 (Funasa, 2004) do Ministério da Saúde do Brasil, o valor máximo permitido (VMP) de microcistinas em águas para consumo oral é de 1µg/L. No parágrafo primeiro deste artigo recomenda-se que as análises para cianotoxinas incluam a determinação de cilindrospermopsina e saxitoxinas, com valores limites de 15 µg/L e 3 µg/L de equivalentes de saxitonas, respectivamente. No primeiro parágrafo do artigo 19, ficam os responsáveis pelo abastecimento de água, obrigados a monitorar as cianobactérias na água de mananciais de abastecimento. A amostragem deve ser mensal no ponto de captação toda vez que o número de cianobactérias não exceder a 10.000 células/mL (ou 1mm³/L de biovolume) e semanal quando exceder este valor.

No Brasil, ainda não existe a produção comercial de padrões de cianotoxinas para serem utilizados em análises de quantificação e identificação dessas toxinas no controle e vigilância da qualidade da água.

De acordo com o catálogo Sigma (1998) 500 µg de padrão de microcistina-LR tinha o valor de US\$ 179.10 (preço FOB) e pelo catalogo Spectrum (2002) esse valor era US\$ 203.10. Atualmente os padrões de cilindrospermopsina estão sendo comercializados pelo Australian Water Quality Center (comunicação pessoal do doutor Andrew Humpage) pelo valor US\$ 1,000.00, 500 µg.

Tendo em vista os fatos apresentados, a relevância deste estudo se dá pela possibilidade do aumento do conhecimento sobre a produção de duas cianotoxinas (microcistina-LR e cilindrospermopsina), buscando-se estabelecer um protocolo de cultivo das espécies *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* para otimização da biosíntese de microcistina-LR e de cilindrospermopsina.

Este estudo procurou, portanto, colaborar com o estabelecimento de condições otimizadas para a produção destas cianotoxinas, visando permitir a

exeqüibilidade da produção nacional de padrões de microcistina-LR e cilindrospermopsina, uma vez que a dificuldade de obtenção desses padrões é um dos principais fatores limitantes para o monitoramento e controle da presença dessas cianotoxinas nos reservatórios de abastecimento público brasileiros.

2 – OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo principal otimizar as condições de cultivo de *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* para produção de microcistina-LR e de cilindrospermopsina, respectivamente, visando colaborar com o estabelecimento de protocolos para produção de padrões dessas cianotoxinas.

Objetivos específicos:

- 1 – Analisar a influência de diferentes regimes de irradiância no cultivo de uma cepa de *M. aeruginosa*, produtora de microcistina-LR, e de uma cepa de *C. raciborskii* produtora de cilindrospermopsina, bem como na produção de cada uma dessas cianotoxinas
- 2 – Verificar a influência da fase de crescimento celular na produção de microcistina-LR e cilindrospermopsina.
- 3 – Estudar a relação entre a variação da concentração de clorofila a e da concentração de carboidratos totais com a variação da concentração de microcistina-LR ou cilindrospermopsina.
- 4 – Estabelecer um protocolo para extração, purificação e quantificação de microcistina-LR e cilindrospermopsina, buscando estabelecer condições para a produção nacional de padrões destas cianotoxinas.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, foram utilizadas as cepas NPJB-1 de *Microcystis aeruginosa* (isolada da Lagoa das Garças do Jardim Botânico de São Paulo) e CYP 011K de *Cylindrospermopsis raciborskii* (gentilmente cedida pelo Dr. Andrew Humpage do “Australian Water Quality Center” – Austrália), mantidas no banco de culturas de cianobactérias do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) – IBCCF – UFRJ. Testes preliminares caracterizaram essas cepas como produtoras de microcistina-LR (NPJB-1, Azevedo *et al.*, 1994) e cilindrospermopsina (CYP 011K, comunicação pessoal, Andrew Humpage).

3.1 – MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Utilizou-se o meio de cultivo ASM-1, descrito por Gorham *et al.* (1964), para manutenção e para os experimentos com as cepas. As cepas estão sendo mantidas em tubos de ensaio, em meio ASM-1 esterilizado, pH inicial 8,0, sem aeração, temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, sob baixa irradiância ($20 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou $20 \mu\text{E}$), medida a partir de sensor qu\u00e2ntico (QSL-100, Box – Biospherical Instruments Inc.). A utiliza\u00e7\u00e3o de baixas irradi\u00e2ncias diminui a velocidade de divis\u00e3o celular, tornando mais f\u00e1cil a manuten\u00e7\u00e3o das culturas. As mesmas condi\u00e7\u00f5es de esteriliza\u00e7\u00e3o, pH do meio ASM-1 e temperatura foram utilizados em todas os experimentos.

3.2 – CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cepa NPJB-1 (*M. aeruginosa*) foi inoculada em frascos erlenmeyer de 500mL, contendo 300mL de meio ASM-1. Este procedimento foi realizado em triplicata e as culturas foram mantidas sem aeração, nas irradiâncias de 40, 100 e 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, durante cinco dias para uma adaptação prévia a estas intensidades luminosas. Para escolha das irrâdiancias, culturas da cepa NPJB-1 foram submetidas a diferentes intensidades luminosas, sendo a de 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ a que apresentou uma melhor tolerância pelas culturas, se comparada a irrâdiancias maiores. A iluminação das culturas foi obtida com lâmpadas fluorescentes comuns. As irrâdiancias foram medidas com um sensor quântico (QSL-100, Box – Biospherical Intruments Inc.) imerso até o fundo de um erlenmeyer contendo água destilada, com o mesmo volume das culturas.

Os cultivos experimentais foram iniciados inoculando-se 100mL das culturas pré-adaptadas em balões de fundo chato de 3L, contendo dois litros de meio (ASM-1). Este procedimento foi realizado em triplicatas para cada condição luminosa testada (40, 100 e 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$) e as culturas foram mantidas com aeração (obtida com auxílio de bombas de ar comprimido) e fotoperíodo de 12 horas (Fig. 3.1).

Estes mesmos procedimentos foram adotados para o cultivo da cepa CYP 011K (*C. raciborskii*). Porém, foram testadas as irrâdiancias de 40, 60 e 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ e o cultivo foi iniciado com 200 mL de culturas pré-adaptadas a estas condições luminosas (culturas da cepa CYP 011K, frascos erlenmeyer de 1000mL, contendo 600mL de meio ASM-1 - Fig. 3.2). Testes preliminares indicaram uma

baixa tolerância desta cepa à intensidades luminosas mais altas e uma menor velocidade de crescimento.

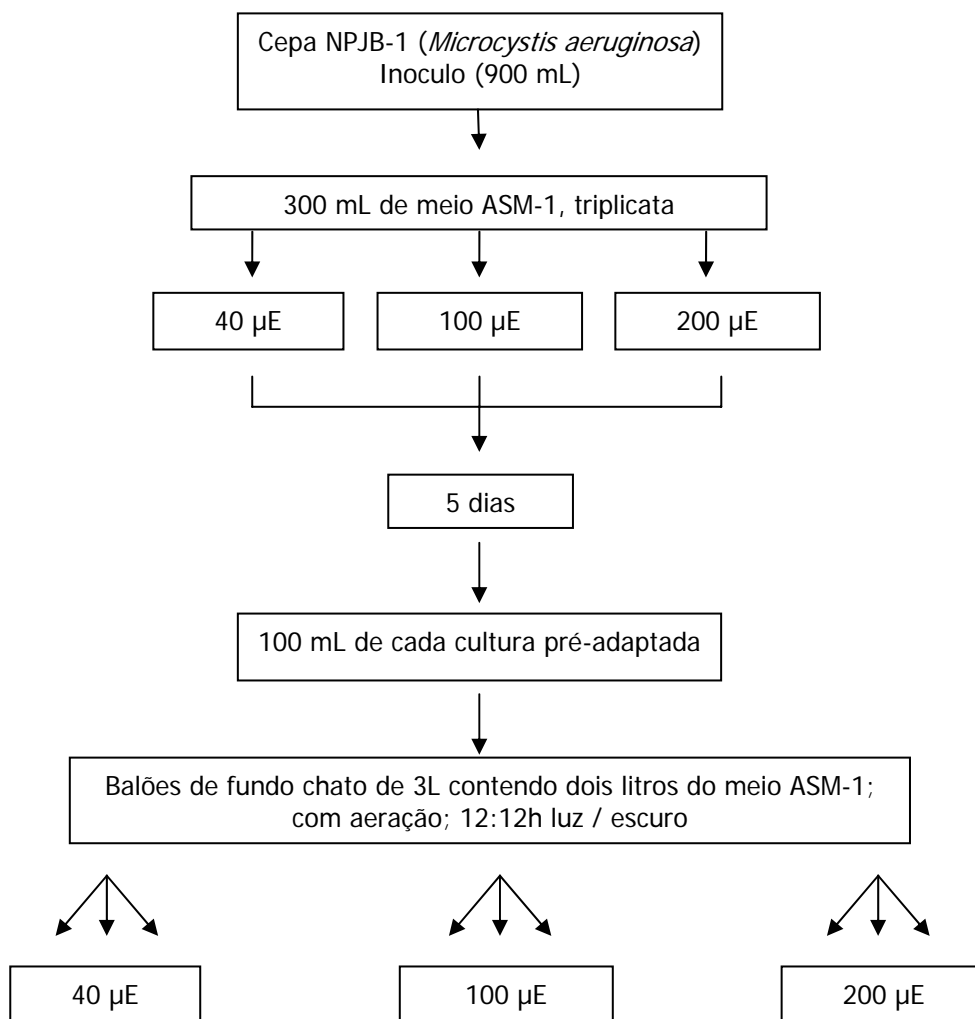


Figura 3.1 – Organograma representativo da metodologia adotada para cultivo da cepa NPJB-1 de *M. aeruginosa*.

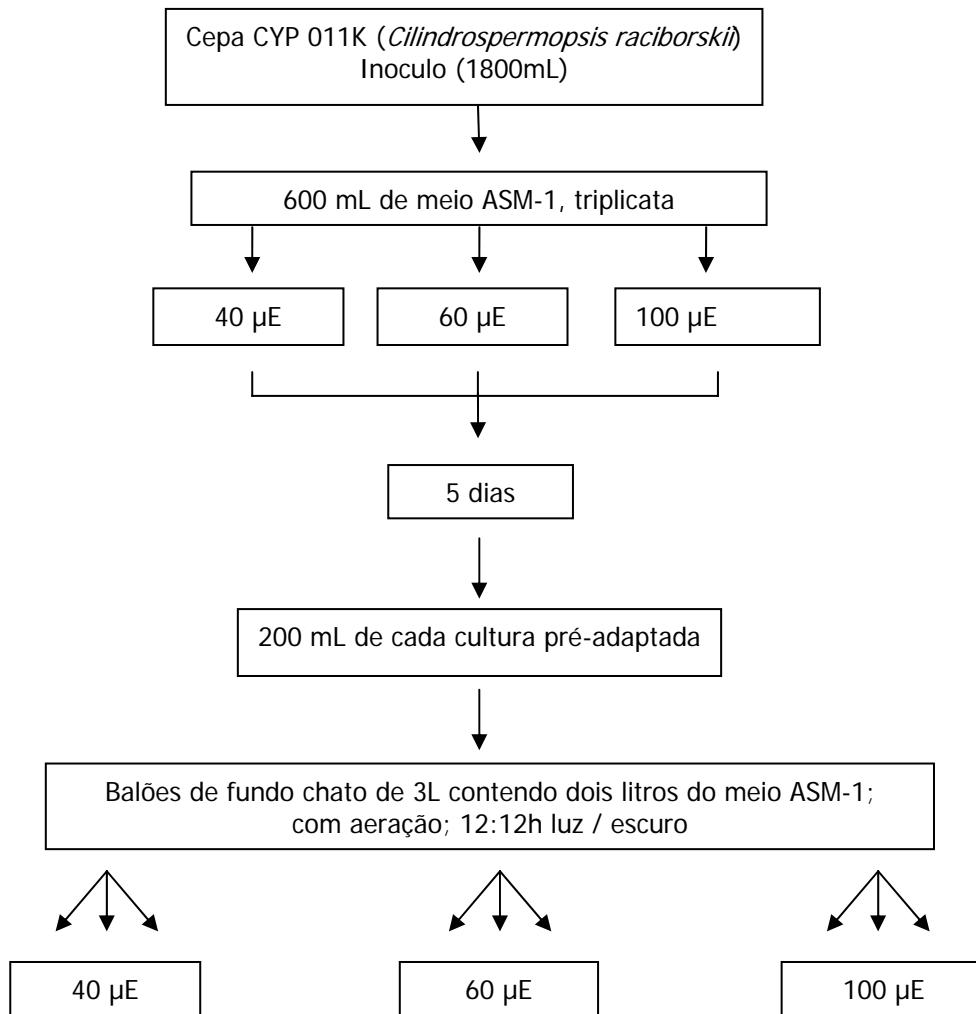


Figura 3.2 – Organograma representativo da metodologia adotada para cultivo da cepa CYP 011K de *C. raciborskii*.

3.3 – PARÂMETROS FISIOLÓGICOS ANALISADOS

3.3.1 – CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento celular da cepa NPJB-1 (*M. aeruginosa*) foi acompanhado através da contagem diária de células com o auxílio de microscópio óptico, em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, estimando-se o número de células/mL. Para cepa CYP 011K foram tomadas cerca de 90 medidas aleatórias do comprimento das células. A partir destes dados, foi estabelecido o comprimento médio das células. Diariamente, procederam-se as medidas dos comprimentos dos tricomas em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal e calculou-se o número de células, em cada condição.

A partir destes dados, estabeleceu-se cada curva de crescimento e determinou-se, também, (i) o rendimento máximo (de cada cultivo), que corresponde ao número máximo de células/mL atingido durante o crescimento (número de células final, subtraído do número de células inicial); (ii) a taxa de crescimento (μ); (iii) o tempo médio de duplicação das células (G); (iv) o número de divisões por dia (K_2), calculados pelas fórmulas descritas por Fogg & Thake (1987).

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1), \text{ onde:}$$

μ = taxa de crescimento,

N_1 = número de células/mL no tempo t_1 ,

N_2 = número de células/mL no tempo t_2 .

A partir da velocidade taxa de crescimento calcula-se o tempo de duplicação

(G): $G = \ln 2 / \mu$

$$K_2 = 3,332 \times (\text{Log } N_2 - \text{Log } N_1) / (t_2 - t_1)$$

Além disso, para as culturas da cepa CYP 011K (*C. raciborskii*), foi analisada a variação do comprimento dos tricomas durante o cultivo, a partir de cerca de noventa medidas aleatórias de tricomas de cada cultura nas diferentes condições experimentais. A partir destes dados obteve-se uma relação da variação do comprimento dos tricomas *versus* tempo de cultivo.

3.3.2 – BIOMASSA (PESO SECO)

Cepa NPJB-1 (*M. aeruginosa*)

Para determinação da biomassa obtida em cada condição de cultivo de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1) foram filtradas em filtros de borosilicato (AP-20 Millipore – 47 mm) previamente pesados, alíquotas de 500 mL das culturas na fase exponencial de crescimento (5^o dia para culturas mantidas a 100 e 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ e 7^o dia para culturas mantidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$) e na fase estacionária de crescimento (11^o dia). Após a filtração, os filtros foram secos em estufa a 60^o C e pesados. A diferença entre os pesos correspondeu à biomassa de células produzida em cada condição.

Cepa CYP 011K (*C.raciborskii*)

Para determinação da biomassa obtida em cada condição de cultivo de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K), foram retiradas alíquotas de 480 mL das culturas na fase exponencial de crescimento (7^o dia) e na fase estacionária de crescimento (12^o dia). A suspensão de células foi centrifugada a 10000g em centrífuga de bancada (Eppendorf -5403), durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o

precipitado foi congelado a -50°C (Shell Freezer – Labconco) e liofilizado (Freezone 6 – Labconco). O material seco foi pesado e o peso correspondeu à biomassa de células produzida em cada condição.

3.3.3 – ANÁLISE DE CLOROFILA a

Para análise da concentração de clorofila a, alíquotas de 10 mL de cada cultura, amostrados de três em três dias, foram filtradas em filtros de borossilicato (AP-20 Millipore – 13 mm). Após a filtração, os filtros foram colocados em tubos de ensaio encapados e sobre eles adicionou-se 5 mL de metanol 100%. Aguardou-se a extração por 20 minutos e as amostras foram centrifugadas a 3500g durante 10 minutos e determinou-se a densidade óptica do extrato em 666nm, corrigindo a turbidez em 730nm, em espectrofotômetro (UV-vis spectrophotometer - uv mini 1240 - Shimadzu). Para o cálculo da concentração de clorofila a, foi utilizado o coeficiente de extinção determinado por Mackinney (1941), para extração de clorofila a em metanol 100%:

$C = \text{Abs} / k \cdot d$, onde:

C = concentração de clorofila a em $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Abs = absorvância obtida a 666nm – 730nm

$k = 74.5 \text{ g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ – coeficiente de extinção de Mackinney (1941)

$d = 1 \text{ cm}$ (caminho óptico)

Os resultados da concentração de clorofila a foram então transformados para μg de Chl a / 10^6 células:

$\text{Chl a} / 10^6 \text{ células} = (\text{Chl a}_{t1} / N \cdot 10^6_{t1})$, onde:

Chl a_{t1} = concentração de clorofila a em $\mu\text{g/mL}$ no tempo $t1$;

$N \cdot 10^6_{t1}$ = número de células $\times 10^6 / \text{mL}$, no tempo $t1$.

3.3.4 – ANÁLISE DE CARBOIDRATOS

Para determinação da produção de carboidratos, alíquotas de 10 mL de cada cultura, amostradas de três em três dias, foram filtradas em filtros de borossilicato (AP-20 Millipore – 13 mm), previamente calcinados a 400°C em forno mufla durante 4h. Após a filtração das alíquotas, os filtros (carboidratos intracelulares) e os filtrados (carboidratos extracelulares) foram armazenados em tubos de ensaio tampados, a uma temperatura de -20°C até que fossem analisados. As análises foram realizadas pelo método fenol/ácido sulfúrico, de acordo com Myklestad & Haug (1972).

Para análise dos carboidratos intracelulares foi adicionado aos filtros 1 mL de ácido sulfúrico 80%, deixando em reação durante 20h à temperatura ambiente. Após esse tempo, a reação foi interrompida com 6 mL de água Milli-Q. Foram retiradas dessas soluções alíquotas de 1 mL, onde acrescentou-se 0,25 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Foi aguardado um tempo de 30 minutos para a reação e o resfriamento da solução, e a densidade óptica foi determinada a 485 nm em espectrofotômetro (Uv-vis spectrophotometer - uv mini 1240 - Shimadzu).

A análise de carboidratos extracelulares foi feita com alíquotas de 1 mL do filtrado, onde se acrescentou 0,25 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Aguardou-se o esfriamento da solução e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Uv-vis spectrophotometer - uv mini 1240 - Shimadzu) a 485nm.

Os cálculos para determinação da concentração de carboidratos foram realizados utilizando-se glicose como padrão (Dubois *et al.*, 1956).

Os resultados para concentração de carboidratos foram então transformados para μg de carboidratos/ 10^6 células:

$$\text{Carb} / 10^6 \text{ células} = (\text{Carb}_{t1} / N \cdot 10^6_{t1}), \text{ onde:}$$

Carb_{t1} = concentração de carboidratos intracelulares (ou extracelular) em $\mu\text{g}/\text{mL}$ no tempo $t1$,

$$N \cdot 10^6_{t1} = \text{número de células} \times 10^6 / \text{mL, no tempo } t1.$$

3.3.5 – ANÁLISE DAS CIANOTOXINAS

3.3.5.1 – Cepa NPJB-1 (*Microcystis aeruginosa*)

Para realização das análises da variação das concentrações de microcistina-LR nas diferentes condições experimentais, foram retiradas alíquotas de 500 mL de cada cultura, (i) na fase exponencial de crescimento (5º dia para 100 e 200, e 7º dia para 40 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e (ii) na fase estacionária de crescimento (11º dia). Estas amostras foram filtradas em filtros de borossilicato (AP-20 Millipore – 47 mm). O material retido no filtro foi tratado como amostra de fração particulada e o filtrado como amostra de fração dissolvida para determinação desta cianotoxina.

Extração e concentração de microcistina-LR da fração particulada

Para extração da microcistina-LR presente nas amostras de fração particulada foi utilizada a metodologia de Krishnamurty *et al.* (1986). Aos filtros foram adicionados 30 mL de uma solução de butanol, metanol e água (5:20:75 v/v) mantendo-se a suspensão em agitação por 1 hora. Os solventes utilizados para extração eram grau analítico (P.A). O material foi centrifugado a 6000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e este procedimento foi repetido mais duas vezes. Os sobrenadantes obtidos foram combinados e evaporados em fluxo de ar até um volume correspondente a 1/3 do original.

Para concentração e purificação desse extrato, as amostras foram passadas em cartuchos com aproximadamente 3,0g de octadecilsilano (Bond Elut C₁₈). Os cartuchos foram previamente ativados, passando-se 20mL de metanol 100%, seguido de 20 mL de água Milli-Q. Após a passagem das amostras os cartuchos foram lavados com 20 mL de água Milli-Q, 20 mL de metanol 20% e a eluição foi feita com 20 mL de metanol 100%. A última fração foi seca em fluxo de ar e ressuspensa em 1 mL de metanol 50% ficando em repouso por 1h. Esta fração foi então filtrada em filtros de nylon (Millipore, 45µm de poro, 13mm diâmetro) e analisada por HPLC.

Concentração de microcistina-LR da fração dissolvida

Para determinação da concentração de microcistina-LR presente na fração dissolvida, as amostras filtradas foram passadas em cartucho de octadecilsilano (Bond Elut C₁₈), previamente ativados com 20 mL de metanol 100%, seguido de 20mL de água Milli-Q. O cartucho foi lavado com 20 mL de água Milli-Q, 20 mL de

metanol 20% e eluido com 20 mL de metanol 100%, seqüencialmente. A última fração foi recolhida e novamente passada em cartucho de sílica (fase normal), previamente ativado com 20 mL de metanol 100%. A seguir, lavou-se o cartucho com 30 mL de metanol 100% e eluiu-se com 20 mL de uma solução de água, metanol e TFA (10:89,9:1 v/v) (Tsuji *et al.* 1994). A última fração foi seca e ressuspensa em 1 mL de metanol 50% e após 1 hora foi filtrada em filtros de nylon (Millipore, 45µm poro, 13mm diâmetro) e analisada por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Análise e quantificação de microcistina-LR

As análises para determinação da concentração de microcistina-LR foram realizadas por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O sistema de HPLC e as condições cromatográficas adotadas estão descritos nas tabelas 3.1 e 3.2, respectivamente. Os solventes utilizados nas análises eram grau HPLC.

Para a quantificação das amostras a serem analisadas, foi determinada uma curva padrão externa utilizando-se uma solução do padrão comercial de microcistina-LR (Sigma-Aldrich), em concentrações variáveis de 1,0 a 50,0 µg/mL, em metanol 50%. Foram feitas 5 análises cromatográficas para cada concentração, sendo então determinada a equação da reta, utilizando-se a média da área obtida em cada concentração. Esta equação foi utilizada para a quantificação da microcistina-LR presente nos extratos das amostras em µg/L. Para tanto, o espectro de absorção de cada pico observado nos cromatogramas foi analisado e comparado com o espectro obtido a partir da solução de padrão de microcistina-LR, analisada nas mesmas condições cromatográficas. A área dos picos que apresentavam um

espectro de absorção no UV (190 – 300nm), com índice de similaridade igual ou superior a 99%, ao obtido com o padrão de microcistina-LR, foi utilizada para o cálculo da concentração.

Tabela 3.1 – Sistema HPLC utilizado (Shimadzu)

Componentes	Descrição
Detector	UV/Vis - Detector de diodo - SPDM10Avp
Bomba	LC-10AT VP
Loop	100 µL
Coluna	Lichrospher 100 – RP(fase reversa) -18 (125X4mm), 5µm
Aplicativo	LZ Workstation Class-vp

Tabela 3.2 – Condições cromatográficas utilizadas

Parâmetro	Condição
Fluxo	1mL/min
Volume injetado	100 µL
U.V.	Espectro de absorção de 195 a 300 nm
Fase móvel	Condição isocrática; acetato de amônia 20mM, pH 5,0 (72%) e acetonitrila (28%- grau HPLC)
Deteccção	238 nm
Tempo	15 min

3.3.5.2 – Cepa CYP 011K (*Cylindrospermopsis raciborskii*)

Para realização das análises de cilindrospermopsina, foram retiradas alíquotas de 480mL, de cada cultura nas diferentes condições experimentais, (i) na fase exponencial de crescimento (7^o dia) e (ii) na fase estacionária de crescimento (12^o dia), das culturas de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K). Estas amostras foram centrifugadas a 10000g, durante 15 minutos. O precipitado foi tratado como amostra

de fração particulada e o sobrenadante como amostra de fração dissolvida para determinação desta cianotoxina.

Extração e concentração de cilindropermopsina da fração particulada

Para extração e concentração da cilindropermopsina presente nas amostras de fração particulada utilizou-se a metodologia de Li *et al.* (2001), com modificações na extração e eluição dos cartuchos. As amostras de fração particulada foram congeladas e liofilizadas. Adicionou-se 20 mL de água Milli-Q em cada amostra liofilizada e estas foram mantidas sob agitação magnética durante 1 hora. Em seguida, cada amostra foi centrifugada a 10000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado foi submetido a uma nova extração com agitação por uma hora e uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriormente descritas. Descartou-se o precipitado e os sobrenadantes foram combinados e passados em cartuchos de com aproximadamente 3,0g de octadecilsilano (Bond Elut C₁₈) previamente ativados com 20 mL de metanol 100%, seguido de 20mL de água Milli-Q. Após a passagem das amostras, eluiu-se os cartuchos com 40 mL de água Milli-Q. Esta fração foi então congelada e liofilizada. A fração seca obtida foi ressuspensa em 3 mL de água milli-Q, ficando em repouso por 1 hora e centrifugada a 15000g, durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, filtrados em filtros de nylon (Millipore, 45µm poro, 13mm diâmetro) e analisadas por HPLC.

Concentração de cilindrospermopsina da fração dissolvida

Para determinação da concentração da cilindrospermopsina presente nas amostras de fração dissolvida, o material foi passado em cartucho com aproximadamente 3,0g de octadecilsilano (Bond Elut C₁₈), também previamente ativado com 20 mL de metanol 100%, seguido de 20 mL de água Milli-Q. Após esta etapa o cartucho foi eluído com 40 mL de água Milli-Q. Esta última fração foi congelada, liofilizada, ressuspensa em 3 mL de água Milli-Q e mantida em repouso por 1 hora, sendo então centrifugada a 15000g, durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, filtrados em filtros de nylon (Millipore, 45µm poro, 13mm diâmetro) e analisados por HPLC.

Análise e quantificação de cilindrospermopsina

As análises para determinação da concentração da cilindrospermopsina foram realizadas de acordo com a metodologia de Welker *et al.*(2002), por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O sistema de HPLC e as condições cromatográficas adotadas estão descritos nas tabelas 3.3 e 3.4, respectivamente. Os solventes utilizados nas análises eram grau HPLC.

Para a quantificação das amostras a serem analisadas, foi determinada uma curva padrão externa utilizando-se uma solução do padrão comercial de cilindrospermopsina gentilmente cedida pelo Dr. Wayne W. Carmichael (Wright State University, USA), em concentrações variáveis de 0,1 a 50,0 µg/mL, em água Mili-Q. Foram feitas 5 análises cromatográficas para cada concentração, sendo então determinada a equação da reta, utilizando-se a média da área obtida em cada concentração. Esta equação foi utilizada para a quantificação da

cilindrospermopsina presente nos extratos das amostras, em $\mu\text{g/L}$. Para tanto, o espectro de absorção de cada pico observado nos cromatogramas foi analisado e comparado com o espectro obtido a partir da solução de padrão de cilindrospermopsina, analisada nas mesmas condições cromatográficas. A área dos picos que apresentavam um espectro de absorção no UV (190 – 300nm), com índice de similaridade igual ou superior a 99%, ao obtido com o padrão de cilindrospermopsina, foi utilizada para o cálculo da concentração desta toxina nas amostras.

Tabela 3.3 – Sistema HPLC utilizado (Shimadzu)

Componentes	Descrição
Detector	UV/Vis - Detector de diiodo - SPDM10Avp
Bomba	LC-10AT VP
Loop	100 μL
Coluna	Lichrospher 100 – RP (fase reversa) -18 (125X4mm), 5 μm
Aplicativo	LZ Workstation Class-vp

Tabela 3.4 – Condições cromatográficas utilizadas

Parâmetro	Condição
Fluxo	1mL/min
Volume injetado	100 μL
Verificação dos picos	Espectro de absorção de 195 a 300 nm
Fase móvel	Gradiente de 0-50% metanol + TFA (0,05%, V/V) e água Milli-Q
Deteccção	262 nm
Tempo	20min de gradiente

3.4 – PURIFICAÇÃO DE MICROSCISTINA-LR E CILINDROSPERMOPSINA

3.4.1 – Purificação de microcistina-LR

Para produção da microcistina-LR purificada, 4 alíquotas de 350 mL de cultura de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1), pré-adaptadas a intensidade luminosa previamente determinada como melhor para produção de microcistina-LR (a partir das análises dos experimentos de intensidade luminosa e dos parâmetros fisiológicos), foram inoculadas em 4 mariotes de 9L, contendo 7 litros de meio ASM-1, num total de 28 litros. Buscou-se com este volume obter uma boa margem de produção considerando as perdas de biomassa durante os processos de concentração das células, extração e eliminação de impurezas.

As culturas se desenvolveram até que atingissem a fase correspondente a maior produção de microcistina-LR. Os volumes de culturas obtidos foram concentrados por filtração tangencial (Pellicon® Cassette System – Millipore). Os concentrados obtidos foram congelados e liofilizados e repetiu-se o procedimento para extração e concentração da microcistina-LR presente nas amostras de fração particulada, como descrito no item 3.3.5.1.

O extrato obtido foi purificado por HPLC, nas mesmas condições cromatográficas descritas nas tabelas 3.1 e 3.2, porém utilizando-se coluna semi-preparativa (Lichrospher 100 – RP (fase reversa) -18 (250X10mm), 10 μ m), fluxo de 2 mL/min e loop de 1mL. Os picos correspondentes a microcistina-LR, analisados pelo tempo de retenção e espectro de absorção comparados com o padrão, foram coletados manualmente. Os picos coletados foram reunidos em uma única amostra compondo

5 mL e passados em cartucho de octadecilsilano para de sais provenientes da fase móvel, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 3.3.5.1.

Para nos certificarmos que as amostras continham microcistina-LR, após eliminação dos sais provenientes da fase móvel, esse material foi analisado em coluna analítica (Lichrospher 100 – RP (fase reversa) – 18 (125X4mm), 5 μ m). Primeiramente, identificaram-se os picos correspondentes à toxina tanto pelo tempo de retenção como pelo espectro de absorção e quantificaram-se os picos pela área. Em seguida, realizou-se uma co-eluição com um padrão comercial de microcistina-LR (Sigma-aldrich) diluído em metanol 50%.

Após a confirmação da purificação da microcistina-LR. As amostras coletadas por HPLC foram analisadas em coluna analítica (em triplicata) para que se pudesse quantificar a toxina presente. Foi tomado o peso de um frasco limpo, por cinco vezes, em balança com quatro casas de precisão, para que se tivesse certeza do seu peso. As amostras foram colocadas, aos poucos, dentro do frasco e secas em fluxo de ar. Após a secagem total dos 5 mL de amostra contendo a toxina purificada, esse material (frasco+amostra seca) foi novamente pesado (por cinco vezes). A diferença de peso antes e após acréscimo das amostras no frasco correspondeu à massa de toxina purificada.

3.4.2 – Purificação de cilindropermopsina

Para produção de cilindropermopsina purificada, 3 alíquotas de 700 mL de cultura de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K), pré-adaptadas a intensidade luminosa previamente determinada como melhor para produção de cilindropermopsina (a partir das análises dos experimentos de intensidade luminosa e dos parâmetros

fisiológicos) foram inoculadas em 3 mariotes de 9L, contendo 6 litros de meio ASM-1, perfazendo um total de 18 litros. Buscou-se com este volume obter uma boa margem de produção considerando as perdas de biomassa durante os processos de concentração das células, extração e eliminação de impurezas.

As culturas se desenvolveram até que atingissem a fase correspondente à maior produção de cilindropermopsina (resultado dos experimentos de intensidade luminosa). Os volumes de culturas obtidos foram concentrados por centrifugação a 10000 g, durante 15 minutos em centrífuga de bancada (Eppendorf -5403). Os concentrados obtidos foram liofilizados. Repetiu-se o procedimento para extração e concentração da cilindropermopsina presente na fração particulada como descrito no item 3.3.5.2.

O extrato obtido foi purificado por HPLC, nas mesmas condições cromatográficas descritas nas tabelas 3.3 e 3.4, porém utilizando-se coluna semi-preparativa (Lichrospher 100 – RP (fase reversa) -18 (250X10mm), 10 μ m), fluxo de 2 mL/min e loop 1mL.. Os picos correspondentes a cilindropermopsina, analisados por comparação com o padrão, foram coletados manualmente e reunidos em uma única amostra de 6,8 mL.

Para nos certificarmos que as amostras continham cilindropermopsina esse material foi analisado em coluna analítica (Lichrospher 100 – RP (fase reversa) – 18 (125X4mm), 5 μ m). Primeiramente, identificaram-se os picos correspondentes à toxina tanto pelo tempo de retenção como pelo espectro de absorção e quantificaram-se os picos pela área. Em seguida, realizou-se uma co-eluição com um padrão de cilindropermopsina (gentilmente cedido por Dr. Wayne. W. Carmichael) diluído em água Milli-Q.

Após a confirmação da purificação da cilindrospermopsina. As amostras coletadas por HPLC foram analisadas em coluna analítica (por quatro vezes) para que se pudesse quantificar a toxina presente. Foi tomado o peso de um frasco limpo, em balança com quatro casas de precisão, por cinco vezes, para que se tivesse certeza do seu peso. As amostras foram colocadas, aos poucos, dentro do frasco, congeladas e liofilizadas. Após a secagem total dos 6,8 mL de amostra contendo cilindrospermopsina purificada, esse material (frasco+amostra seca) foi novamente pesado (por cinco vezes). A diferença de peso antes e após acréscimo das amostras no frasco correspondeu à massa de toxina purificada.

3.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados foram analisados estatisticamente a partir dos testes de Kruskal-Wallis - KW (análise de variância, ANOVA) para comparação de três médias e teste t, para comparação entre duas médias, com limite de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), através do aplicativo **GraphPad InStat 3.01 for Win 95/NT, 1998**. Devido ao tamanho amostral ($n=3$), para todos os tratamentos foram utilizados testes não paramétricos.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – CRESCIMENTO CELULAR

CEPA NPJB-1 (*Microcystis aeruginosa*)

Na figura 4.1 estão apresentadas as curvas de crescimento de *M.aeruginosa* (NPJB-1) nas diferentes intensidades luminosas. A maior taxa de crescimento (μ), maior taxa de duplicação (K_2) e o menor tempo de duplicação (G) foram obtidos nas culturas submetidas a 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. O maior rendimento celular (R) ocorreu nas culturas mantidas a 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (tabela 4.1).

Comparando-se as m\u00e9dias do n\u00famero de c\u00e9lulas, durante o crescimento das culturas (teste t), p\u00f4de-se observar diferen\u00e7as significativas a partir do 3\u00b0 dia de cultivo, entre as culturas mantidas a 40 com as mantidas a 100 e 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. As compara\u00e7\u00f5es entre as m\u00e9dias do n\u00famero de c\u00e9lulas das culturas mantidas a 100 com as mantidas a 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ mostraram diferen\u00e7as significativas somente no 3\u00b0, 5\u00b0, 8\u00b0 e 11\u00b0 dias de cultivo, o que demonstra uma maior similaridade entre o crescimento destas culturas. A an\u00e1lise de vari\u00e2ncia (ANOVA-KW) demonstrou que as m\u00e9dias da varia\u00e7\u00e3o do n\u00famero de c\u00e9lulas das tr\u00eas culturas diferiram significativamente a partir do 3\u00b0 dia de cultivo, exceto no 4\u00b0 dia (tabela 4.2).

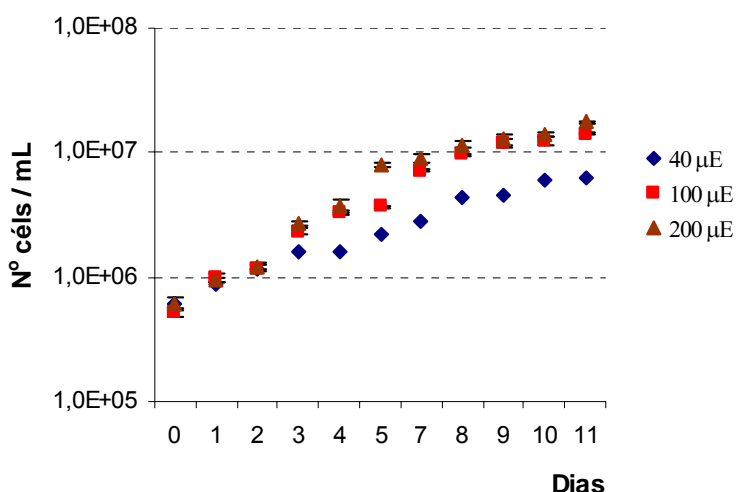


Figura 4.1 – Curvas de crescimento de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 4.1 – Parâmetros de crescimento das culturas de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1): taxa de crescimento (μ ; dia⁻¹), tempo de duplicação (G; dia⁻¹), rendimento celular máximo (R; número de células . mL⁻¹); número de divisões por dia (K_2).

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	PAR\u00c2METROS
40	$\mu = 0,199$
	$G = 3,479$
	$R = 0,55 \times 10^7$
	$K_2 = 0,288$
100	$\mu = 0,374$
	$G = 1,856$
	$R = 1,6 \times 10^7$
	$K_2 = 0,541$
200	$\mu = 0,357$
	$G = 1,941$
	$R = 1,7 \times 10^7$
	$K_2 = 0,517$

Tabela 4.2 – Análise estatística da variação do número de células em culturas de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1); n=3, $\alpha=0,05$. Em destaque valores de $P<0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40 x 100	0	0,1193	Teste t
	1	0,1218	
	2	0,6123	
	3	0,0059	
	4	0,0004	
	5	0,0019	
	7	<0,0001	
	8	0,0001	
	9	0,0054	
	10	0,0022	
	11	0,0002	
	40 x 200	0	
1		0,0777	
2		0,2926	
3		0,0019	
4		0,0002	
5		0,0030	
7		0,0073	
8		0,0010	
9		0,0073	
10		0,0022	
11		<0,0001	

Tabela 4.2 – Continuação.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
100 x 200	0	0,1197	Teste t
	1	0,3801	
	2	0,2703	
	3	0,0259	
	4	0,2197	
	5	0,0302	
	7	0,1938	
	8	0,0002	
	9	0,3534	
	10	0,1153	
	11	0,0043	
	40 x 100 x 200	0	
1		0,2250	
2		0,5429	
3		0,0059	
4		0,1837	
5		0,0019	
7		<0,0001	
8		0,0036	
9		0,0054	
10		0,0036	
11		0,0002	

Os resultados obtidos demonstraram que as maiores intensidades luminosas influenciaram positivamente a taxa de crescimento da cepa NPJB-1 de *M. aeruginosa*. Houve uma distinção das culturas sob as diferentes irradiâncias testadas, onde as culturas mantidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ obtiveram as menores taxas de crescimento.

Resultados semelhantes em experimentos sobre a influência da luz sobre o crescimento de *M. aeruginosa* (NPLJ-4) foram relatados por Molica (1996), onde foi observado a menor taxa de crescimento em culturas submetidas a menor intensidade luminosa (40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), quando comparada à culturas mantidas a uma maior intensidade luminosa (180 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$). Por outro lado, já foram observados comportamentos semelhantes nas curvas de crescimento de duas cepas de *M. aeruginosa* crescendo em irradiâncias de 4 a 110 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, com as culturas mantendo a mesma taxa de crescimento entre 40 e 110 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (Hesse *et al.*, 2001).

CEPA CYP 011K (*Cylindrospermopsis raciborskii*)

Na figura 4.2 estão apresentadas as curvas de crescimento *C. raciborskii* (CYP 011K) nas diferentes intensidades luminosas. A maior taxa de crescimento (μ), maior taxa de duplicação (K_2), menor tempo de duplicação (G) e maior rendimento celular (R) foram obtidos pelas culturas mantidas a 100 $\mu\text{moles f\otimes\text{tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}}$ (tabela 4.3).

Comparando-se as m\u00e9dias do n\u00famero de c\u00e9lulas, durante o crescimento das culturas (teste t), p\u00f4de-se observar diferen\u00e7as significativas a partir do 1\u00b0 dia de cultivo entre as culturas mantidas a 40 e 60 $\mu\text{moles f\otimes\text{tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}}$, exceto para 3\u00b0 e 4\u00b0 dias. Entre as culturas mantidas a 40 e 100 $\mu\text{moles f\otimes\text{tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}}$ as diferen\u00e7as foram significativas a partir do 4\u00b0 dia de cultivo. A partir do 2\u00b0 dia as diferen\u00e7as foram significativas nas compara\u00e7\u00f5es entre as m\u00e9dias do n\u00famero de c\u00e9lulas das culturas mantidas a 60 e 100 $\mu\text{moles f\otimes\text{tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}}$, exceto no 11\u00b0 dia. A an\u00e1lise de vari\u00e2ncia (ANOVA-KW) demonstrou que as m\u00e9dias da varia\u00e7\u00e3o do n\u00famero de c\u00e9lulas das tr\u00eas culturas diferiram significativamente a partir do 1\u00b0 dia de cultivo, exceto no 2\u00b0 e 4\u00b0 dias (tabela 4.4).

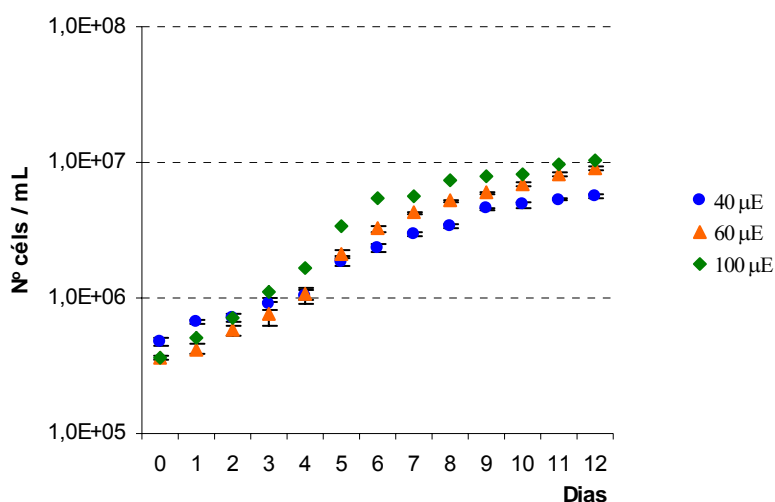


Figura 4.2 – Curvas de crescimento de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 4.3 – Parâmetros de crescimento das culturas de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K): taxa de crescimento (μ ; dia⁻¹), tempo de duplicação (G; dia⁻¹) e rendimento celular máximo (R; número de células . mL⁻¹); número de divisões por dia (K₂).

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	PAR\u00c2METROS
40	$\mu = 0,345$
	G = 2,012
	R = 6,2 . 10 ⁶
	K ₂ = 0,453
60	$\mu = 0,509$
	G = 1,362
	R = 8,9 . 10 ⁶
	K ₂ = 0,689
100	$\mu = 0,548$
	G = 1,265
	R = 10, 0 . 10 ⁶
	K ₂ = 1,509

Tabela 4.4 – Análise estatística da variação do número de células em culturas de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K); n=3, $\alpha = 0,05$. Em destaque valores de $P < 0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40 x 60	0	0,8630	Teste t
	1	0,0022	
	2	0,0445	
	3	0,1477	
	4	0,6242	
	5	0,0353	
	6	0,0004	
	7	<0,0001	
	8	0,0065	
	9	0,0007	
	10	0,0008	
	11	0,0042	
	12	0,0011	
40 x 100	0	0,6543	Teste t
	1	0,0513	
	2	0,8121	
	3	0,0822	
	4	0,0041	
	5	0,0009	
	6	0,0013	
	7	0,0002	
	8	0,0002	
	9	<0,0001	
	10	0,0004	
	11	0,0001	
	12	0,0015	

Tabela 4.4 – Continuação.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
60 x 100	0	0,6667	Teste t
	1	0,1537	
	2	0,0248	
	3	0,0287	
	4	0,0054	
	5	0,0013	
	6	0,0063	
	7	0,0063	
	8	0,0035	
	9	0,0007	
	10	0,0065	
	11	0,0117	
	12	0,0756	
40 x 60 x 100	0	0,8786	Teste KW
	1	0,0107	
	2	0,0500	
	3	0,0286	
	4	0,0500	
	5	0,0036	
	6	0,0036	
	7	0,0036	
	8	0,0036	
	9	0,0036	
	10	0,0036	
	11	0,0036	
	12	0,0036	

Os resultados obtidos demonstraram que as maiores intensidades luminosas influenciaram positivamente a taxa de crescimento da cepa CYP 011K *C. raciborskii*. Houve uma distinção das culturas sob as diferentes irradiâncias testadas, onde as culturas mantidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ obtiveram as menores taxas de crescimento. Da mesma forma, Briant *et al.* (2004) relataram taxas de crescimento variando de 0,4 a 0,8 em culturas de *C. raciborskii* crescendo sob irradiâncias de 50 a 125 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, com maiores valores sendo obtidos em culturas mantidas sob as maiores intensidades luminosas.

Os valores encontrados para taxa de crescimento de ambas as cepas em nossos experimentos estão de acordo com os citados na literatura. Até 20° C e sob saturação luminosa, é comum encontrar taxas de 0,3 a 1,4 divisões por dia, para vários grupos de cianobactérias (Van Liere & Walsby, 1982 *apud* Chorus & Bartram, 1999). Semelhantemente, alguns trabalhos desenvolvidos no LETC-UFRJ relataram taxas de crescimento parecidas com as encontradas em nossos experimentos: culturas de *M. aeruginosa* NPLJ-4, quando mantidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ apresentaram $\mu = 0,39$ e quando mantidas a 180 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ $\mu = 0,47$ (Molica, 1996); culturas de *Synechocystis aquatilis f. salina*, quando submetidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ apresentaram $\mu = 0,37$ (Nascimento & Azevedo, 1999); culturas de *Synechocystis aquatilis f. aquatilis*, quando submetidas a 55 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ apresentaram $\mu = 0,28$ (Oliveira, 1997); culturas de *M. aeruginosa* NPLJ-37 quando submetidas a 70 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ apresentaram $\mu = 0,40$ (Domingos, 2001).

VARIAÇÃO DO COMPRIMENTO DOS TRICOMAS DA CEPA CYP 011K (*Cylindrospermopsis raciborskii*)

Os dados apresentados na figura 4.3 demonstraram que ocorreu uma diferenciação na variação do comprimento dos tricomas durante o cultivo da cepa CYP 011K (*C. raciborskii*). Nas comparações entre as médias da variação do comprimento dos tricomas nas culturas submetidas às diferentes intensidades luminosas, o teste t revelou diferenças significativas a partir do 6º dia, entre as culturas mantidas a 40 e 60 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Entre as culturas mantidas a 40 e 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, as diferenças foram significativas a partir do 3º dia de cultivo. Entre as culturas mantidas 60 e 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, somente no 3º dia, mostrando uma similaridade no comportamento das culturas sob estas irradiâncias. Na comparação entre as médias da variação do comprimento dos tricomas nas culturas sob as três intensidades luminosas a análise de variância (ANOVA – KW) demonstrou que as diferenças foram significativas durante todo experimento (tabela 4.5).

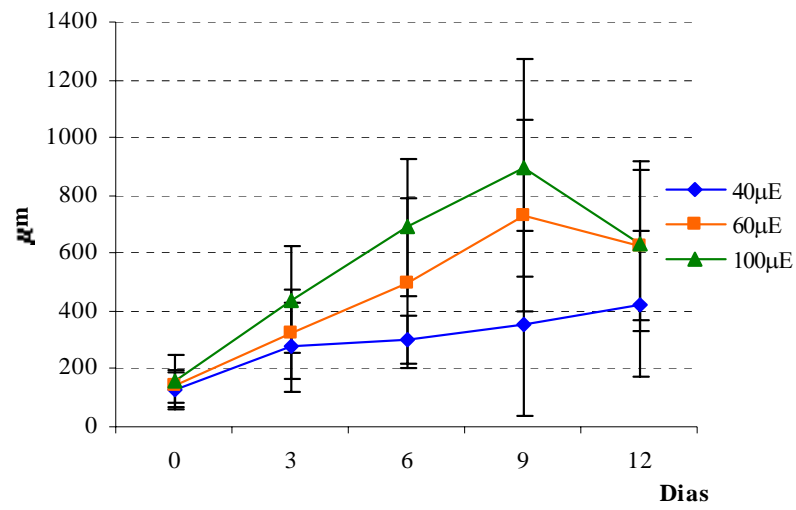


Figura 4.3 – Variação no comprimento dos tricomas durante o cultivo de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 4.5 – Análise estatística da variação no comprimento dos tricomas em culturas de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K); n=3, $\alpha = 0,05$. Em destaque valores de $P < 0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40 x 60	0	0,9652	Teste t
	3	0,3545	
	6	<0,0001	
	9	0,0003	
	12	0,0022	
40 x 100	0	0,1669	Teste t
	3	0,0021	
	6	<0,0001	
	9	<0,0001	
	12	0,0087	
60 x 100	0	0,1450	Teste t
	3	0,0199	
	6	0,1576	
	9	0,1547	
	12	0,5215	
40 x 60 x 100	0	0,0179	KW
	3	0,0005	
	6	<0,0001	
	9	<0,0001	
	12	0,0010	

Nas culturas mantidas sob as maiores intensidades luminosas (60 e 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), houve uma tend\ecencia de aumento no comprimento dos tricomas, at\ec9 o in\ecio da fase estacion\ec1ria de crescimento, com os valores decaindo a partir do 9^o dia de cultivo. Nas culturas mantidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, o comprimento dos tricomas tendeu a crescer at\ec9 o fim do experimento (Fig. 4.3).

Briant *et al.* (2002) avaliaram a toler\ec1ncia de 10 cepas t\ec9xicas de *C. raciborskii* a diferentes intensidades luminosas (de 30 a 400 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), demonstrando que o crescimento m\ec1ximo para esta esp\ecie foi de 80 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Dessa forma, sob as maiores intensidade luminosas as culturas poderiam estar submetidas a uma condi\ec9\ec3o estressante, o que poderia ter ocasionado o rompimento dos tricomas.

Cilindrospermopsis \ec9 um g\ec9nero constitu\ec9do por tricomas, sendo caracterizado pelo desenvolvimento de heterocitos (c\ec9lulas especializadas na fixa\ec9\ec3o de nitrog\ec9nio) na por\ec9\ec3o terminal dos filamentos, em uma ou nas duas extremidades e pela presen\ec3a de acinetos (esporos de resist\ec9ncia) ap\ec9s uma a tr\ec9s c\ec9lulas vegetativas, a contar do \ec1pice dos filamentos (Shafik, 2003). Varia\ec9\ec3es morfol\ec9gicas durante o cultivo de cepas de *C. raciborskii* t\ec9m sido relatadas.

Saker *et al.* (1999), encontraram uma grande variabilidade nas formas dos heterocistos, nos comprimento e largura dos filamentos e, no comprimento, largura e quantidade de acinetos, durante o cultivo de *C. raciborskii*, com varia\ec9\ec3es na quantidade de nutrientes utilizadas no meio de cultura e na quantidade de luz a que as culturas foram submetidas citando al\ec9m de diferen\ec3as morfol\ec9gicas, diferen\ec3as gen\ec9ticas entre duas cepas. Da mesma forma, Shafik (2003) trabalhando com culturas vari\ec1veis nas concentra\ec9\ec3es de nutrientes no meio de cultura, encontrou variabilidades na morfologia das c\ec9lulas de *C. raciborskii* ACT 9502 sob diferentes

condições de cultivo. Chonudomkul *et al.* (2004) analisaram a variabilidade genética, tolerância a variações de temperatura e toxicidade de 24 (vinte e quatro) cepas, concluindo que as cepas são perfeitamente separáveis em ecotipos fisiológicos distintos e que a síntese de compostos tóxicos por *C. raciborskii* é um resultado da dinâmica genética de cada cepa. Assim, os resultados observados poderiam estar ligados à baixa tolerância da cepa estudada a altas intensidades luminosas.

Alguns autores reportaram ainda, a excreção da toxina cilindrospermopsina para o meio extracelular, durante o crescimento exponencial e durante a fase estacionária de crescimento de culturas de *C. raciborskii*. Saker & Griffiths (2000) encontraram cerca de 50% do conteúdo de cilindrospermopsina no meio extracelular em culturas após 20 dias em fase estacionária. De maneira similar, Hawkins *et al.* (2001) citaram a ocorrência de cerca de 20% do conteúdo de cilindrospermopsinas no meio extracelular, durante a fase exponencial de crescimento e 50% na fase estacionária.

Esses fatos chamam a atenção já que os mecanismos responsáveis por estas variabilidades ainda não estão bem esclarecidos. Este estudo não teve como objetivo analisar as variações morfológicas e genéticas de *C. raciborskii* cultivada durante os nossos experimentos, nem tão pouco elucidar os mecanismos que levam a excreção da toxina cilindrospermopsina para o meio extracelular. Por outro lado, sabendo-se que pode ocorrer excreção da toxina para o meio e levantando a hipótese que um dos mecanismos prováveis desta excreção é fragmentação dos filamentos durante o desenvolvimento, analisando a variação do comprimento dos tricomas durante o cultivo da cepa CYP 011K (*C. raciborskii*), pudemos obter mais uma ferramenta de análise para cumprimento do objetivo principal deste trabalho, que é o estabelecimento da melhor condição de cultivo para a produção de cilindrospermopsina em *C. raciborskii*.

4.2 – PRODUÇÃO DE CLOROFILA a

CEPA NPJB-1 (*Microcystis aeruginosa*)

A figura 4.4 mostra a variação na concentração de clorofila a em 10^6 células durante o cultivo de *M. aeruginosa* (NPJB-1). O teste t mostrou diferenças significativas somente no 9º dia de cultivo, para comparações entre as culturas de 40 com as de 100 e 200 $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, quando se comparou as m\u00e9dias da produ\u00e7\u00e3o de clorofila a, entre as culturas. Entre as tr\u00eas culturas a an\u00e1lise de vari\u00e2ncia (ANOVA-KW) demonstrou diferen\u00e7as significativas no 3º e 9º dias de cultivo (tabela 4.6).

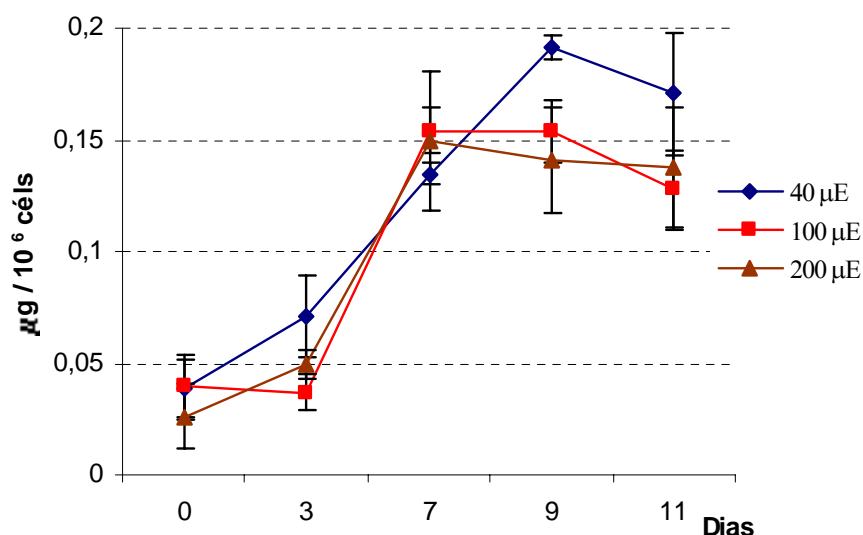


Figura 4.4 – Varia\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de clorofila a em 10^6 células de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1). As barras de erro indicam o desvio padr\u00e3o das m\u00e9dias (n=3).

Tabela 4.6 – Análise estatística da variação da concentração de clorofila *a* em 10^6 células de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1); $n=3$, $\alpha=0,05$. Em destaque valores de $P<0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40 x 100	0	0,9265	Teste t
	3	0,0947	
	7	0,0978	
	9	0,0458	
	11	0,1065	
40 x 200	0	0,3360	Teste t
	3	0,1866	
	7	0,5096	
	9	0,0678	
	11	0,2373	
100 x 200	0	0,3316	Teste t
	3	0,1278	
	7	0,8207	
	9	0,0458	
	11	0,6215	
40 x 100 x 200	0	0,5107	Teste KW
	3	0,0107	
	7	0,2964	
	9	0,0250	
	11	0,2321	

Os resultados mostraram uma variação de até três vezes na concentração de clorofila \underline{a} durante o cultivo, com os maiores valores observados nas culturas mantidas a 40 $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As culturas mantidas a 100 e 200 $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tamb\u00e9m apresentaram um aumento inicial na concentra\u00e7\u00e3o de clorofila \underline{a} e um posterior decr\u00e9scimo, que ocorreu a partir do s\u00e9timo dia, demonstrando um comportamento semelhante entre estas culturas (Fig. 4.4).

Com o aumento do n\u00famero de c\u00e9lulas decorrente do desenvolvimento das culturas, h\u00e1 tamb\u00e9m um aumento a turbidez, diminuindo a intensidade luminosa dispon\u00edvel pelo processo de auto-sombreamento das culturas. Isto ocasiona um aumento na s\u00edntese de clorofila \underline{a} (Molica, 1996). Por outro lado, a diminui\u00e7\u00e3o dos valores de clorofila \underline{a} ao final do cultivo coincidiu com a desacelera\u00e7\u00e3o no crescimento das culturas (Fig. 4.1).

Da mesma forma que em nossos resultados, Molica (1996) e Hesse *et al.* (2001) encontraram menores valores na concentra\u00e7\u00e3o de clorofila \underline{a} , em culturas de *M. aeruginosa* sob altas irradi\u00e2ncias e maiores valores em culturas submetidas \u00e0 menores intensidades luminosas. Esses resultados corroboram a hip\u00f3tese de que sob baixas intensidades luminosas o aumento no conte\u00fado de clorofila \underline{a} possibilitaria o melhor aproveitamento da luz incidente em culturas de cianobact\u00e9rias (Foy & Gibson, 1982; Zevenboon & Mur, 1984). Por\u00e9m, relatos da literatura sobre as concentra\u00e7\u00f5es de clorofila \underline{a} em geral s\u00e3o abordados levando em conta a avalia\u00e7\u00e3o destas concentra\u00e7\u00f5es em micrograma por litro ou por metro c\u00fabico (Nascimento & Azevedo, 1999) e em nosso estudo estes dados n\u00e3o s\u00e3o aplic\u00e1veis, pois os nossos resultados est\u00e3o normalizados pelo n\u00famero de c\u00e9lulas.

CEPA CYP 011K (*Cylindrospermopsis raciborskii*)

A figura 4.5 mostra a variação na concentração de clorofila a em 10^6 células durante o cultivo de *C. raciborskii* (CYP 011K). O teste t mostrou diferenças significativas, quando se compararam as médias da produção de clorofila no 3º, 9º e 12º dias de cultivo entre as culturas mantidas a 40 e 60 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Entre 40 e 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ as diferenças foram significativas durante todo o experimento, exceto no 6º dia de cultivo. Entre 60 e 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, as diferenças foram significativas ao longo do experimento. A análise de variância (ANOVA-KW) demonstrou diferenças significativas entre as culturas a partir do 3º dia de cultivo (tabela 4.7).

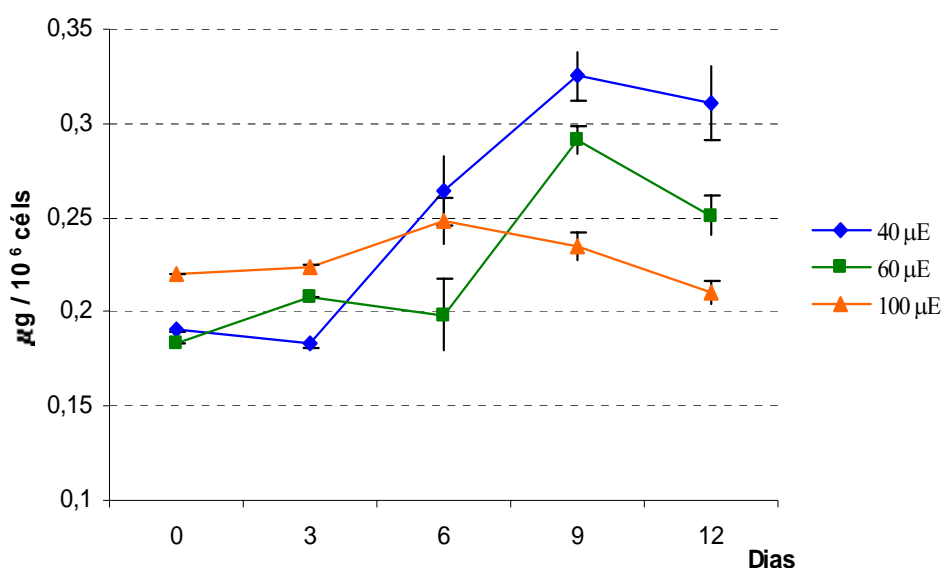


Figura 4.5 – Variação da concentração de clorofila a em 10^6 células de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias ($n=3$).

Tabela 4.7 – Análise estatística da variação da concentração de clorofila *a* em 10^6 células de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K); $n=3$, $\alpha =0,05$. Em destaque valores de $P<0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40 x 60	0	0,7475	Teste t
	3	0,0120	
	6	0,0780	
	9	0,0912	
	12	0,0101	
40 x 100	0	0,0052	Teste t
	3	0,0053	
	6	0,2537	
	9	0,0028	
	12	0,0263	
60 x 100	0	0,0354	Teste t
	3	0,0387	
	6	0,0065	
	9	0,0059	
	12	0,0166	
40 x 60 x 100	0	0,0561	KW
	3	0,0485	
	6	0,0034	
	9	0,0015	
	12	0,0281	

Os valores de clorofila a foram maiores nas culturas mantidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, com um decréscimo da produção a partir do 9^o dia de cultivo. Esse decréscimo também ocorreu, a partir do 9^o dia, nas culturas mantidas a 60 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Da mesma forma que para a cepa NPJB-1, os maiores valores de clorofila a encontrados nas culturas da cepa CYP 011K submetidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, podem ser justificáveis pela capacidade de regulação do conteúdo de clorofila a em resposta à baixa intensidade luminosa testada (Foy & Gibson, 1982; Zevenboon & Mur, 1984).

As culturas mantidas a 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ mantiveram valores muito próximos no conteúdo de clorofila a , com um pequeno declínio nesses valores a partir do 6^o dia de cultivo (Fig. 4.5), enquanto que as outras culturas apresentaram variações nas concentrações de clorofila a em cerca de três vezes durante o cultivo. Conforme relatado por Briant *et al.* (2002) o crescimento máximo para *C. raciborskii* sob diferentes regimes de irradiância (de 30 a 400 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$) foi observado em 80 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, o que está muito próximo do valor onde foi observada a maior taxa de crescimento em nossos experimentos.

Além disso, sob maiores intensidades luminosas a energia seria suficiente para manutenção do metabolismo celular, suprimindo a necessidade de um aumento no conteúdo de clorofila a (Darley, 1982). Assim, o incremento na concentração de clorofila a , que geralmente é observado na fase exponencial de crescimento, foi pouco pronunciado nas culturas sob 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$.

As culturas de *C. raciborskii* (CYP 011K) apresentaram valores mais elevados de clorofila a (cerca de três vezes) ao final do crescimento exponencial, se comparadas com o maior valor encontrado nas culturas de *M. aeruginosa* (NPJB-1). Numa

revisão realizada por Padisák (1997), a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* foi caracterizada por apresentar uma baixa tolerância a altas intensidades luminosas.

Bouvy *et al.* (1999) estudaram a relação entre o conteúdo de clorofila a e a intensidade luminosa durante a ocorrência de uma floração de *C. raciborskii* coletada de 0,5 a 5,0 metros de profundidade, onde as intensidades luminosas variaram de 14 a 650 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Seus resultados demonstraram que sob as menores irradiâncias (menores que 63 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$) foram encontrados os maiores valores de clorofila a por litro (de 70,8 a 135,0 $\mu\text{g/L}$) de amostra coletada, onde também foram encontradas as maiores densidades de células por litro, confirmando um aumento no conteúdo de clorofila a sob as menores irradiâncias e a baixa tolerabilidade a altas irradiâncias.

Estes resultados, apesar de serem tratados em micrograma de clorofila a por litro, levam-nos a acreditar que a espécie *C. raciborskii* sendo adaptada a baixas intensidades luminosas provavelmente deveria apresentar valores de clorofila a maiores que os encontrados para *M. aeruginosa*. Desta forma, nossos resultados estão de acordo com estes autores, justificando os maiores valores na concentração de clorofila a encontrados nas culturas de *C. raciborskii* (CYP 011K).

4.3 – PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS

CEPA NPJB-1 (*Microcystis aeruginosa*)

A figura 4.6 mostra a variação da concentração de carboidratos intracelulares (a) e extracelulares (b) em 10^6 células, durante o cultivo da cepa NPJB-1. Não ocorreram diferenças significativas entre as médias da concentração de carboidratos intracelulares (tabela 4.8).

O teste t mostrou diferenças significativas, entre as médias da concentração de carboidratos extracelulares, somente no 3º dia de cultivo nas comparações entre as culturas mantidas a 40 e 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. A análise de variância (ANOVA-KW) mostrou diferenças significativas entre todas as culturas somente no 3º dia de cultivo (tabela 4.9).

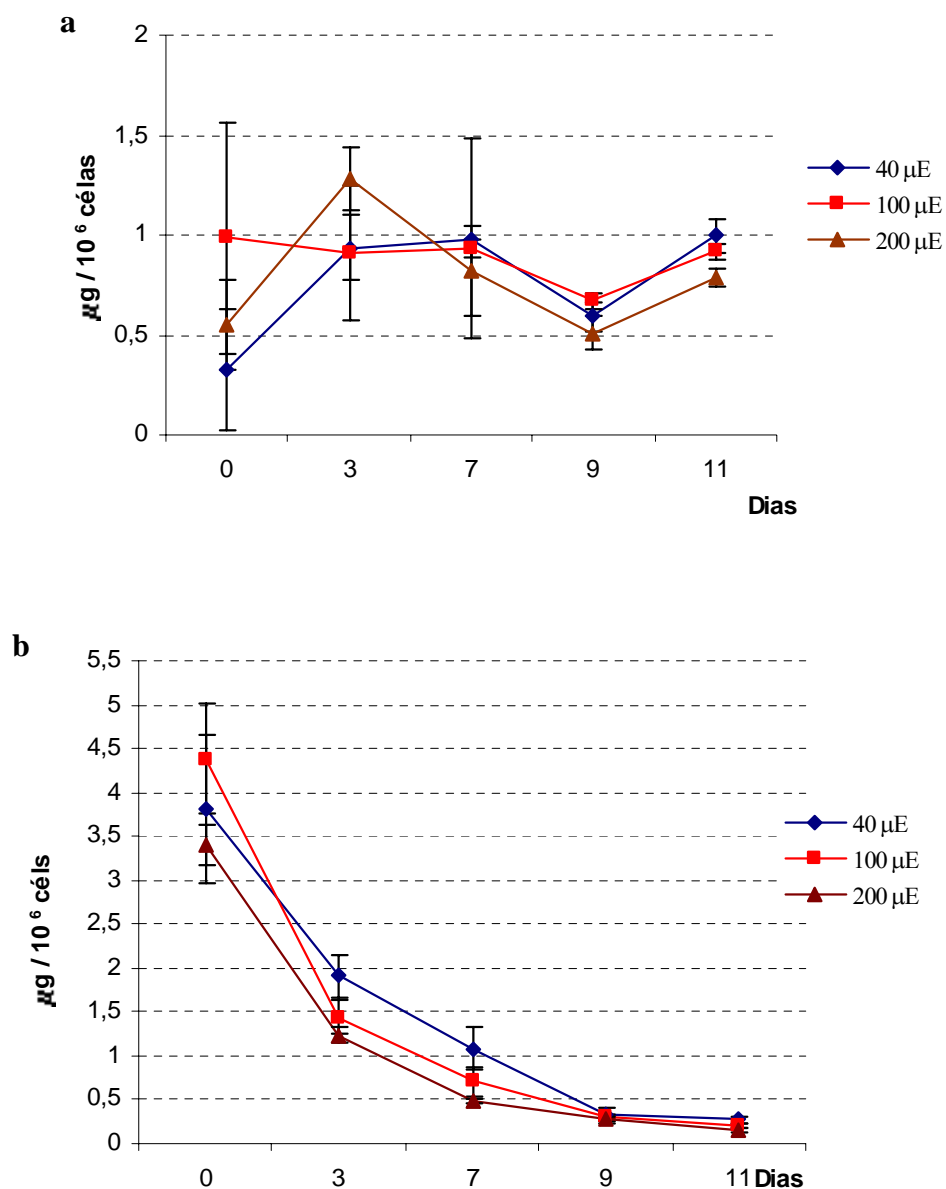


Figura 4.6 – Variação na concentração de carboidratos (a) intracelulares e (b) extracelulares em 10^6 células de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 4.8 – Análise estatística da variação da concentração de carboidratos intracelulares em 10^6 células de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1); n=3, $\alpha=0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40 x 100	0	0,1802	Teste t
	3	0,9323	
	7	0,5866	
	9	0,3699	
	11	0,1725	
40 x 200	0	0,3940	Teste t
	3	0,2336	
	7	0,2821	
	9	0,3699	
	11	0,6269	
100 x 200	0	0,2862	Teste t
	3	0,2224	
	7	0,0867	
	9	0,4671	
	11	0,0579	
40 x 100 x 200	0	0,2199	Teste KW
	3	0,3396	
	7	0,1321	
	9	0,2214	
	11	0,0500	

Tabela 4.9 – Análise estatística da variação da concentração de carboidratos extracelulares em 10^6 células de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1); $n=3$, $\alpha=0,05$. Em destaque valores de $P<0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40 x 100	0	0,4169	Teste t
	3	0,0752	
	7	0,1083	
	9	0,5174	
	11	0,1218	
40 x 200	0	0,5009	Teste t
	3	0,0455	
	7	0,5016	
	9	0,2580	
	11	0,3344	
100 x 200	0	0,1257	Teste t
	3	0,2531	
	7	0,1435	
	9	0,4472	
	11	0,1488	
40 x 100 x 200	0	0,1964	Teste KW
	3	0,0250	
	7	0,0857	
	9	0,5929	
	11	0,1174	

A concentração de carboidratos intracelulares tendeu a aumentar durante o início do experimento (até o 3º dia) nas culturas mantidas a 40 e 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Nas culturas mantidas a 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ ocorreu um declínio na concentração, a partir do 3º dia de cultivo. Nas culturas mantidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ este declínio ocorreu a partir do 7º dia. Nas culturas mantidas a 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ a concentração permaneceu praticamente constante, com pouca variação durante o cultivo e um pequeno declínio a partir do 7º dia. Todas as culturas apresentaram um aumento no conteúdo de carboidratos intracelulares a partir do 9º dia de cultivo.

A variação na concentração de carboidratos pode ser considerada como indicativo do estado metabólico das células do fitoplâncton em cultivo. Em geral a concentração intracelular tende a diminuir durante o crescimento exponencial (Vieira & Myklestad, 1986). Por outro lado, com a desaceleração do crescimento, há aumento no conteúdo de carboidratos nas células, o que foi observado a partir do 9º dia de experimento indicando o início de fase estacionária, como conseqüência da redução do metabolismo com redução na taxa de divisão celular e com isso os carboidratos fotossinteticamente formados tendem a se acumular (Kroomkamp, 1987) o que concorda com o observado na curva de crescimento da cepa NPJB-1 (Fig 4.1).

Van Liere *et al.* (1979) trabalhando com culturas de *Oscillatoria agardhii* e Kroomkamp (1987) com *M. aeruginosa* relataram uma maior síntese de carboidratos em culturas submetidas a maiores intensidades luminosas. Molica (1996) relatou uma diminuição no conteúdo de carboidratos intracelulares, em culturas de *M. aeruginosa* (NPLJ-4) submetidas a menores intensidades luminosas. Porém, os maiores valores na concentração de carboidratos intracelulares foram encontrados

apenas no 3º dia nas culturas sob as maiores intensidades luminosas e permaneceram indistintos entre os tratamentos adotados durante todo o cultivo, indicando que estes tratamentos não foram capazes de modificar de maneira significativa o conteúdo de carboidratos intracelulares (Fig. 4.6a, tabela 4.8)

Os maiores valores de carboidratos extracelulares foram observados no primeiro dia de cultivo em todas as condições testadas (Fig 4.6b). No entanto, as diferentes intensidades luminosas também não foram capazes de diferenciar as excreções de carboidratos pelas células durante o cultivo.

Os organismos fotossintetizantes de ambientes dulcícolas liberam, em um processo metabólico natural, parte do carbono fotoassimilado diretamente para o meio na forma de compostos orgânicos, entre eles os carboidratos (Fogg *et al.*, 1965; Fogg 1966; Fogg, 1996; Fogg, 1971 apud Vieira & Myklestad, 1986). Em geral, os maiores valores de carboidratos extracelulares são encontrados durante a fase estacionária de crescimento e taxas de excreção de até 50% nesta fase já foram encontradas (Vieira & Myklestad, 1986). Isto indica que as células usadas para inóculo estavam em fase estacionária de crescimento e conforme retomaram o crescimento exponencial a excreção de carboidratos diminuiu.

CEPA CYP 011K (*Cylindrospermopsis raciborskii*)

A figura 4.7 mostra a variação da concentração de carboidratos intracelulares (a) e extracelulares (b) em 10^6 células durante o cultivo da cepa CYP 011K (*C. raciborskii*). Pelo teste t as comparações entre as médias da produção de carboidratos intracelulares mostraram diferenças significativas no 6º e 9º dia entre as culturas mantidas a 40 e 100 e entre 60 e 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. A análise de variância (ANOVA-KW) mostrou diferenças significativas entre as culturas somente no 6º dia de cultivo (tabela 4.10). A concentração de carboidratos extracelulares apresentou diferenças significativas no 6º dia para todas as comparações (tabela 4.10).

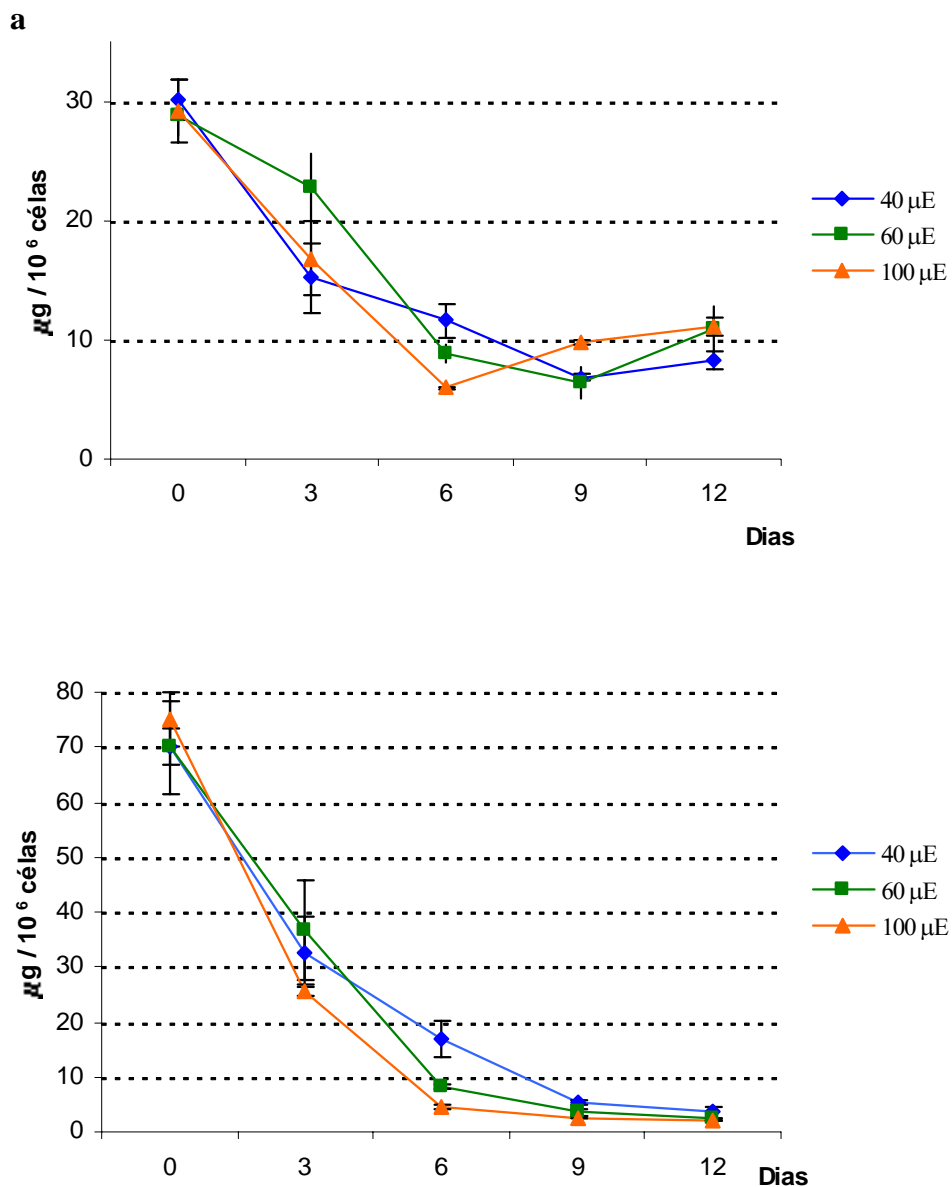


Figura 4.7 – Variação na concentração de carboidratos intracelulares (a) e extracelulares (b) em 10^6 células de *C. raciborskii* (cepa NPJB-1). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela 4.10 - Análise estatística da variação de carboidratos intracelulares em 10^6 células de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K); $n=3$, $\alpha=0,05$. Em destaque valores de $p<0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40 x 60	0	0,1437	Teste t
	3	0,0593	
	6	0,1006	
	9	0,8578	
	12	0,1096	
40 x 100	0	0,2161	Teste t
	3	0,4399	
	6	0,0182	
	9	0,0005	
	12	0,1630	
60 x 100	0	0,9394	Teste t
	3	0,1408	
	6	0,0161	
	9	0,0063	
	12	0,8270	
40 x 60 x 100	0	0,4393	Teste KW
	3	0,1000	
	6	0,0036	
	9	0,0500	
	12	0,0500	

Tabela 4.11 - Análise estatística da variação de carboidratos extracelulares em 10^6 células de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K); $n=3$, $\alpha=0,05$. Em destaque valores de $p<0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40 x 60	0	0,9597	Teste t
	3	0,5780	
	6	0,0463	
	9	0,0636	
	12	0,0900	
40 x 100	0	0,4433	Teste t
	3	0,2020	
	6	0,0240	
	9	0,0636	
	12	0,0615	
60 x 100	0	0,2631	Teste t
	3	0,1030	
	6	0,0013	
	9	0,0597	
	12	0,0763	
40 x 60 x 100	0	0,5107	Teste KW
	3	0,0857	
	6	0,0059	
	9	0,0615	
	12	0,1030	

Os valores de carboidratos intracelulares foram maiores no início dos experimentos, com uma acentuada queda ao longo do cultivo. Esses resultados estão de acordo com Vieira & Myklestad (1986) no que concerne ao fato de que a variação na concentração de carboidratos tendem a diminuir durante o crescimento exponencial. Por outro lado, ao final do cultivo ocorreu um aumento no conteúdo destes carboidratos indicando o início da entrada das células em fase estacionária do crescimento celular (Kroomkamp, 1987).

Os maiores valores de carboidratos extracelulares foram observados no primeiro dia de cultivo em todas as condições testadas (Fig 4.7b), indicando que as células usadas para inóculo estavam em fase estacionária, já que há tendência de aumento na excreção de carboidratos nesta fase e, retomando o crescimento, esta excreção diminui (Vieira & Myklestad, 1986).

A cepa CYP 011K apresentou valores muito maiores no acúmulo e na excreção de carboidratos do que a cepa NPJB-1. Na cepa NPJB-1, os valores máximos destes carboidratos ficaram em torno de $1,5 \mu\text{g}/10^6$ células, ao final dos experimentos, enquanto que na cepa CYP 011K observou-se valores de até $30 \mu\text{g}/10^6$ células, no início dos experimentos. Logo, cerca de 95% maior no segundo caso. O mesmo foi encontrado para os carboidratos extracelulares, que apresentaram cerca de 94% a mais no início do cultivo na cepa CYP 011K do que na cepa NPJB-1, ao fim dos experimentos.

A metodologia adotada (filtração) para separação do conteúdo intra e extracelular pode ter sido agressiva provocando lise e conseqüentemente liberação do conteúdo celular. No entanto, os resultados não permitem que se faça essa inferência, já que estaríamos justificando exclusivamente os maiores valores na excreção pela cepa CYP 011K e não as diferenças entre as duas cepas estudadas. Porém, neste aspecto da fisiologia de cianobactérias não encontramos nenhuma indicação na literatura que pudesse esclarecer estas diferenças.

4.4 – PRODUÇÃO DE MICROCISTINA-LR PELA CEPA NPJB-1 (*Microcystis aeruginosa*)

A análise cromatográfica por técnica de HPLC revelou a presença de um pico com tempo de retenção em torno de 4 minutos, em todas as amostras de fração particulada, correspondente ao padrão de microcistina-LR, de acordo com a comparação com o espectro de absorção de um padrão comercial desta toxina (padrão comercial Sigma-aldrich; Figuras 4.8, 4.9 e 4.10). Não foi detectada a presença de microcistina-LR nas amostras de fração dissolvida pela metodologia empregada.

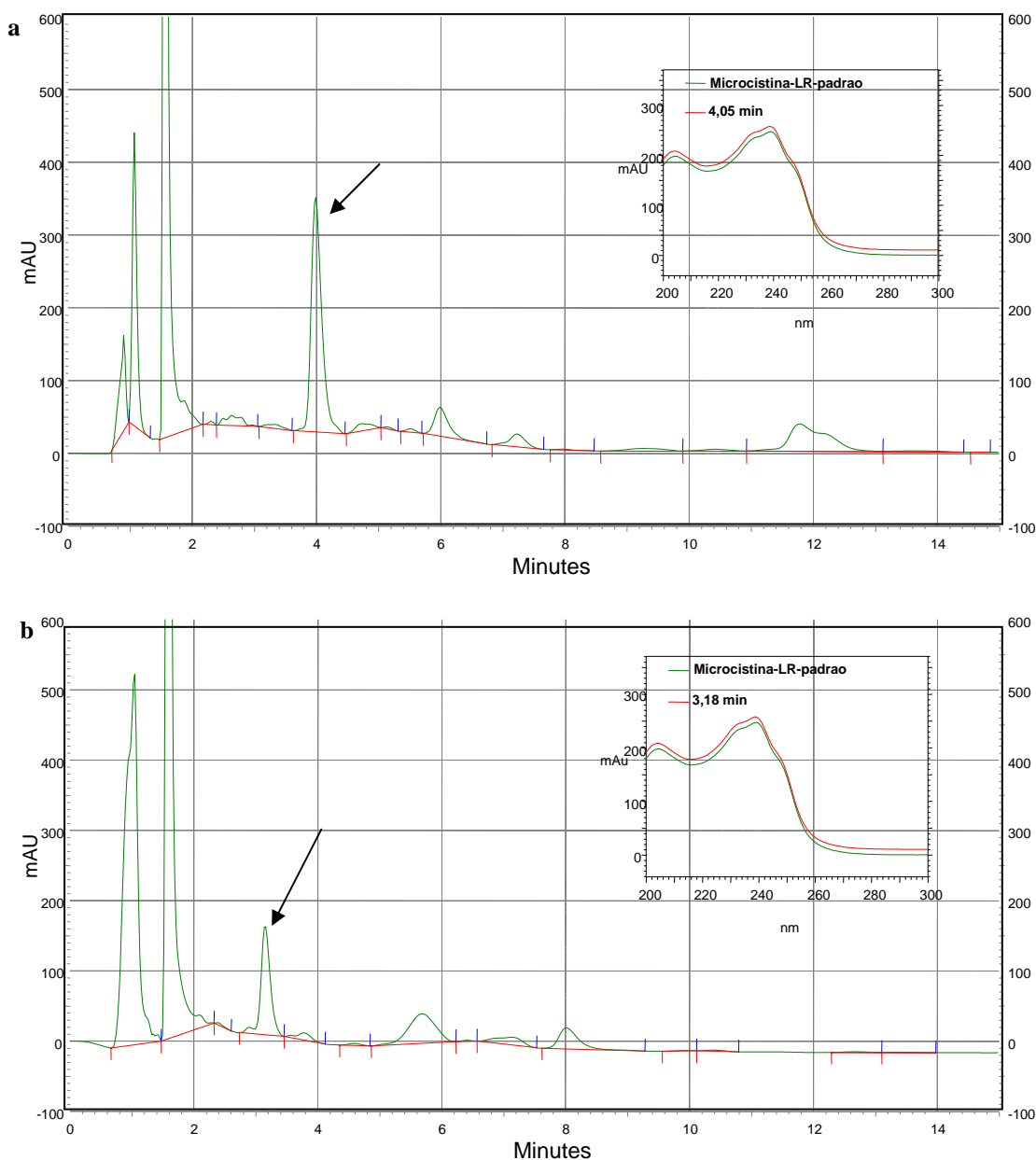


Figura 4.8 – Cromatogramas da fração metanol 100% da cepa NPJB-1 (*M. aeruginosa*) em coluna analítica, por técnicas de HPLC. Culturas mantidas a $40 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. a: 7 dias de cultivo; b: 11 dias de cultivo. As setas indicam os picos correspondentes a microcistina-LR, com espectros de absorção semelhante ao padrão comercial da microcistina-LR.

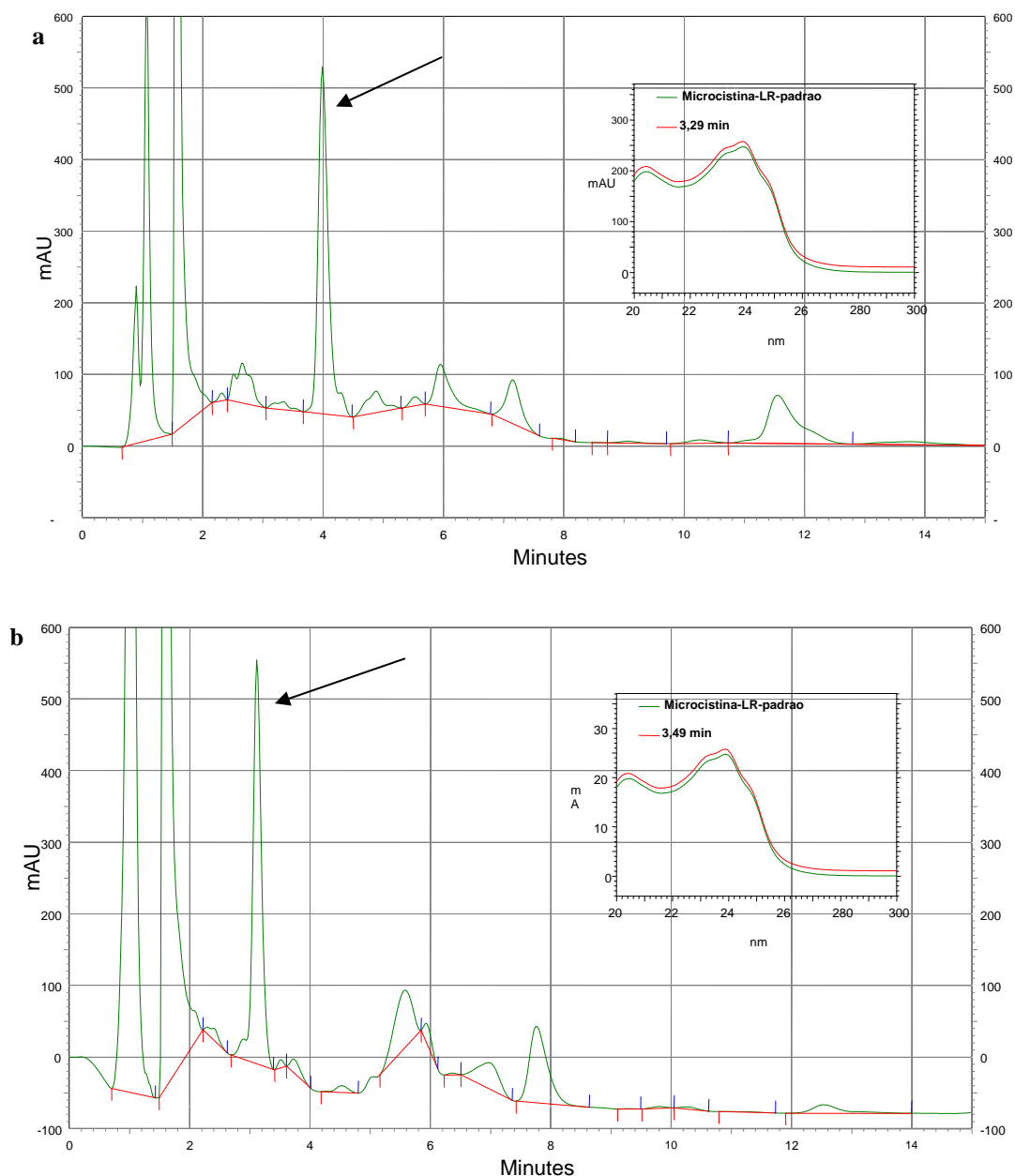


Figura 4.9 – Cromatogramas da fração metanol 100% da cepa NPJB-1 (*M. aeruginosa*) em coluna analítica, por técnicas de HPLC. Culturas mantidas a $100\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. a: 5 dias de cultivo; b: 11 dias de cultivo. As setas indicam os picos correspondentes a microcistina-LR, com espectros de absor\u00e7\u00e3o semelhante ao padr\u00e3o comercial da microcistina-LR.

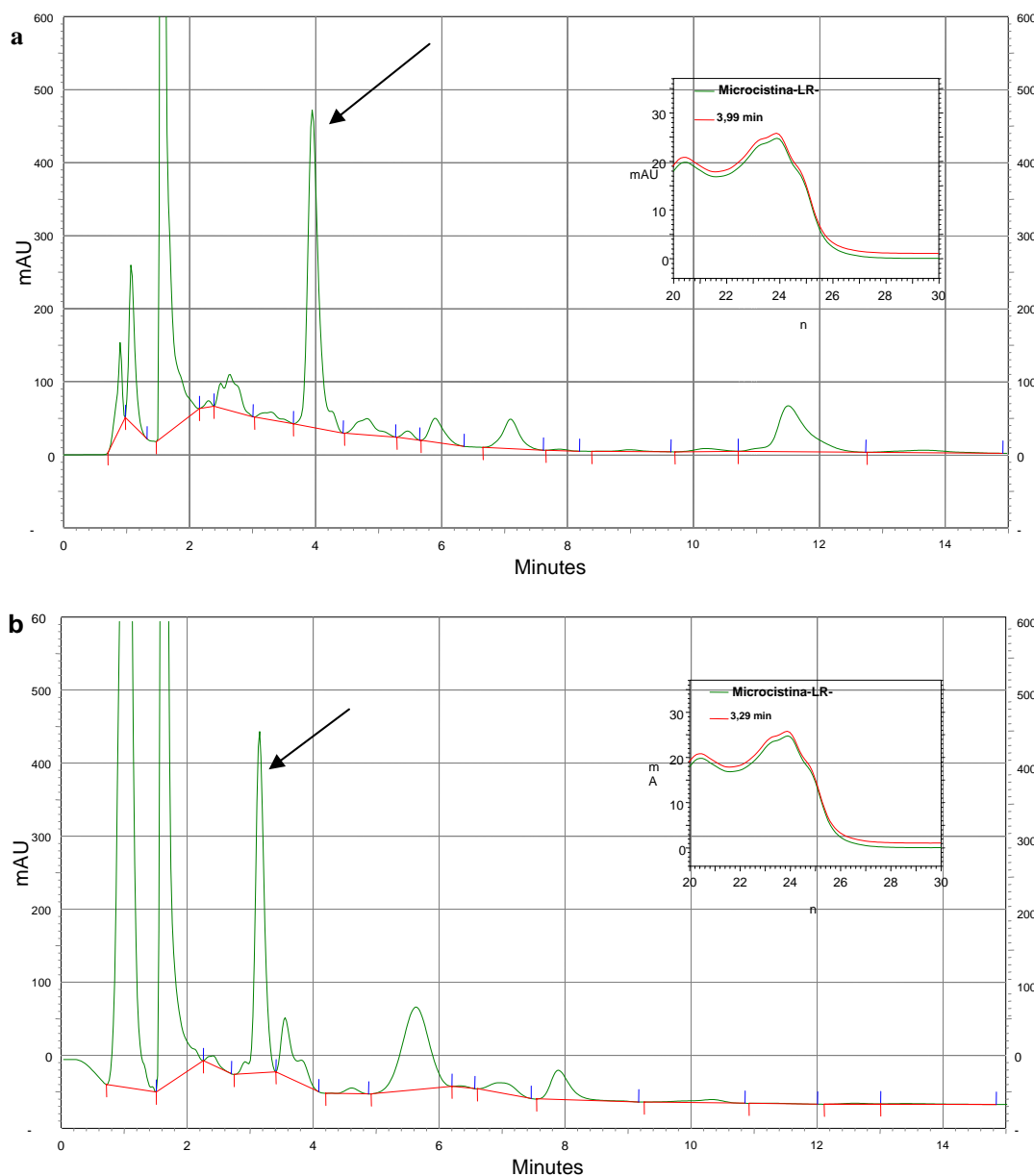


Figura 4.10 – Cromatogramas da fração metanol 100% da cepa NPJB-1 (*M. aeruginosa*) em coluna analítica, por técnicas de HPLC. Culturas mantidas a $200 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. a: 5 dias de cultivo; b: 11 dias de cultivo. As setas indicam os picos correspondentes a microcistina-LR, com espectros de absorção semelhante ao padrão comercial da microcistina-LR.

Na figura 4.11 é demonstrada a variação na concentração de microcistina-LR em 10^6 células. Comparações entre as médias desta produção (teste t), entre os dois tempos amostrais, revelaram que tanto as culturas mantidas 100, como as mantidas a 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ diferenciaram sua concentração de microcistina-LR, com maiores valores encontrados no 5º dia de cultivo (tabela 4.10).

Num mesmo tempo amostral, as diferenças foram significativas somente entre as culturas mantidas a 40 e 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, no meio da fase exponencial de crescimento. Também neste tempo, a análise de variância (ANOVA - KW) revelou diferenças significativas entre as culturas (tabela 4.10).

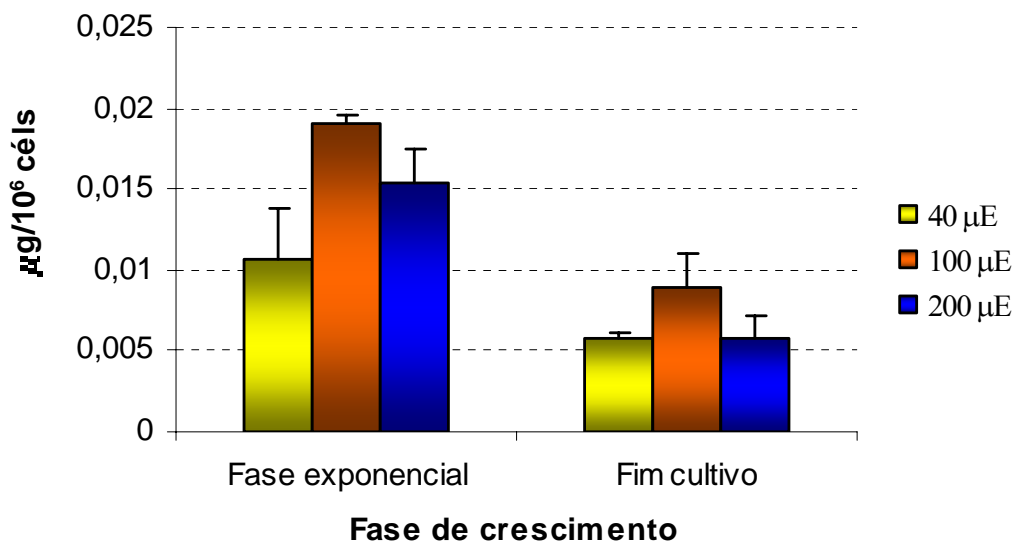


Figura 4.11 – Variação na concentração de microcistina-LR, em 10^6 células de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1). Fase exponencial de crescimento (sétimo dia nas culturas mantidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$; quinto dia nas culturas mantidas a 100 e 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$). Fim do cultivo (décimo primeiro dia para todas as culturas). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias ($n=3$). Coeficientes de variação entre as triplicatas (CV): meio da fase exponencial de crescimento, $CV_{40\mu\text{E}}= 30,7\%$, $CV_{100\mu\text{E}}=2,6\%$, $CV_{200\mu\text{E}}=12,5\%$; fim do cultivo, $CV_{40\mu\text{E}}= 5,1\%$, $CV_{100\mu\text{E}}=22,6\%$, $CV_{200\mu\text{E}}=25,7\%$.

Tabela 4.10 - Análise estatística da variação na produção de microcistina-LR em 10^6 células de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1); $n=3$, $\alpha=0,05$. Em destaque valores de $P<0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40	Fase LOG x Fim cultivo	0,1675	Teste t
100	Fase LOG x Fim cultivo	0,0128	Teste t
200	Fase LOG x Fim cultivo	0,0111	Teste t
40 X100	Fase LOG	0,0410	Teste t
40 X 200	Fase LOG	0,1364	Teste t
100 X 200	Fase LOG	0,0559	Teste t
40 X100	Fim cultivo	0,2891	Teste t
40 X 200	Fim cultivo	0,6147	Teste t
100 X 200	Fim cultivo	0,4557	Teste t
40 x 100 x 200	Fase LOG	0,0107	Teste KW
40 x 100 x 200	Fim cultivo	0,7214	Teste KW

*Fase exponencial de crescimento (sétimo dia nas culturas mantidas a $40 \mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; quinto dia nas culturas mantidas a 100 e $200 \mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Fim cultivo (décimo primeiro dia).

Na figura 4.12 encontra-se a variação na concentração de microcistina-LR por peso seco celular. Comparações das médias desta produção (teste t), entre os dois tempos amostrais, apresentaram diferenças significativas somente nas culturas submetidas a $100 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, no 5^o dia de cultivo (tabela 4.11).

Num mesmo tempo amostral, as diferenças foram significativas somente entre as culturas mantidas a 40 e 100 e entre 100 e 200 $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, no meio da fase exponencial de crescimento. Também neste tempo, a análise de vari\u00e2ncia (ANOVA - KW) revelou diferen\u00e7as significativas entre as culturas. (tabela 4.11).

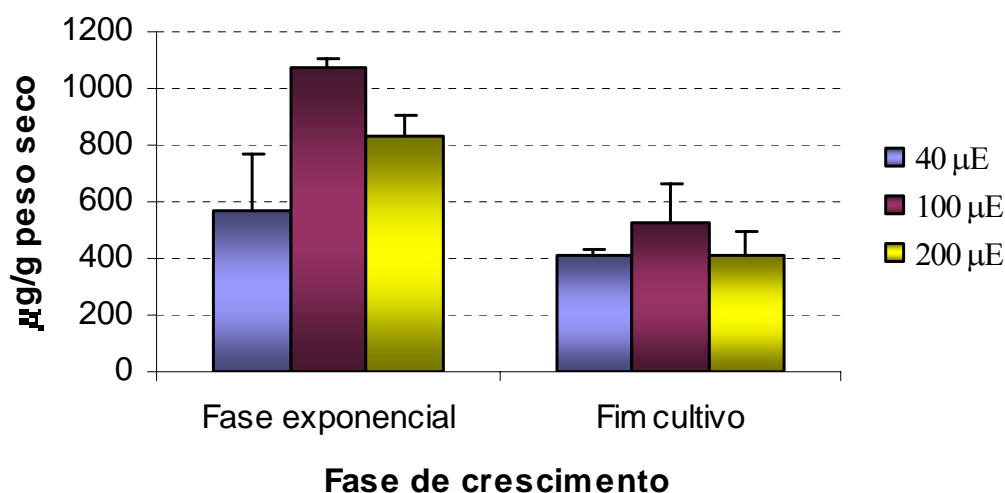


Figura 4.12 – Variação na concentração de microcistina-LR por peso seco de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1). Fase exponencial de crescimento (sétimo dia nas culturas mantidas a $40 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; quinto dia nas culturas mantidas a 100 e 200 $\mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Fim do cultivo (décimo primeiro dia para todas as culturas). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Coeficientes de variação entre as triplicatas (CV): meio da fase exponencial de crescimento, $CV_{40\mu\text{E}}= 34,6\%$, $CV_{100\mu\text{E}}=2,2\%$, $CV_{200\mu\text{E}}=9,1\%$; fim do cultivo, $CV_{40\mu\text{E}}= 4,7\%$, $CV_{100\mu\text{E}}=25,2\%$, $CV_{200\mu\text{E}}=20,8\%$.

Tabela 4.11 - Análise estatística da variação na produção de microcistina-LR por peso seco de *M. aeruginosa* (cepa NPJB-1); n=3, $\alpha = 0,05$. Em destaque valores de $P < 0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40	Fase LOG x Fim cultivo	0,2948	Teste t
100	Fase LOG x Fim cultivo	0,0200	Teste t
200	Fase LOG x Fim cultivo	0,0800	Teste t
40X100	Fase LOG	0,0482	Teste t
40X200	Fase LOG	0,1697	Teste t
100X200	Fase LOG	0,0323	Teste t
Teste t 40X100	Fim cultivo	0,2618	Teste t
40X200	Fim cultivo	0,9616	Teste t
100X200	Fim cultivo	0,2892	Teste t
40 x 100 x 200	Fase LOG	0,0036	Teste KW
40 x 100 x 200	Fim cultivo	0,3821	Teste KW

* Fase exponencial de crescimento (sétimo dia nas culturas mantidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; quinto dia nas culturas mantidas a 100 e 200 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Fim do cultivo (décimo primeiro dia).

Os maiores valores na produção de microcistina-LR corresponderam às culturas submetidas a 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, no meio da fase exponencial de crescimento (5^o dia para estas culturas), tanto em 10^6 células como em termos de toxina por peso seco (Figs. 4.11 e 4.12, respectivamente). Alguns autores destacaram os efeitos de diferentes intensidades luminosas sobre a produção de microcistinas.

Dentre eles, Watanabe & Oishi (1985) mostraram, em bioensaios com camundongos, um aumento na toxicidade de *M. aeruginosa* M228, quando culturas mantidas a 7,5 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ foram submetidas a intensidades de 30 e 75 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Westhuizen & Eloff (1985), que trabalharam com intensidades variando de 21 a 215 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ e Codd & Poon (1988), com intensidades de 5 a 50 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, também relataram resultados semelhantes. Nestes relatos, as maiores intensidades luminosas aumentariam a síntese de microcistinas.

Em contraponto, Molica (1996) encontrou para *M. aeruginosa* (NPLJ-4) uma relação inversa entre a produção de microcistinas e a intensidade luminosa. Tanto culturas submetidas a intensidades luminosas de 180 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, como culturas que sofreram mudanças de 40 para 180 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, apresentaram menores valores na síntese desta toxina. Sivonen (1990) encontrou maiores valores nas produções de microcistinas por peso seco, em 2 espécies de *Oscillatoria*, em intensidades luminosas menores (entre 12 e 24 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), se comparada à maior intensidade testada (50 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$). Nossos resultados demonstram que os maiores valores na produção de microcistina-LR em 10^6 células corresponderam as culturas submetidas a 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (Fig. 4.11) não tendo relação direta ou inversa com a intensidade luminosa na cepa NPJB-1.

Há algum tempo a relação entre o conteúdo de microcistinas e a idade do cultivo (fase de crescimento das culturas) foi descrita. Sabe-se que a síntese destas toxinas é maior ao final da fase exponencial de crescimento e decai rapidamente com a entrada das culturas em fase estacionária (Watanabe *et al.*, 1989). Nossos resultados demonstram que os valores de microcistinas em 10^6 células, e por peso seco, decaíram ao final do experimento, concordando com a início da fase estacionária de desenvolvimento, observada pelas demais variáveis analisadas

Orr & Jones (1998) realizaram uma revisão de uma série de trabalhos relacionando fatores distintos (temperatura, irradiância, concentração de nutrientes, entre outros) que causam efeitos diversos na produção de microcistinas. Estes autores apontam para a divisão celular (crescimento) como um dos fatores que afetam o conteúdo de microcistinas. Seus resultados, a partir de experimentos com variações na concentração de nitrogênio no meio de cultura, demonstraram que a síntese de microcistina, por mililitro de cultura de *M. aeruginosa* (MASHO1-A19), aumentou durante a fase exponencial e permaneceu constante na fase estacionária de crescimento em todas as condições testadas. Dessa forma, o aumento no conteúdo de microcistina coincidiu com o aumento do número de células, ou seja, existiria uma relação direta entre crescimento e conteúdo de microcistina. Apesar de não termos trabalho com variações na concentração de nutrientes no meio, e termos apenas dois tempos amostrais, podemos chamar a atenção para o fato de que as culturas da cepa NPJB-1, submetidas às diferentes intensidades luminosas, apresentaram comportamento semelhante, já que a síntese de microcistina-LR em 10^6 células e por peso seco foi maior no meio da fase exponencial de crescimento.

Outros estudos demonstraram as relações entre o conteúdo de clorofila a e a síntese de microcistinas por cianobactérias. Watanabe & Oishi (1985), Westhuizen &

Ellof (1985) e Utkilen & Gjølme (1992) relataram que sob baixas intensidades luminosas (menores que $30 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ocorre uma diminui\u00e7\u00e3o na concentra\u00e7\u00e3o de microcistinas com concomitante aumento na concentra\u00e7\u00e3o de clorofila a. Molica (1996) estabeleceu uma rela\u00e7\u00e3o direta entre a s\u00edntese de clorofila a e de microcistinas.

Em nosso estudo notamos que houve um aumento no conte\u00fado de clorofila a por c\u00e9lulas, durante o in\u00edcio do experimento com uma posterior queda com a entrada das culturas em fase estacion\u00e1ria (Fig. 4.4). O conte\u00fado de microcistina-LR por c\u00e9lulas tamb\u00e9m foi maior na fase exponencial de crescimento e diminuiu ao final do experimento (fase estacion\u00e1ria). Portanto, uma rela\u00e7\u00e3o direta entre o conte\u00fado de clorofila a e s\u00edntese de microcistina-LR, tamb\u00e9m foi observado. Por\u00e9m, os diferentes tratamentos parecem n\u00e3o ter exercido influ\u00eancia nessa rela\u00e7\u00e3o, uma vez que o conte\u00fado de clorofila a nas culturas praticamente n\u00e3o se diferenciaram.

Utkilen & Gjølme (1992) relatam que um aumento no ac\u00famulo de carboidratos leva a um aumento no peso seco das c\u00e9lulas, o que reduziria essa rela\u00e7\u00e3o (microcistina-LR/peso seco), em culturas submetidas a altas intensidades luminosas. Molica (1996) n\u00e3o encontrou uma rela\u00e7\u00e3o entre a redu\u00e7\u00e3o na raz\u00e3o microcistinas / peso seco e maior produ\u00e7\u00e3o de carboidratos, em culturas mantidas sob altas intensidades luminosas.

Em nosso estudo encontramos maiores valores na rela\u00e7\u00e3o microcistina-LR por peso seco, nas culturas em fase exponencial de crescimento (Fig. 4.12). Ao final dos cultivos percebemos que realmente houve uma tend\u00eancia \u00e0 um aumento na produ\u00e7\u00e3o de carboidratos (Fig. 4.6) corroborando o fato de um aumento no conte\u00fado de carboidratos gerar uma diminui\u00e7\u00e3o na rela\u00e7\u00e3o microcistina-LR / peso seco (Fig. 4.12).

Por outro lado, os maiores valores no acúmulo de carboidratos ocorreram durante a fase exponencial de crescimento (Fig 4.6a). Neste tempo, ocorreu a maior síntese de microcistina-LR (em 10^6 células e por peso seco). Porém, na fase estacionária o acúmulo de carboidratos coincidiu com uma diminuição na síntese de microcistina-LR por peso seco nas culturas da cepa NPJB-1(Fig. 4.12). Logo existe uma separação temporal. Se por um lado o acúmulo de carboidratos, durante o crescimento exponencial coincidiu com o aumento na síntese de microcistina-LR (relação direta), ao final do cultivo esta relação foi inversa. Não foi possível observar uma diferenciação entre esta relação e o os tratamentos adotados (diferentes intensidades luminosas).

4.5 – PRODUÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA PELA CEPA CYP 011K (*Cylindrospermopsis raciborskii*)

A análise cromatográfica por técnica de HPLC revelou a presença de um pico, com tempo de retenção em torno de 7 minutos, em todas as amostras de fração particulada, correspondente ao padrão de cilindropermopsina de acordo com a comparação com o espectro de absorção de um padrão certificado desta toxina (padrão gentilmente fornecido pelo Dr. Wayne W. Carmichael - Department of Biological Sciences, Wright State University, Dayton, OH, USA; Figura 4.13, 4.14 e 4.15). Não foi detectada a presença de cilindropermopsina nas amostras de fração dissolvida pela metodologia empregada.

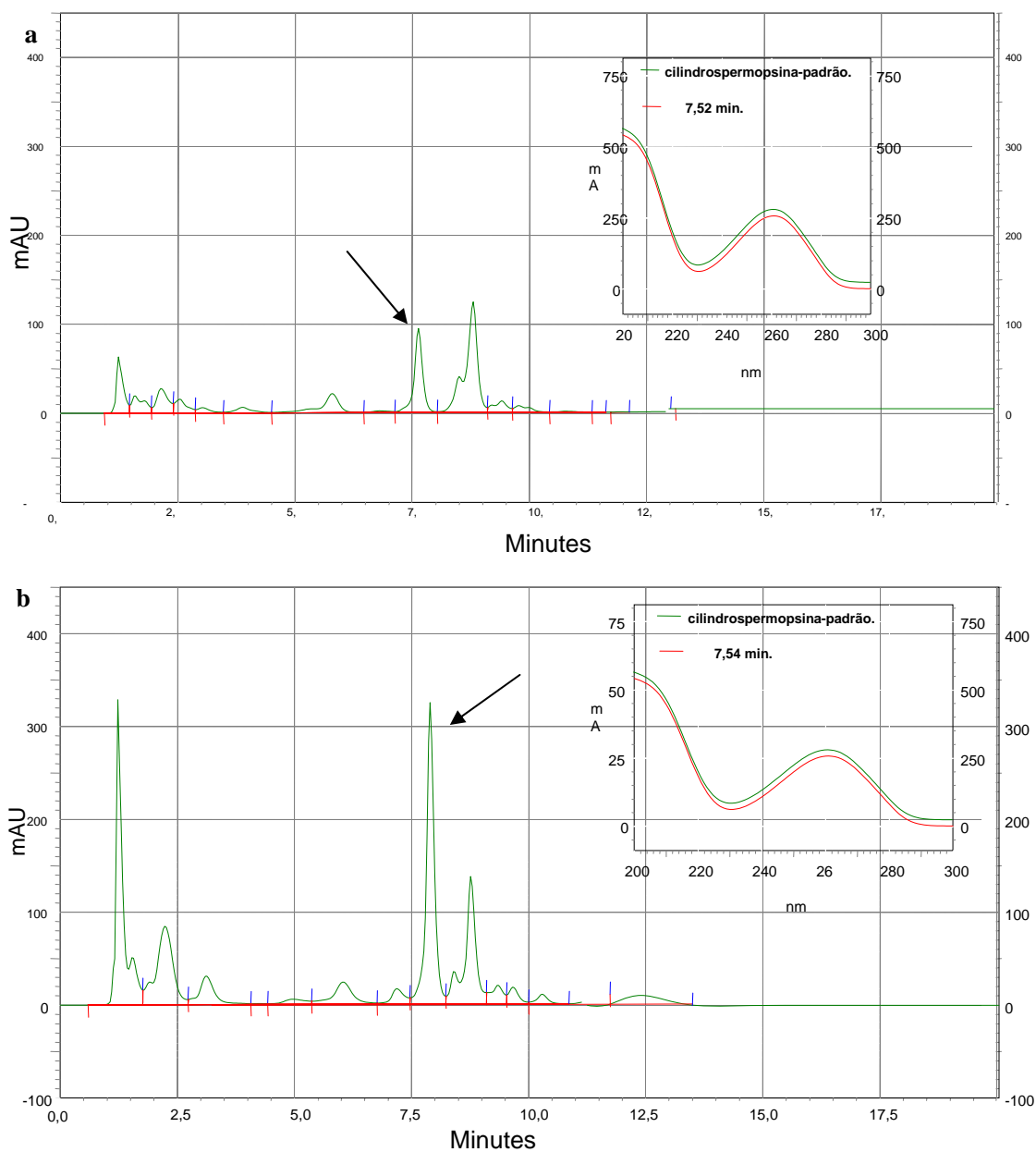


Figura 4.13 – Cromatogramas da fração aquosa da cepa CYP 011K (*C. raciborskii*) em coluna analítica, por técnicas de HPLC. Culturas mantidas a $40 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. a: 7 dias de cultivo; b: 12 dias de cultivo. As setas indicam os picos correspondentes a cilindropermopsina, com espectros de absorção igual ao padrão cedido pelo Dr. Wayne. W. Carmichael.

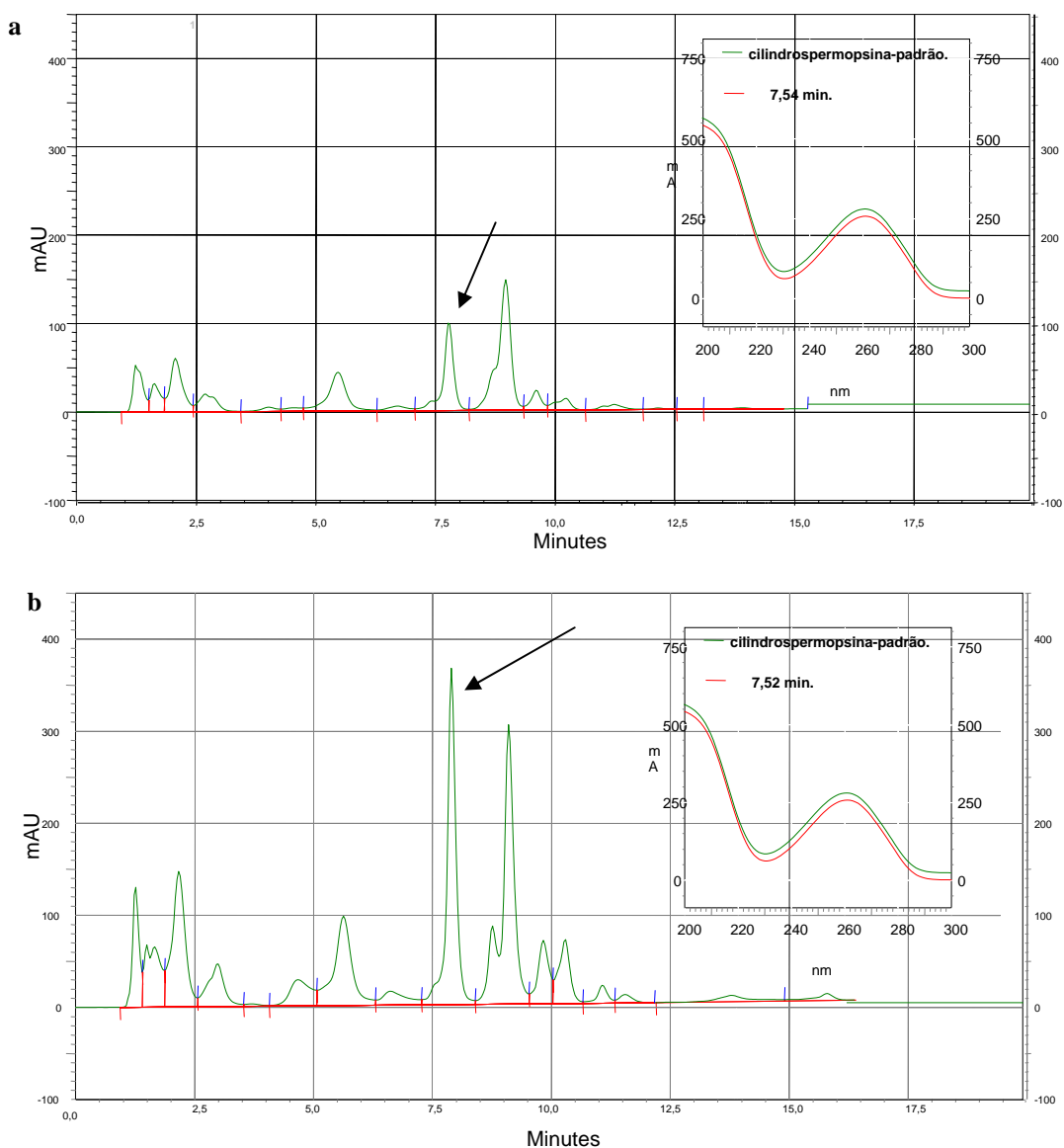


Figura 4.14 – Cromatogramas da fração aquosa da cepa CYP 011K (*C. raciborskii*) em coluna analítica, por técnicas de HPLC. Culturas mantidas a $60 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. a: 7 dias de cultivo; b: 12 dias de cultivo. As setas indicam os picos correspondentes a cilindropermopsina, com espectros de absorção igual ao padrão cedido pelo Dr. Wayne. W. Carmichael.

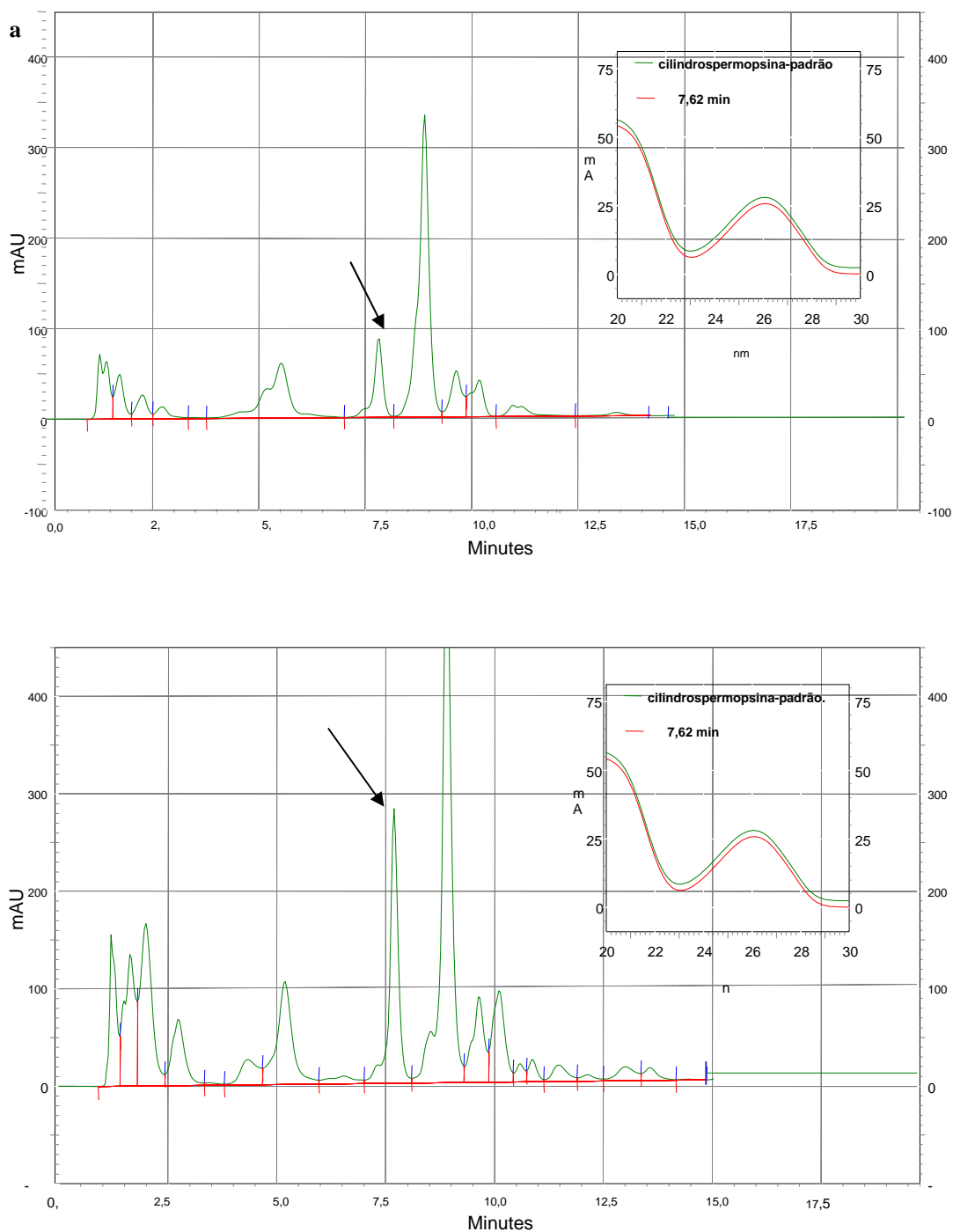


Figura 4.15 – Cromatogramas da fração aquosa da cepa CYP 011K (*C. raciborskii*) em coluna analítica, por técnicas de HPLC. Culturas mantidas a $60 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. a: 7 dias de cultivo; b: 12 dias de cultivo. As setas indicam os picos correspondentes a cilindrospermopsina, com espectros de absor\u00e7\u00e3o igual ao padr\u00e3o cedido pelo Dr. Wayne. W. Carmichael.

A figura 4.16 mostra a variação na concentração de cilindrospermopsina em 10^6 células. Não ocorreram diferenças significativas quando se comparou as médias da produção desta toxina em 10^6 células, entre as condições testadas, nem entre os diferentes tempos de amostragem (tabela 4.13).

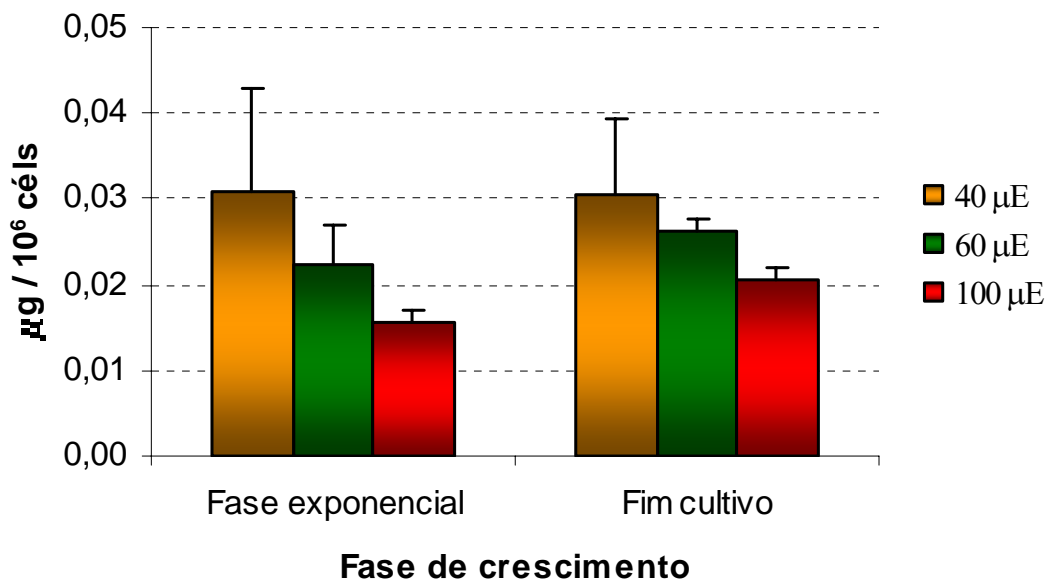


Figura 4.16 – Variação na concentração total de cilindrospermopsina em 10^6 células de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K). Fase exponencial de crescimento = sétimo dia. Fim do cultivo = décimo segundo dia. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias ($n=3$). Coeficientes de variação entre as triplicatas (CV): meio da fase exponencial de crescimento, $CV_{40\mu E}=39,9\%$, $CV_{60\mu E}=21,8\%$, $CV_{100\mu E}=9,7\%$; fim do cultivo, $CV_{40\mu E}=27,8\%$, $CV_{60\mu E}=5,5\%$, $CV_{100\mu E}=6,9\%$.

Tabela 4.13 - Análise estatística da variação na produção de cilindrospermopsina em 10^6 células de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K); n=3, $\alpha=0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40	Fase LOG x Fim cultivo	0,9904	Teste t
60	Fase LOG x Fim cultivo	0,3050	Teste t
100	Fase LOG x Fim cultivo	0,0575	Teste t
40 x 60	Fase LOG	0,7607	Teste t
40 x 100	Fase LOG	0,2296	Teste t
60 x 100	Fase LOG	0,3246	Teste t
40 x 60	Fim cultivo	0,5173	Teste t
40 x 100	Fim cultivo	0,5003	Teste t
60 x 100	Fim cultivo	0,9115	Teste t
40 x 60 x 100	Fase LOG	0,1321	Teste KW
40 x 100 x 200	Fim cultivo	0,0714	Teste KW

* Fase exponencial de crescimento (sétimo dia). Fim do cultivo (décimo segundo dia).

Os maiores valores na produção de cilindrospermopsina pela cepa CYP 011K corresponderam às culturas submetidas a $40 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nos dois tempos amostrais. As culturas apresentaram uma tendência à diminuição na síntese de cilindrospermopsina com o aumento da intensidade luminosa e mantiveram valores parecidos entre o meio da fase exponencial de crescimento e a estacionária.

A ocorrência de florações de *Cylindrospermopsis raciborskii*, em diferentes regiões brasileiras, tem aumentado na última década (Bouvy *et al.*, 1999; Branco & Senna, 1994; Huszar *et al.*, 2000; Jardim *et al.*, 1999; K\u00f3mark\u00f3va *et al.*, 1999). Das cepas de *C. raciborskii*, at\u00e9 agora isoladas no Brasil, ainda n\u00e3o foi identificada alguma que apresentasse a produ\u00e7\u00e3o de cilindrospermopsina. Por\u00e9m, chama aten\u00e7\u00e3o o fato desta toxina j\u00e1 ter sido detectada no carv\u00e3o ativado da clinica de di\u00e1lise, envolvida com a trag\u00e9dia de Caruaru (Carmichael *et al.*, 2001).

A figura 4.17 mostra a varia\u00e7\u00e3o na concentra\u00e7\u00e3o de cilindrospermopsina por peso seco celular. N\u00e3o ocorreram diferen\u00e7as significativas, quando se comparou as m\u00e9dias da produ\u00e7\u00e3o desta toxina entre as condi\u00e7\u00f5es testadas, nem entre os diferentes tempos de amostragem (tabela 4.14).

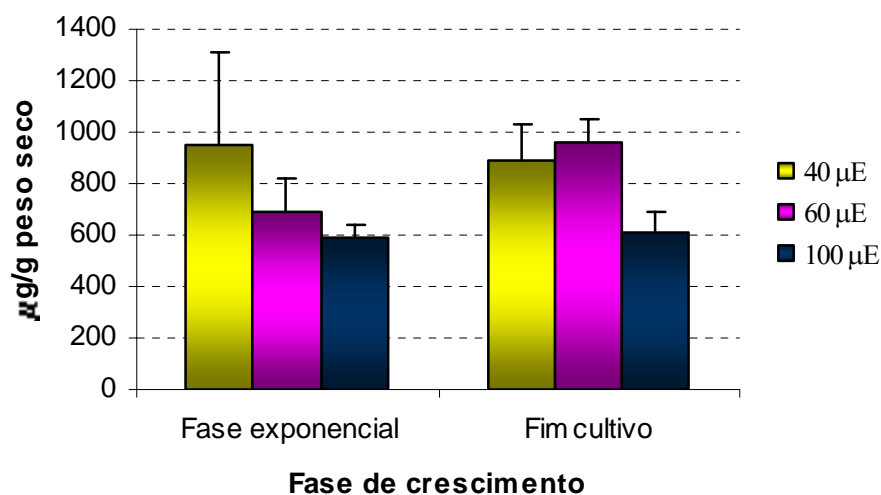


Figura 4.17 – Variação na concentração de cilindrospermopsina por peso seco de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K). Fase exponencial de crescimento = sétimo dia. Fim do cultivo = décimo segundo dia. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Coeficientes de variação entre as triplicatas (CV): meio da fase exponencial de crescimento, $CV_{40\mu\text{E}} = 38,4\%$, $CV_{60\mu\text{E}} = 19,5\%$, $CV_{100\mu\text{E}} = 8,8\%$; fim do cultivo, $CV_{40\mu\text{E}} = 16,7\%$, $CV_{60\mu\text{E}} = 9,5\%$, $CV_{100\mu\text{E}} = 13,4\%$.

Tabela 4.14 - Análise estatística da variação na produção de cilindrospermopsina por peso seco de *C. raciborskii* (cepa CYP 011K); n=3, $\alpha=0,05$.

INTENSIDADE LUMINOSA ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	DIA	VALOR DE P	TESTE REALIZADO
40	Fase LOG x Fim cultivo	0,8093	Teste t
100	Fase LOG x Fim cultivo	0,0643	Teste t
200	Fase LOG x Fim cultivo	0,7340	Teste t
40 x 60	Fase LOG	0,3628	Teste t
40 x 100	Fase LOG	0,2295	Teste t
60 x 100	Fase LOG	0,3465	Teste t
40 x 60	Fim cultivo	0,5445	Teste t
40 x 100	Fim cultivo	0,0638	Teste t
60 x 100	Fim cultivo	0,0559	Teste t
40 x 100 x 200	Fase LOG	0,3821	Teste KW
40 x 100 x 200	Fim cultivo	0,0500	Teste KW

* Fase exponencial de crescimento (sétimo dia). Fim do cultivo (décimo segundo dia).

Culturas de *C. raciborskii* apresentaram comportamentos distintos na síntese de cilindrospermopsina em relação a concentração de nitrogênio ou temperatura (Saker *et al.*, 1999; Hawkins *et al.*, 2001; Saker & Griffiths, 2000). Saker (2000 *apud* Saker & Griffiths, 2000) relataram a produção de cilindrospermopsina, por células e por peso seco, em culturas de *C. raciborskii*, crescendo entre 50 e 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, com maiores valores desta toxina ocorrendo em culturas submetidas às maiores intensidades luminosas testadas. No entanto, nossos resultados mostraram que a síntese de cilindrospermopsina em 10^6 células foi maior na menor intensidade luminosa, nos dois tempos amostrais (Fig. 4.16). Na relação cilindrospermopsina por peso seco, o maior valor ocorreu em 60 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, ao final do experimento (fig. 4.17).

Deve-se levar em conta que os valores encontrados para médias na produção de cilindrospermopsina em 10^6 células e para relação cilindrospermopsina por peso seco, não apresentaram valores estatísticos que as diferenciassem ($p > 0,05$; tabela 4.14). Por tanto, não podemos afirmar com certeza que as culturas da cepa CYP 011K tiveram uma relação inversa com a intensidade luminosa. Pelos mesmos motivos, podemos dizer ainda, que parece não haver uma relação entre a concentração de clorofila a e a concentração de carboidratos com a síntese de cilindrospermopsina sob os diferentes tratamentos.

4.6 – MELHOR CONDIÇÃO DE CULTIVO DA CEPA NPJB-1 (*Microcystis aeruginosa*) PARA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE MICROCISTINA-LR

Como visto, no item 4.4, vários fatores fisiológicos podem afetar a produção de microcistinas ao longo dos cultivos de cepas produtoras desta cianotoxina. Os resultados dos nossos estudos fisiológicos indicaram como melhor condição de cultivo para cepa NPJB-1 (*M. aeruginosa*) a intensidade luminosa de 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, objetivando a maior biosíntese para purificação de microcistina-LR.

Tabela 4. 15 – Valores de microcistina-LR por litro de cultura de *M. aeruginosa* (NPJB-1).

Intensidade luminosa ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$)	Réplicas	Valores em $\mu\text{g.L}^{-1}$	
		Meio fase log	Fim do cultivo
40	1	29,59	38,41
	2	46,40	35,38
	3	53,04	36,23
100	1	70,54	86,71
	2	68,42	148,86
	3	70,91	142,00
200	1	68,23	94,73
	2	65,50	142,09
	3	56,52	101,48

Após a avaliação da melhor condição fisiológica para o cultivo, os cálculos do volume de cultura que precisaríamos para produzir 500 μg da molécula purificada, na melhor condição de cultivo, foi tomados levando em conta os valores quantificados da toxina por litro de cultura, uma vez que os padrões comerciais de microcistina-LR geralmente contém 500 μg da toxina purificada. Como estamos trabalhando com produção é de se esperar que a escolha do melhor tempo de cultivo corresponda ao que dê maior valor na concentração de microcistina-LR por litro de cultura.

Em um mês teríamos a possibilidade de realizar dois cultivos, com onze dias de duração, o que remeteria a uma produção mensal de 297,72 μg de molécula purificada/L/mês. O restante do mês seria dedicado aos procedimentos de purificação da molécula.

Por outro lado, levam-se em conta os fatores adversos que podem ocorrer durante os cultivos, inclusive os fisiológicos, e o tempo de cultivo pode ser fundamental para uma boa produção. Como a tendência é uma diminuição na concentração de microcistina-LR por células ao final deste tempo (11 dias) e, como o risco de perda é maior (células em fase estacionária do desenvolvimento), pois pode ocorrer uma lise celular, levando a uma perda da toxina para o meio extracelular (meio que não pode ser aproveitado na purificação da molécula, pois aumenta o custo na extração e purificação), optamos por um tempo de cultivo de 5 dias de duração, o que coincide com a melhor condição fisiológica das células.

Com cinco dias, em 1 litro de cultura quantificamos a produção máxima de 70,91 μg de microcistina-LR (tabela 4.15). Teríamos que cultivar em torno de 7 litros de cultura para que tivéssemos 500 μg da toxina. Com esta condição (100 μmoles fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 5 dias de cultivo) poderíamos conseguir de 4 a 5 cultivos, com a produção de cerca de 273,68 a 342,1 μg de molécula purificada/L/mês, respectivamente. Logo, valores equivalentes aos cultivos com 11 dias de duração.

Tendo em vista esses fatos, para que a se procedesse a purificação de microcistina-LR um cultivo da cepa NPJB-1 foi realizado a partir de culturas pré-adaptadas à condição luminosa de 100 μmoles fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e o mesmo durou 5 dias. Após esse tempo, as culturas foram concentradas e liofilizadas. Procedeu-se a

extração e a eliminação de impurezas das amostras obtidas sendo estas purificadas por HPLC, conforme as metodologias já descritas.

Após a purificação, as amostras foram analisadas para quantificação e confirmação da presença de microcistina-LR, conforme a metodologia descrita no item 4.4.1. O resultado está expresso na figura 4.18. O fato de o pico correspondente a microcistina-LR presente na amostra purificada (Fig. 4.18a) apresentar o mesmo tempo de retenção que quando co-eluído com o padrão (Fig. 4.18b) demonstrou claramente que a molécula por nós purificada se tratava de microcistina-LR.

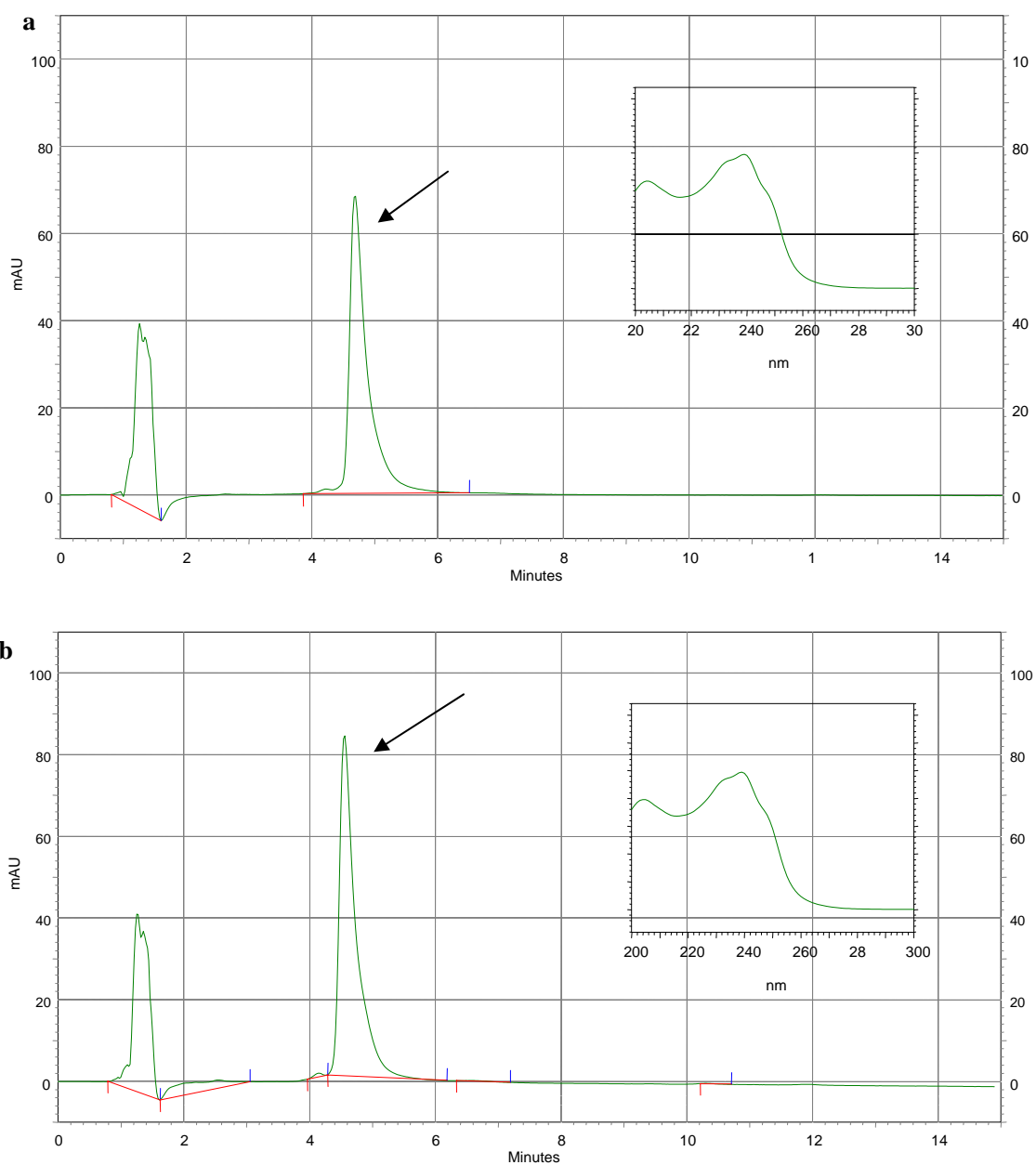


Figura 4.18 – Cromatogramas obtidos por HPLC, em coluna analítica, para confirmação da molécula de microcistina-LR. a: amostra considerada como microcistina-LR purificada; b: co-eluição de um padrão de microcistina-LR na amostra considerada como contendo a toxina purificada. Note o aumento na área do pico correspondente a 4,3 minutos na figura b.

Após quantificação da amostra contendo microcistina-LR (tabela 4.16), procedeu-se a secagem das amostras, tendo a produção de 2,89 mg de toxina purificada (tabela 4.17).

Tabela 4.16 – Valores obtidos na quantificação por HPLC das amostras purificadas de microcistina-LR (MCYST).

Injeção	Valor quantificado $\mu\text{g/mL}$	Média $\mu\text{g/mL}$	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)	Massa de MCYST quantificada na amostra (5 mL)
1	435,80	438,69	3,63	0,82	2193,47 μg
2	437,51				
3	442,77				

Tabela 4.17 – Valores obtidos com a secagem das amostras purificadas de microcistina-LR.

Peso do frasco utilizado para secar amostra contendo MCYST(mg)	Peso do frasco após acréscimo e secagem da solução contendo MCYST (mg)	Massa de MCYST			
		Peso (mg)	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
5179,57	5182,39	2,82	2,89	0,05	1,65
5179,47	5182,39	2,92			
5179,47	5182,40	2,93			
5179,57	5182,43	2,86			
5179,47	5182,39	2,92			

4.7 – MELHOR CONDIÇÃO DE CULTIVO DA CEPA CYP 011K (*Cylindrospermopsis raciborskii*) PARA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA

A tabela 4.18 mostra os valores de cilindrospermopsina por litro quantificados por HPLC a partir das amostras de fração particulada das culturas.

Tabela 4. 18 – Valores de cilindrospermopsina por litro de cultura de *C. raciborskii* (CYP 011K).

Intensidade luminosa ($\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Réplicas	Valores em $\mu\text{g.L}^{-1}$	
		Meio fase Log	Fim do cultivo
40	1	66,26	132,35
	2	68,22	101,99
	3	34,94	113,10
100	1	78,73	152,48
	2	55,90	163,00
	3	45,99	144,53
200	1	68,03	148,80
	2	64,82	164,75
	3	61,42	127,08

A maioria das rela es fisiol gicas (item 4.5) pareceram n o influenciar na produ o de cilindrospermopsina. Levamos em conta o fato apontado no item 4.1 (varia o no comprimento dos tricomas) para nos indicar a melhor condi o de cultivo da cepa CYP 011K para produ o e purifica o de cilindrospermopsina. Neste caso, a melhor condi o de cultivo escolhida foi de $40 \mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, por que as c lulas mostraram uma maior estabilidade durante o cultivo (n o houve tend ncia   fragmenta o dos tricomas), nos levando a acreditar que o risco de perda da toxina para a fra o dissolvida ficaria diminuído.

Como fizemos anteriormente para purifica o de microcistina-LR levamos em conta o maior valor de produ o conseguido na quantifica o de

cilindrospermospina por litro no tempo de 7 e 12 dias de cultivo, nas culturas mantidas a $40 \mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$.

Com 7 dias, em 1 litro de cultura, quantificamos a síntese de $68,22 \mu\text{g}$ de cilindrospermopsina (tabela 4.18), nesta condição de irradiância. Em um mês poderíamos realizar três cultivos com a produção de $204,00 \mu\text{g}$ de toxina purificada/L/mês. Ao final do cultivo, a maior síntese de cilindrospermopsina quantificada por litro foi de $132,35 \mu\text{g}$. Com este tempo (12 dias), teríamos a possibilidade de proceder dois cultivos, o que resultaria em $264,7 \mu\text{g}$ de toxina purificada/L/mês. Assim, com 12 dias o valor de produção é maior.

Considerando o volume de cultivo utilizado para purificação da toxina, notamos que com 7 dias de cultivo teríamos que cultivar cerca de 7 litros. Tentando eliminar as adversidades que podem ser ocasionadas pelos procedimentos de concentração, extração e eliminação de impurezas, deveríamos ter em torno de 28 litros de cultura. Com 12 dias de cultivo, teríamos que cultivar cerca de 3,8 litros, o que leva a um cultivo de cerca 15,2 litros (aproximado para 16 litros), um volume menor que agilizaria o processo de produção (menor volume a ser centrifugado).

Como já citado com 12 dias de cultivo as células estão em boas condições fisiológicas e por isso optamos por este tempo de cultivo como o melhor para a produção e purificação de cilindrospermopsina. Realizou-se então, um cultivo da cepa CYP 011K a partir de culturas pré-adaptadas à condição luminosa de $40 \mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ e o mesmo durou de 12 dias. Após esse tempo, as culturas foram concentradas e liofilizadas. Procedeu-se a extração e a eliminação de impurezas com as amostras obtidas sendo purificadas por HPLC, conforme as metodologias já descritas.

Após a purificação, as amostras foram analisadas para quantificação e confirmação da presença de cilindropermopsina, conforme a metodologia descrita no item 4.4.2. O resultado está expresso na figura 4.19. O fato de o pico correspondente a cilindropermopsina presente na amostra purificada (Fig. 4.19a) apresentar o mesmo tempo de retenção que quando co-eluído com o padrão (Fig. 4.19b) demonstrou claramente que a molécula por nós purificada se tratava de cilindropermopsina.

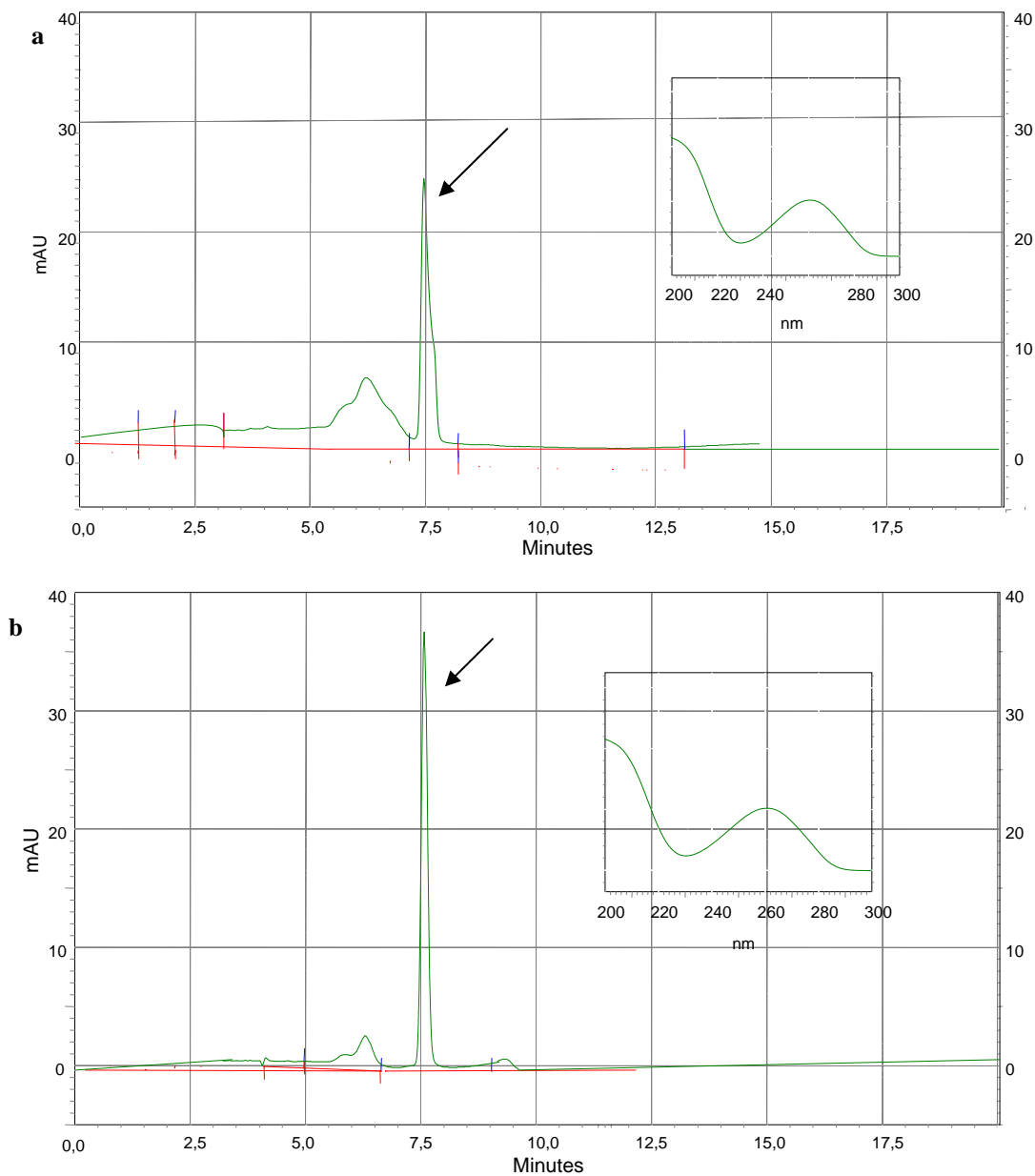


Figura 4.19 – Cromatogramas obtidos por HPLC, em coluna analítica, para confirmação da molécula de cilindrospermopsina. a: amostra considerada como cilindrospermopsina purificada; b: co-eluição de um padrão de cilindrospermopsina na mostra considerada como contendo a toxina purificada. Note o aumento na área do pico correspondente a 7,5 minutos na figura b.

Após quantificação da amostra contendo cilindrospermopsina (tabela 4.19), procedeu-se a secagem das amostras, tendo a produção de 2,056 mg de toxina purificada (tabela 4.20).

Tabela 4.19 – Valores obtidos na quantificação por HPLC das amostras purificadas de cilindrospermopsina (CYN).

Injeção	Valor quantificado $\mu\text{g/mL}$	Média $\mu\text{g/mL}$	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)	Massa de CYN quantificada na amostra (6,8 mL)
1	290,77	281,17	6,87	2,44	1915,679 μg
2	279,98				
3	274,17				
4	281,95				

Tabela 4.20 – Valores obtidos com a secagem das amostras purificadas de cilindrospermopsina.

Peso do frasco utilizado para secar amostra contendo CYN (mg)	Peso do frasco após acréscimo e secura da solução contendo CYN (mg)	Massa de CYN			
		Peso (mg)	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
4369,20	4371,29	2,09	2,056	0,02	1,065
4369,24	4371,29	2,05			
4369,24	4371,28	2,05			
4369,23	4371,29	2,06			
4369,24	4371,27	2,03			

4.8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo a portaria Nº 029 de 1995 do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO, “padrão é uma medida materializada, instrumento de medição, material de referência ou sistema de medição, material de referência ou sistema de medição destinada a definir, realizar, conservar ou reproduzir uma unidade ou mais valores de uma grandeza para servir como referência”. Essa portaria faz referência a 10 tipos de padrões.

Neste estudo conseguimos estabelecer um protocolo de cultivo onde se maximizou a produção de microcistina-LR e cilindrospermopsina para serem purificadas por HPLC. Para que essas moléculas purificadas venham a constituir um padrão nacional “devem ser reconhecidas numa decisão nacional para servir como base para outros padrões de grandeza a que se refere”, no caso, comparações entre os perfis de absorção no U.V. destas moléculas, utilizados para comparação com os perfis de absorção obtidos em uma amostra de água.

As moléculas purificadas neste estudo, segundo esta legislação, podem constituir um padrão de controle (tipo de padrão de trabalho) por que será utilizado para assegurar que as medições estão sendo executadas corretamente. Porém esta portaria não faz menções quanto aos processos para validação dessas moléculas como padrões nacionais.

Estas moléculas purificadas por HPLC poderão ser tratadas, portanto, como padrões de trabalho (“utilizados rotineiramente para calibrar ou controlar medidas materializadas, instrumentos de medição ou materiais de referência”, no nosso caso, os instrumentos de HPLC). Porém o uso futuro de técnicas como cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear,

poderão confirmar a determinação estrutural dessas cianotoxinas, bem como sua quantificação.

Acreditamos que com essas técnicas poderemos nos assegurar que as referidas moléculas tratam-se de microcistina-LR e cilindrospermopsina, tornando possível sua comercialização e utilização no âmbito nacional, para acompanhamento da qualidade da água.

5 – CONCLUSÕES

1 – As maiores taxas de crescimento e maior síntese de microcistina-LR em 10^6 células da cepa NPJB-1 (*M.aeruginosa*), foram encontradas nas culturas mantidas sob a intensidade luminosa de $100 \mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$.

2 – A idade da cultura influencia na concentração de microcistina-LR por células, na cepa NPJB-1. O conteúdo foi maior na fase exponencial de crescimento e diminuiu na fase estacionária

3 – Houve uma relação direta entre a síntese de clorofila a e a produção de microcistina-LR pela cepa NPJB-1 (*M.aeruginosa*).

4 – As condições mais propícias de cultivo da cepa NPJB-1 de *M.aeruginosa* para produção de padrões de microcistina-LR são $100 \mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, com cinco dias de cultivo.

5 – As maiores taxas de crescimento da cepa CYP 011K (*C. raciborskii*), foram encontradas nas culturas mantidas sob a intensidade luminosa de $100 \mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$.

6 – Houve uma tendência a diminuição do comprimento dos tricomas de *C. raciborskii* (CYP 011K), ao final da fase exponencial de crescimento, nas culturas submetidas à maiores intensidades luminosas (60 e 100 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$).

7– A maior produção de cilindrospermopsina em 10^6 células de *C. raciborskii* (CYP 011K) ocorreu nas culturas submetidas a 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, tanto no meio da fase exponencial de crescimento, quanto ao final dos cultivos.

8 – As condições mais propícias de cultivo da cepa CYP 011K de *C. raciborskii* para produção de padrões de cilindrospermopsina são 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, com doze dias de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, S. M. F. O. 2002. *Cianobactérias tóxicas: causas ecológicas e consequências para a saúde pública*. Apostila: Curso de especialização em Limnologia, gerenciamento de recursos hídricos e aqüicultura – IBCCF^o - UFRJ

AZEVEDO, S. M. F. O., CARMICHAEL, W. W., JOCHIMSEN, E. M., RINEHART, K. L., LAU, S., SHAW, G. R. & EAGLESHAM, G. K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*, **181**: 441-446

AZEVEDO, S. M. F. O., EVANS, W. R., CARMICHAEL, W. W. & NAMIKOSHI, M. 1994. First report of microcystins from a brazilian isolate of the cyanobacterium *microcystis-aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, **6** (3): 261-265

BANKER, P. D., CARMELI, S., HADAS, O., TELTSCH, B., PORAT, R. & SUKENIK, A. 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphazimemon ovasliporum* (Cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel. *J. Phycol.*, **33**: 613 – 616.

BANKER, R., TELTSCH, B., SUKENIK, A. & CARMELI, S. 2000. 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from lake Kinneret, Israel. *J. Nat. Prod.* **63**: 387-389

BOLD, H. C. & WYNNE, M. J. 1985. *Introduction to the algae*, 2nd ed. Prentce-Hall, Inc., London: 720p.

BOUVY, M., MOLICA, R., OLIVIERA, S., MARINHO, M. & BEKER, B. 1999. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semiarid region of northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology*, **20**: 285-297.

BRANCO, C. W. C. & SENNA, P. A. 1994. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. *Algological Studies*, **75**: 85-96.

BRIANT, J. F., ROBILLOT, C., QUIBLIER-LLOBÉRAS, C. , HUMBERT, J. F., COUTÉ, A. & BERNARD, C. 2002. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Research* **36**: 3183-3192.

BRIANT, J. F., LÉBOULANGER, C. & HUMBERT, J. F. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology*. **40**: 231-238.

CARMICHAEL, W. W. 1988. Toxins of freshwater algae. In: Tu, A. T. (ed.), *Handbook of Natural Toxins*. Marcell Dekker, New York, 121-147p

CARMICHAEL, W. W. 1992. A status report on planktonic cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins. United States Environmental Protection Agency, Cincinnati. 141p.

CARMICHAEL W. W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, **270**(1): 64-72.

CARMICHAEL, W. W. & Gorhan, P. R. 1981. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. IN *The Water Environment – Algal toxins and health*. New York, Plenum Press.

CARMICHAEL W. W., BEASLEY, V.R., BUNNER, D. L., ELOFF, J. N., FALCONER, I. R., GORHAN, P. R., HARADA, K.-I., YU, M.-J., KRISHNAMURTHY, T., MOORE, R. E., RINEHART, K. L., RUNNEGAR, M. T. C., SKULBERG, O. M. & WATANABE, M. 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*. 26: 971-973.

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

CHONUDOMKUL, D., YOGMANITICHAI, W., THEERAGOOL, G., KAWACHI, M., KASAI, F., KAYA, K. & WATANABE, M. M. 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology* **48**: 345-355

CHORUS, I. & BARTRAM, J. (EDS.) 1999. *Toxic Cyanobacteria in water*. A guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E&FN Spon, London, 416p.

Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Brasília: Ministério da Saúde: FUNASA, 2004. 56p.

COHEN, Z. 1986. Products from microalgae. In: Richmond, A. (ed.), *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press Inc., 421-454pp.

CODD, G. A. & POON, G. K. 1988. Cyanobacterial toxins: In: Gallon, J. G. & Rogers, L. J. (Eds.) *Proc Phytochem. Soc. Europe*, 28, Oxford University Press, Oxford, 283-296.

COSTA, S. M. & AZEVEDO, S. M. F. O. 1994. Implantação de um banco de culturas de cianofíceas tóxicas. *Iheringia – Série Botânica*, **45**: 69-74.

DARLEY, W. M. 1982. *Algal Biology: a physiological approach*. Brackwel Scientific Publications, Oxford London: 168p.

DOMINGOS, P. 2001. *Dominância de cianobactérias produtoras de Microcistinas na lagoa de Jacarepaguá (RJ)*. Dissertação de Mestrado, Programa de Biotecnologia Vegetal – UFRJ.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**(3): 350-356

ERIKSSON, J. E., GRONBERG, L., NYGARD, S., SLOTTE, J. P. & MERILUOTO, J. A. O. 1990. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR a cyclic peptide toxin. *Biochim. Biophys. Acta* **1025**: 60

FALCONER, I. R. 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.: Inter. J.* **6**: 177-184

FALCONER, I. R., BURCH, M. D., STEFFENSEN, D. A., CHOICE, M. & COVERDALE, O. R. 1994. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environ. Toxicol. Water Qual. J.* **9**: 131-139.

FAWELL, J. K., JAMES, C. P. & JAMES, H. A. (EDS.) 1994. *Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water*. Water Research Centre, Medmenham, UK, 1-46.

FITZGERALD, D. J., CUNLIFFE, D. A. & BURCH, M. D. 1999. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South Australia. *Environmental toxicology* **14** (1): 203-207

FOOG, G. E. & THAKE, 1987. *Algae cultures and phytoplankton ecology*, 3rd edition. The University of Wisconsin Press, Ltd., London, 269p.

FOY, R. H. & GIBSON, C. E. 1982. Photosynthetic characteristics of planktonic blue-green algae: The response of twenty growth under high and low light. *Br. Phycol. J.* **17**: 169 – 182.

GIBSON, C. E. & SMITH, R. V. 1982. Freshwater plankton. IN: Carr, N. G., Whitton, B. A. (Eds), *The biology of cyanobacterium*. Botanical Monographs, Vol. 19. Blackwell Scientific Publications, London, 463-490 pp.

GLEASON, F. K. & WOOD, J. M. 1987. Secondary metabolism in the cyanobacteria. In: *The Cyanobacteria*, Fay, P. & Van Baalen, C. (eds.) Elsevier Science Publishers, New York, 437-452pp.

GORHAN, P. R., MACLACHLAV, J. R. HAMMER, V. T. & KIM, W. K. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, **15**: 796-804.

HARADA, K. I., OHTANI, I., IWAMOTO, K., SUZUKI, M., WATANABE, M. F., WATANABE, M. & TERAOKA, K. 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon*, **32**: 73-84.

HAWKINS, P. R., PUTT, FALCONER, I. R., HUMPAGE, A 2001. Phenotypical variation in a toxic strain of the phytoplankter *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) during batch culture. *Environ. Toxicol.* **16**(6): 460-467

HAWKINS, P. R., RUNNEGAR, M. T. C., JACKSON, A. R. B., FALCONER, I. R. 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *App. Environ Microbiol* **50**: 1292-1295.

HESSE, K., DITTMAN, E. & BÖRNER, T. 2001. Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiology Ecology* **37**: 39-43

HOOSER, S. B., BEASLEY, V. R., WAITE, L. L., KUKLENSCHMIDT, M. S., CARMICHAEL, W. W. & HASCHEK, W. M. 1991. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced *in vivo* and *in vitro* by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Veterinary Pathology*, **28**: 259-266.

HUSZAR, V. L. M., SILVA, L. H. S., MARINHO, M., DOMINGOS, P., SANT'ANNA, C. L. 2000. Cyanoprokariote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiologia*, **424**: 67-77.

JARDIM, F. A., MOREIRA, A. A., BRAGA, J. M. S. & AZEVEDO, S. M. F. O. 1999. *Avaliação preliminar da ocorrência e toxicidade de cianobactérias em amostras de séston*. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária Ambiental. 1117-1125.

JOCHIMSEN, E. M., CARMICHAEL, W. W., AN, J., CARDO, D., COOKSON, S. T., HOLMES, C. E. M., ANTUNES, M. B. C., MELO FILHO, D. A., LYRA, T. M., BARRETO, V., AZEVEDO, S. M. F. O. & JARVIS, W. R. 1998. Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, **36**: 373-378.

KÓMARKÓVA, J., LAUDARES-SILVA, R. & SENNA, P. A. C. 1999. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the lagoon do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. *Algological Studies* **94**: 207-222.

KRISHNAMURTHY, T., CARMICHAEL, W. W. & SARVER, E. W. 1986. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon*. **24**(9): 865-873.

KROOMKAMP, J. 1987. Formation and functional significance of storage productis in cyanobacteria. *New Zeland J. Mar. Fresh. Res.* **21**: 457-465.

LAMBERT, T. W., HOLMES, C. F. B. & HRUDEY, S. E. 1994. Microcystin class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. *Environ. Ver.* **2**: 167-186.

LAWTON, L. A. & CODD, G. A. 1991. Extraction and high performance liquid chromatographic method for determination of microcystins in raw waters. *Analyst.* **119**: 1525-1530.

LI, R., CARMICHAEL, W. W., BRITAIN, S. EAGLESHAM, G. K., SHAW, G. R., LIU, Y. & WATANABE, M. M. 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Rhaphidiopsis curvata* (cyanobacteria). *J. Phycol.* **37**: 1121-1126.

MACKINEY, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**: 315-322.

METCALF, J. S., BEATTIE, K. A., SAKER, M. L. & CODD, G. A. 2002. Effects of organic solvents on the high performance liquid chromatographic analysis of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin and recovery from environmental eutrophic waters by solid phase extraction. *FEMS Microbiology Letters* **216**: 159-164.

MYKLESTAD, S. & HAUG, A. 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (gran) Husted. I – Effect of the concentration nutrients in the culture medium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **9**: 125-136

MOLICA, R. J. R. 1996. *Efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de microcistinas em duas cepas de Microcystis aeruginosa Kütz. Emend. Elekin (Cyanophyceae)*. Tese de mestrado, Programa de Biotecnologia Vegetal, UFRJ.

NASCIMENTO, S. M. & AZEVEDO, S. M. F. O 1999. Changes in cellular components in a cyanobacterium (*Synechocystis aquatilis* f. *salina*) subjected to different N/P ratios - An ecophysiological study. *Environmental Toxicology* **14** (1): 37-44

NORRIS, R. L., EAGLESHAM, G.K., PIERENS, G., SHAW, G. R., SMITH, M.J., CHISWELL, R.K., SEAWRIGHT, A. A. & MOORE, M.R. 1999. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* **14**: 163-166.

OLIVEIRA, A. C. P 1997. *Estudo ecofisiológico de Synechocystis aquatilis F. aquatilis (Cyanophyceae) e produção de microcistina em cultivos unialgais e mistos*. Tese de mestrado, Programa de Biotecnologia vegetal – UFRJ.

ORR, P. T. & JONES, G. J. 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol. Oceanogr.* **43** (7): 1604 – 1614.

PADISÁK, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol.* **4**: 563-593

PAERL, H. W., TUCKER, J. & BLAND, P. T. 1983. Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms. *Limnol. Oceanogr.* **28**(5): 847-857.

PAERL, H. W., BLAND, P. T., BOWLES, N. D. & HAIBACH, M. E. 1985. Adaptation to high-intensity, low-wavelength light surface blooms of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49** (5): 1046-1052.

REPAVICH, W. M., SONZOGNI, W. C. STANDRIDGE, J. H.; WEDEPOHL, R. E. & MEISNER, L. F. 1990. Cyanobacteria (blue-green-algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. *Water Research* **24**: 225-231.

RUNNEGAR, M. T. C. & FALCONER, I. R. 1996. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon* **24**(2): 109-115.

RUNNEGAR, M. T. C., FALCONER, I. R. & SILVER, J. 1981. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Archives of Pharmacology*, **317**: 268-272.

SAKER M. L. & GRIFFITHS D. J. 2000. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju from water bodies in northern Australia. *Phycologia* **39**: 349-354

SAKER, M. L., NEILAN, B. A. & GRIFFITHS, D. J. 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolated from Solomom Dam, Palm Island, Queensland. *J. Phycol.* **35**: 599-606.

SANT'ANNA, C. L. & AZEVEDO, M. T. P. 2000. Contribution to the Knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* **71** (3-4): 359-385.

SEAWRIGHT, A. A., NOLAN, C. C., SAHW, G. R., CHISWELL, R. K., NORRIS, R. L.G., MOORE, M. R. & SMITH, M. J. 1999. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in northern Queensland, Aust. *Ver. J.* **76**: 592-594

SHAFIK, H. M. 2003. Morphological characteristics of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju in laboratory cultures. *Acta Biologica Hungarica* **54** (11): 121-136

SHAW, G. R., SEAWRIGHT, A. A., SHAHIN, M., SENOGLES, P. MUELLER, J. & MOORE, M. 2000. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin: Human health risk assessment. *Report from the National Research Center for Environmental Toxicology – Australia.*

SHAW, G. R., SUKENIK, A., LIVNE, A., CHRISWELL, K. K., SMITH, M. J., SEAWRIGHT, A. A., NORRIS, R. L., EAGLESHAM, G. K. & MOORE, M. R. 1999. Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium, *Aphazimemon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environ. Toxicol.* **14**: 167-168

SHEN, X., LAM, P. K. S., SHAW, G. R., WICKRAMASINGHE, W. 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* **40**: 1499-1501.

SIVONEN, K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (9): 2658-2666.

SIVONEN, K., NIEMELA, S. I, NIEMI, R. M., LEPISTO, L., LUOMA, T.H. & RASAMEN, L. A. 1990. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia*, **190**: 267-275.

TANDEAU DE MARSAC, N. & HOUMARD, J. 1993. Adaptation of cyanobacterium to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Ver.* **104**: 119-190.

TEIXEIRA, M. G. L. C., COSTA, M. C. N., CARVALHO, V. L. P., PEREIRA, M. S. & HAGE, E. 1993. Epidemia de gastroenterite na área da barragem de Itaparica, Bahia. *Bol. Sanit. Panam.* **114** (6): 502-511.

TERAO, K., OHMORI, S., IGARASHI, K., OHTANI, I., WATANABE, M. G., HARADA, K-I. & WATANABE, M. 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon* **32**: 833-843.

TILZER, M. M. 1987. Light-dependence of photosynthesis and growth in cyanobacterium: implications for their dominance in eutrophic lakes. *New Zeland J. Mar. Fresh. Res.* **21**: 401-412.

TSUJI, K., NAITO, S., KONDO, F. WATANABE, M. F., SUZUKI, M., SHIMADA, T. & HARADA, K.-I. 1994. A cleanup method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxicon* **32**: 1251.

UTKILEN, H. & GJØLME, N. 1992. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (4): 1321-1325.

VAN LIERE. L. & MUR, L. R. 1979. Growth kinetics of *Oscillatoria agardhii* Gomont in continuous culture, limited in its growth by the light energy supply. *J. Gen. Microbiol.* **115**: 153-160.

VAN LIERE. L., MUR, L. R., GIBSON, C. E. & HERDMAN, M. 1979. Growth and physiology of *Oscillatoria agardhii* Gomont cultivated in continuous culture with a light-dark cycle. *Arch. Microbiol.* **123**: 315-318.

VIEIRA, A. A. H. & MYKLESTAD, S. 1986. Production of extracellular carbohydrate in cultures of *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae). *Journal of Plankton Research* **8** (5): 985-994

WATANABE, M. F. & OISHI, S. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(5): 1342-1344.

WATANABE, M. F., HARADA, K.-I., MATSUURA, K., WATANABE, M. & SUZUKI, M. 1989. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* **1**: 161- 165.

WATANABE, M. F., WATANABE, M., KATO, T., HARADA, K.-I., & SUZUKI, M. 1991. Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa* (blue-green algae, cyanobacteria). *Botanical Magazine, Tokyo*, **104**: 49-57.

WELKER, M., BICKEL, H. & FASTNER, J. 2002. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin – opportunities and limits. *Water Research* **36**:4569-4663.

WESTHUIZEN, A. J. & ELOFF, J. N.1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta* **163**: 55-59

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION 1998. *Guidelines for drinking-water quality – Addendum to volume 1*. WHO, Genebra, 2^a Edição, 36p.

ZEVENBOON, W. & MUR, L. R. 1984. Growth and photosynthetic response of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in relation to photoperiodicity and irradiance. *Arch. Microbiol.* **139**: 232-239