

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE-FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA
FÍSICA, QUÍMICA E GEOLÓGICA.**

**ESTUDO DAS FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS
PRODUTORAS DE TOXINAS PARALISANTES E
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE
PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS.**

WILSON ALVES COLVARA

Tese apresentada como parte integrante dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica da Universidade Federal do Rio Grande, para obtenção do grau de Doutor.

**RIO GRANDE – RS – BRASIL
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE-FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA
FÍSICA, QUÍMICA E GEOLÓGICA.**

**ESTUDO DAS FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS
PRODUTORAS DE TOXINAS PARALISANTES E
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE
PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS.**

WILSON ALVES COLVARA

Tese apresentada como parte integrante dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica da Universidade Federal do Rio Grande, para obtenção do grau de Doutor.

**RIO GRANDE – RS – BRASIL
2012**

ATA

*Alguém que nunca cometeu erros
nunca tratou de fazer algo novo.*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao fim de mais uma etapa da vida acadêmica, paro e olho para trás, vejo à longa jornada que percorri para chegar aqui e então tenho muito a agradecer. Desde o mestre que me auxiliou ao empunhar o primeiro lápis, o que me ensinou a química, e os que me ensinaram sobre a vida.

A Deus que me trouxe até aqui, obrigado.

Agradeço a minha família, esposa Marília Müller dos Santos e filha Érica dos Santos Colvara, pelo amor, carinho e paciência. Aos meus pais, Moacir Colvara e Olinda T. Alves Colvara, e meu irmão Emerson Alves Colvara, pelo apoio e incentivo. Muito obrigado a todos.

Agradeço ao Prof. Dr. João Sarkis Yunes, por me disponibilizar a Unidade de Pesquisa em Cianobactéria e seus equipamentos para execução deste trabalho.

A todos os professores do curso de Pós Graduação em Oceanografia Física Química e Geológica e outros que me auxiliaram nesta etapa. Obrigado professores.

Aos amigos e colegas do laboratório, Gilmar Antônio Farias Lemes, Janaína Leão, Gabriela Kolb, Pablo Guimarães, Carolina Islabão, Rafael Soriani, Mariana Bif, Felipe Diehl, Patrícia Ramos, Aline Lipsky, Juliane, Lucas, e todos que não mais estão no laboratório, mas contribuíram com auxílio, amizade e carinho. A todos vocês, muito obrigado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, através do fornecimento da bolsa de doutorado e verba para aquisição de materiais e equipamentos. Obrigado.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.2 HIPÓTESE	3
2. OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 EUTROFIZAÇÃO	5
3.2 CIANOBACTÉRIA	9
3.3 CIANOTOXINAS	10
3.4 TOXINAS PARALISANTES.....	12
3.5 AÇÃO DAS PSTS	13
3.6 FLORAÇÕES E PRODUÇÃO TOXINA	18
3.7 <i>CYLINDROSPERMOPSIS</i>	25
3.8 ISOLAMENTOS E CULTIVOS	37
3.9 MÉTODOS PARA DETECTAR PSTS	38
3.9.1 BIOENSAIO.....	38
3.9.2 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO	40
3.9.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	45
3.10 PURIFICAÇÃO DE PSTS	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 MONITORAMENTO E COLETA DAS AMOSTRAS.....	53
4.2 EQUIPAMENTOS E REAGENTES.....	54
4.3 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CIANOBACTÉRIA.....	55
4.3.1 CULTIVOS COM SALINIDADE.....	56

4.4	PROCEDIMENTO DE COLETAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE TOXINAS.....	58
4.5	ANÁLISE E CULTIVOS PARA AVALIAR SE HÁ DIFERENÇA NA PRODUÇÃO DE TOXINAS ENTRE AS FLORAÇÕES E CEPAS	59
4.6	CONTAGENS DE CÉLULAS	60
4.7	MÉTODOS DE ANÁLISES DE PSTS.....	61
4.7.1	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA	61
4.7.2	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	62
4.7.3	ANÁLISES POR IMUNOENSIO	63
4.7.3.1	KIT ABRAXIS	63
4.7.3.2	KIT BIOO SCIENTIFIC	64
4.8	COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS	66
4.9	PURIFICAÇÃO DE PSTS	67
4.9.1	ESCOLHAS DAS CEPAS.....	67
4.9.2	CULTIVO DAS CÉLULAS PRODUTORAS DAS TOXINAS.....	67
4.9.3	CONCENTRAÇÃO DAS CÉLULAS E EXTRAÇÃO DA TOXINA	68
4.10	METODOLOGIAS CROMATOGRÁFICAS TESTADAS PARA PURIFICAÇÕES	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
5.1	MONITORAMENTO DAS FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE PSTS NO RIO GRANDE DO SUL	74
5.2	AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS NO DECORRER DOS ANOS 2003-2009 NO RIO GRANDE DO SUL E NO PARANÁ.	77
5.3	ISOLAMENTO E CULTIVO.....	82
5.4	DIFERENÇA NA PRODUÇÃO DE TOXINAS ENTRE AS FLORAÇÕES AMBIENTAIS E AS CEPAS CULTIVADAS EM LABORATÓRIO	87
5.5	TOLERÂNCIA A SALINIDADE PELA <i>CYLINDROSPERMOPSIS SP</i> , E SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE TOXINAS.....	91
5.5.1	EXPERIMENTO EM SANIDADE 0, 5, 10 E 20	91
5.5.2	CULTIVO COM SALINIDADE 0 E 5	92

5.6	COMPARAÇÕES ENTRE OS IMUNOENSAIOS PARA SAXITOXINAS E A CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA.....	94
5.7	PURIFICAÇÃO	98
6.	CONCLUSÕES.....	105
7.	PERSPECTIVAS	108
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classe de estado trófico e suas características principais.....	7
Tabela 2: Diferentes análogos das PSTs, seus radicais e peso molecular.....	15
Tabela 3: Toxicidade relativa das variantes de PSTs (Hall <i>et al.</i> , 1990).....	16
Tabela 4: Toxinas produzidas por <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> no mundo.....	31
Tabela 5: Toxinas produzidas por espécies do gênero <i>Raphidiopsis</i> no mundo produtoras de PSTs.....	32
Tabela 6: Alguns mananciais brasileiros onde foi registrada a presença de cianobactérias produtoras de PSTs.....	33
Tabela 7: Reatividade Cruzada de cada variante de PSTs do Kit ABRAXIS.....	42
Tabela 8: Reatividade cruzada de cada variante de PSTs do Kit Bioo Scientific	43
Tabela 9: Reatividade cruzada de cada variante de PSTs do Kit Beacon	44
Tabela 10: Reatividade cruzada de cada variante de PSTs do Kit Ridascreen.	44
Tabela 11: Gradiente que melhor separou as toxinas com a Fase móvel 1.....	71
Tabela 12: Gradiente que melhor separou as toxinas com a Fase móvel 2.....	72
Tabela 13: Gradiente que melhor separou as toxinas com a Fase móvel 3.....	72
Tabela 14: Florações de cianobactérias produtores de saxitoxinas encontradas em águas do estado do Rio Grande do Sul.....	75
Tabela 15: Relação numérica de análises de amostras com presença de PSTs no Rio Grande do Sul e Paraná.....	77
Tabela 16: Média do teor de toxinas em cada ano.....	79

Tabela 17: Toxinas produzidas pelas cianobactérias de Biguás, Farroupilha, Lajeado, Alagados e Camaquã em eventos naturais no ambiente e em cepas cultivadas em meio ASM1 no laboratório, as quais foram isoladas a partir das suas florações naturais.....	89
Tabela 18: Resultados das análises de PSTs e contagens de células nos cultivos sem adição de sal e com adição de sal marinho até atingir salinidade 5, ambas em meio de cultura ASM1.....	92
Tabela 19: Comparação entre os resultados em equivalentes de STX ($\mu\text{g L}^{-1}$) analisados por CLAE-RF e as técnicas de imunensaio.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ação das PSTs sobre os canais de sódio. Fonte: Adaptado de Carmichael (1994).....	14
Figura 2: Estrutura genérica das PSTs. Fonte: Extraído de Indrasena & Gill (1998).....	15
Figura 3: Fotomicrografia da <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> . Fonte: Imagem A Burks & Schneegurt – Cyanosite (2003), Imagem B de cepa isolada neste trabalho.....	27
Figura 4: Cromatograma dos padrões de PSTs em derivatização pré-coluna segundo a técnica de Lawrence (1995).....	47
Figura 5: Padrões de PSTs em derivatização pós-coluna segundo a técnica de Oshima (1995), em duas separações. (a) STX, neo-SXT e dc-STX; (b) GTX 1-5.....	48
Figura 6: Shimadzu LC-20 ^a , com controladora CBM-20A, detectores de fluorescência (RF-10Ax1), UV-VIS, (SPD-M20A PDA Photo Diode Array), bombas LC-20AD e forno CTO-20A.....	54
Figura 7: Fotografia dos cultivos em escala de 20L.....	56
Figura 8: Forno de coluna com coluna e loop.....	69
Figura 9: Coleta de frações, pós detector de UV.....	70
Figura 10: Percentual de amostras que apresentaram PSTs.....	78
Figura 11: Número absoluto de amostras nas quais foram detectadas STXs no Rio Grande do Sul e Paraná.....	78
Figura 12: Evolução do teor de toxina por células em eq. de STX , no decorrer dos anos, 2003 a 2009, na região sul do Brasil.....	79
Figura 13: Teor de STX nas amostras coletada pela SANEPAR, na represa de Alagados (Ponta Grossa) durante o ano de 2006.....	80

Figura 14: Fotografia das 6 cepas usadas no trabalho.....	82
Figura 15: Imagem de microscopia ótica da cepa de Alagados.....	83
Figura 16: Imagem de microscopia ótica da cepa de Camaquã.....	83
Figura 17: Imagem de microscopia ótica da cepa de Farroupilha.....	84
Figura 18: Imagem de microscopia ótica da cepa de Lajeado.....	84
Figura 19: Imagem de microscopia ótica da cepa de Biguás.....	85
Figura 20: Imagem de microscopia ótica da cepa T3.....	85
Figura 21: Número de filamentos por mililitro das cepas Biguás, Farroupilha, Lajeado, Alagados e Camaquã em meio de cultura ASM1, com ANOVA de uma via (<i>a</i> , <i>b</i> e <i>ab</i>).....	88
Figura 22: Comparação do teor de equivalentes de Eq.STX (pg Cel^{-1}) em eventos naturais e de suas respectivas cepas em meio ASM1 de Farroupilha, Camaquã e Alagados.....	88
Figura 23: Teor de toxina intracelular de culturas de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> expostas a diferentes salinidades.....	91
Figura 24: Imagem de microscopia ótica da cepa T3, sendo A sem adição de sal e B salinidade 5.....	93
Figura 25. Relação entre o número de células e concentração em Eq. de STX analisados pelos métodos de imunoenensaio e cromatografia líquida.....	95
Figura 26. Cromatograma pelo método de pós-derivatização, método de Oshima (1995) do extrato bruto, pós-concentração.....	98
Figura 27. Espectro de UV em 3D das toxinas durante a purificação com a fase móvel 3, a partir do extrato bruto.....	99

Figura 28: Cromatograma da fração que continha o maior teor de Neo-STX.....	100
Figura 29: Cromatograma da fração que continha o maior teor de STX.....	101
Figura 30: Cromatograma da fração que continham Neo-STX e STX.....	101
Figura 31: Cromatograma dos padrões PSTs, analisados por EM.....	103
Figura 32: Cromatograma do padrão de Neo-STX produzido pela metodologia desenvolvida neste trabalho analisado EM.....	103

RESUMO

As florações de cianobactérias estão cada vez mais intensas e frequentes, sendo a maioria destas florações nocivas. Uma das toxinas produzidas por cianobactérias são as toxinas paralisantes (PSTs – Paralytic Shellfish Toxins). Esta tese se desenvolveu com o objetivo de estudar as florações de cianobactérias produtores de PSTs no Rio Grande do Sul e no Paraná, isolar e manter em cultivo no laboratório os organismos, e a partir destes desenvolver uma metodologia de purificação das toxinas produzidas por estas cepas. Foi constatado que a cianobactéria *Cylindrospermopsis* foi a responsável pela produção das PSTs na maioria das amostras (96%); que suas florações são cada vez mais frequentes em águas brasileiras e que o teor de toxina oscila em função das condições ambientais. Foi possível isolar cinco cepas, sendo quatro de *Cylindrospermopsis* e uma de *Raphidiopsis*, nas quais foi observada produção de toxinas diferentes, qualitativa e quantitativamente. Dentre as técnicas analíticas usadas para analisar as PSTs, encontram-se as cromatográficas e os ensaios imunoenzimáticos. Neste trabalho foram realizados testes comparativos entre as técnicas, sendo que ambas apresentaram correlação linear com o número de células. Uma vez que o ensaio imunoenzimático tem reação diferente para cada análogo de PST, e que as amostras continham apenas Neo-STX e STX, os resultados evidenciaram que o ensaio imunoenzimático deve ser utilizado apenas para triagem e a cromatografia como análise conclusiva. Esse trabalho desenvolveu uma metodologia simples de purificação das PSTs (Neo-STX e STX) a partir das cepas isoladas, que pode ser usada para produções de padrões analíticos daquelas PSTs.

Palavras-Chave: Toxinas Paralisantes, Cianobactéria, Cromatografia, Purificação, *Cylindrospermopsis*.

ABSTRACT

The cyanobacterial blooms are becoming more intense and frequent, being the majority of these blooms very harmful. Some of them are toxins producers and one of the toxins produced by cyanobacteria is the paralytic shellfish toxins (PSTs). The aim of this thesis has been to study the cyanobacterial blooms that produces PSTs in Rio Grande do Sul and Paraná, to isolate and to maintain in the laboratory the organisms in culture and from these strains to develop a method of purification of the produced toxins. It was found that the genus *Cylindrospermopsis* cyanobacteria was responsible for the production of PSTs in the most of the samples (96%); that their blooms are increasingly common in Brazilian waters and the content of toxin varies. It was possible to isolate five strains, four of *Cylindrospermopsis* and one of *Raphidiopsis*, which showed production of different toxins, qualitative and quantitatively. There are several techniques to analyze the PSTs, such as chromatographic and enzyme immunoassay. Tests were performed to compare these techniques, and it was observed that both are linearly correlated with the number of cells. Since the enzyme immunoassay test has different reaction for each analog PST, and the samples had only neo-STX and STX, the results pointed out enzyme immunoassay test has to be used just as screening, meanwhile the chromatography as a conclusive analysis. The thesis has developed a simple purification technique of PST (neo-STX and STX) from the strains, which can be used to produce analytical standards from those PST.

Keyword: Paralytic Toxins, Cyanobacteria, Chromatographic, Purification, *Cylindrospermops*

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias constituem um grande grupo de micro-organismos, a maioria das espécies encontra-se em águas continentais, algumas são marinhas ou ocorrem em solo úmido, ainda sendo encontradas em ambientes lacustres (principalmente hipersalinos), ambientes congelados, sob a cobertura de florestas, entre outros (Carmichael, 1994). Também são chamadas de algas azuis (Perry and Staley, 1997), mas sabe-se que não têm relação filogenética com qualquer dos grupos de algas, a não ser como prováveis antepassados dos cloroplastos e por isso encontram-se classificados como um filo dentro do domínio Bactéria (Hayes 1983, Hitzfeld *et al.*, 2000).

Algumas cianobactérias produzem toxinas ou cianotoxinas, que constituem um grupo de produtos naturais tóxicos (Carmichael, 1994). Algumas dessas toxinas são identificadas como neurotóxicas, caracterizadas por sua ação rápida e, dependendo da dose e do organismo, podem causar a morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição (Carmichael & Schwartz, 1984; Beasley *et al.*, 1989). Entre as neurotoxinas encontram-se aquelas conhecidas como toxinas paralisantes de molusco PSP (*Paralytic Shellfish Poison*), também denominadas PSTs (*Paralytic Shellfish Toxins*), que são toxinas responsáveis por paralisia, ou veneno paralisante de moluscos, sendo chamadas de “paralisantes” pelos efeitos que produzem. Atualmente, já foram descritos ao menos 57 análogos de PSTs (Wiese *et al.*, 2010). As cianobactérias *Aphanizomenon flos-aquae*, *Lyngbya wollei*, *Anabaena circinalis*, *Planktothrix spp* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, já foram identificadas como produtores destas toxinas (Codd 2000).

Pesquisa sobre organismos produtores de PSTs no Rio Grande do Sul são poucas, e não constam na literatura estudos sobre purificação destas toxinas no Brasil, cujos padrões para calibração e pesquisa são importados. Os padrões comerciais PSTs são produzidos e purificados a partir de dinoflagelados e não de cianobactérias. No entanto as PSTs que são encontradas nos mananciais, são produzidas por cianobactérias e não por dinoflagelados, então é mais coerente que os padrões, para calibrações de equipamentos e pesquisas de PSTs de cianobactérias, sejam provenientes de cianobactérias, e tendo em vista que existem dezenas de análogos das PSTs, os padrões comerciais podem ter análogos que não são encontrados em florações de cianobactérias, bem como não ter algum análogo que tem nestas florações.

No Brasil existe uma lei que regulamenta os parâmetros da água para abastecimento publica, tendo em vista que o Ministério da Saúde, após revisão da portaria N° 518 (potabilidade de água para consumo humano), lançou em 12 de Dezembro de 2011 a portaria N° 2.914, na qual a análise de PSTs passou de sugerida para obrigatória. Em função disto, a disponibilidade destes padrões para experimentos e calibrações de métodos se torna indispensável.

O presente trabalho propõe estudar as cianobactérias produtoras de PSTs, isola-las e cultiva-las em laboratório, e a seguir purificar as PSTs produzidas pelas cianobactérias.

A pesquisa dos impactos das toxinas nos ecossistemas aquáticos tem avançado muito e vários centros de pesquisa estão envolvidos nesta atividade. Também há uma busca muito intensa por novos métodos de remoção de toxinas do meio ambiente. A obtenção de padrões purificados deste composto, para serem usados em experimentos e calibração de equipamentos analíticos (e.g. cromatografia líquida) nas pesquisas e sua

detecção e quantificação em amostras ambientais, é um dos principais obstáculos a ser vencido sob o risco de não haver uma efetiva implementação dessas análises conforme previsto na legislação. A não disponibilidade de padrões dessas toxinas também pode prejudicar ou inviabilizar a pesquisa com esses compostos. Portanto, os estudos de purificação desses compostos, para uso em termos de avaliação ambiental ou em desenvolvimento tecnológico, são de extrema importância.

1.2 HIPÓTESE

No Rio Grande do Sul ocorrem florações de Cianobactérias produtoras de PSTs, sendo a *Cylindrospermopsis* a cianobactéria produtora de PSTs que mais ocorre no estado e a produção destas toxinas por esta espécie depende das condições de cultivo, então, as cepas em laboratório tem sua produção altera, qualitativa e quantitativamente, quando comparado com florações ambientais. A partir de cepas de cianobactéria será possível desenvolver uma técnica para purificar a toxina e produzir padrões de PSTs.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo geral purificar PSTs produzidas por cianobactérias, e estudar as florações tóxicas de cianobactérias produtoras de PSTs em diferentes ecossistemas aquáticos do Rio Grande do Sul.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Monitorar as florações de cianobactéria e mensurar as concentrações de PSTs, dos mananciais amostrados, particularmente no Rio Grande do Sul;
- Isolar e manter em cultivo as cianobactérias produtoras de PSTs obtidas;
- Estudar a produção de PSTs por cianobactérias de floração e de cepas isoladas por este trabalho, com especial atenção à cepa Brasileira (T3, devido sua importância);
- Desenvolver um processo de purificação de PSTs a partir de cianobactérias.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 EUTROFIZAÇÃO

O significativo aumento da população mundial, evidenciado nas últimas décadas, exigiu o desenvolvimento e o crescimento da agricultura, urbanização e industrialização. Como consequência, o avanço tecnológico alcançado atualmente disponibiliza no mercado uma enorme quantidade de produtos que trazem conforto e benefícios à sociedade. No entanto, a utilização dos recursos naturais de forma não sustentável, vem acelerando o processo de degradação ambiental, particularmente, dos ecossistemas aquáticos (Alves 2007).

O intuito de aumentar a competitividade no mercado de *commodities* colaborou enormemente para a degradação dos recursos hídricos em escala mundial (Ribeiro, 2008). Dessa forma, atualmente, um dos principais usos consuntivos da água no mundo é feito pela agricultura, destacando-se a irrigação de lavouras (Rebouças *et al.*, 2003). No Rio Grande do Sul, a irrigação de extensas lavouras de arroz representa o mais intenso uso da água, sendo responsável por aproximadamente 80% do consumo de água doce no estado. Os diferentes impactos ambientais associados à utilização de água superficial em sistema de produção agrícola destaca-se as águas de drenagem. Essas carreiam para os corpos hídricos superficiais e subterrâneos muitas das substâncias empregadas para elevar a produtividade das lavouras, principalmente os fertilizantes e agrotóxicos, promovendo a deterioração da qualidade dos rios à jusante das captações de água (Rebouças *et al.*, 2003). Quando aportados em grandes quantidades em corpos hídricos fechados como os reservatórios e açudes, esses nutrientes provoca o crescimento excessivo de organismos aquáticos ocasionando o processo denominado de eutrofização (Braga *et al.*, 2005). A fertilização artificial é uma das práticas mais

adotadas pelos agricultores do Rio Grande do Sul, portanto a eutrofização possui caráter artificial ou antrópico e pode ser definida como sendo um processo induzido pelo homem através do acréscimo de nutrientes de diferentes origens nos ecossistemas aquáticos, constituindo uma reação em cadeia de causas e efeitos, cuja característica principal é a quebra de estabilidade desse ecossistema (homeostasia), o qual passa a produzir mais matéria orgânica do que é capaz de consumir ou decompor. Ainda, por se tratar de um processo dinâmico, no qual ocorrem profundas modificações qualitativas e quantitativas nas comunidades aquáticas, nas condições físicas e químicas do meio e o nível de produção do sistema, a eutrofização artificial pode ser considerada uma forma de poluição (Esteves, 1998).

De forma irracional, os resíduos da agricultura, industriais e domésticos são lançados no ambiente gerando contaminação, principalmente nos corpos d'água. Esse lançamento, juntamente com carreamento de nitratos e fosfatos, comumente empregados na agricultura, contribuem ainda mais para o processo denominado eutrofização (Tundisi & Tundisi 1992).

Os estudos e classificação de corpos d'água com relação ao seu grau de eutrofização teve início com Naumann (1919, 1929) e Thienemann (1925, 1931) (*apud*, Schäfer, 1985). Esta abordagem de classificação tipológica consiste em conferir aos corpos d'águas uma categoria de estado trófico (Tabela 1). Naumann (1919, 1929) (*apud*, Schäfer, 1985) define o estado trófico como a resposta biológica à introdução de nutrientes.

De acordo com Esteves (1998) eutrofização é o aumento da concentração de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio, nos ecossistemas aquáticos, que tem como consequência o aumento de suas produtividades. Como decorrência deste

processo, o ecossistema aquático passa da condição de oligotrófico e mesotrófico para eutrófico ou mesmo hipereutrófico.

Tabela 1: Classe de estado trófico e suas características principais.

Classes de Estado Trófico	Características
Ultraoligotrófico	Corpos d'água limpos, de produtividade muito baixa e concentrações insignificantes de nutrientes que não acarretam em prejuízos aos usos da água
Oligotrófico	Corpos d'água limpos, de baixa produtividade, em que não ocorrem interferências indesejáveis sobre os usos da água, decorrentes da presença de nutrientes.
Mesotrófico	Corpos d'água com produtividade intermediária, com possíveis implicações sobre a qualidade da água, mas em níveis aceitáveis, na maioria dos casos.
Eutrófico	Corpos d'água com alta produtividade em relação às condições naturais, com redução da transparência, em geral afetados por atividades antrópicas, nos quais ocorrem alterações indesejáveis na qualidade da água decorrentes do aumento da concentração de nutrientes e interferências nos seus múltiplos usos.
Supereutrófico	Corpos d'água com alta produtividade em relação às condições naturais, de baixa transparência, em geral afetados por atividades antrópicas, nos quais ocorrem com frequência alterações indesejáveis na qualidade da água, como a ocorrência de episódios florações de algas, e interferências nos seus múltiplos usos
Hipereutrófico	Corpos d'água afetados significativamente pelas elevadas concentrações de matéria orgânica e nutrientes, com comprometimento acentuado nos seus usos, associado a episódios florações de algas ou mortandades de peixes, com consequências indesejáveis para seus múltiplos usos, inclusive sobre as atividades pecuárias nas regiões ribeirinhas.

Fontes: Lamparelli (2004)

A classificação de ecossistemas aquáticos por meio de índices de estado trófico é comum em ciências aquáticas (Dodds et al., 1998). A determinação do Índice do Estado Trófico – IET tem por finalidade classificar corpos aquáticos em diferentes graus de trofia, ou seja, avaliar a qualidade da água quanto ao enriquecimento por nutrientes e seu efeito relacionado ao crescimento excessivo das algas, ou o potencial para o crescimento de macrófitas aquáticas.

O IET foi desenvolvido com o objetivo de tornar mais clara a comunicação de estudos envolvendo a eutrofização e a classificação de corpos aquáticos. Por meio da análise de dados coletados, é estabelecido um índice que utiliza valores de clorofila-a, disco de Secchi e fósforo total, por meio de equações desenvolvidas por alguns autores (Vollenweider, 1969; Vollenweider, 1976; Kirchner e Dillon, 1975; Sakamoto, 1966; Dillon e Rigler, 1974; Lasenby, 1975, citados por Carlson, 1977).

Em 1983, no Brasil, Toledo Jr. *et al.* realizaram estudos para adequar, a ambientes subtropicais, as equações desenvolvidas por Carlson (1977). Esta adaptação foi considerada necessária para reduzir distorções nos valores de classificação, uma vez que, por exemplo, as condições climáticas são diferentes daquelas das regiões de clima temperado.

Da mesma forma que Carlson, Toledo Jr. et al. (1983), aplicaram a análise de regressão linear aos valores de fósforo total, clorofila-a e transparência do disco de Secchi. Como resultado desta pesquisa foram produzidas equações para fósforo total, ortofosfato (PO_4^{-3}), clorofila-a e transparência do disco de Secchi. Em ambientes onde níveis de eutrofização avançado, ocorrem à mortandade de organismos aquáticos que pode acarretar problemas de saúde pública. Nestes processos tem-se observado a

ocorrência de florações (proliferação ou explosão da biomassa) principalmente de cianobactérias (Carmichael, 1994).

3.2 CIANOACTÉRIA

Cianobactérias (do grego: *cyano*, azul + *bactéria*, bactéria), popularmente denominadas cianobactérias ou algas azuis (Perry and Staley, 1997). A coloração das cianobactérias pode ser explicada através da presença dos pigmentos clorofila-a (verde), carotenoides (amarelo-laranja), ficocianina (azul) e a ficoeritrina (vermelho). Todos estes pigmentos atuam na captação de luz para a fotossíntese. Algumas espécies podem apresentar mais de um tipo de pigmento, isto explica a existência de cianobactérias das mais variadas cores. Apresentam geralmente uma bainha de mucilagem, que é uma substância gelatinosa incolor que recobre total ou parcialmente o indivíduo. Estes organismos possuem rápida reprodução, que pode ser por divisão celular, por fragmentação, endósporo, exósporo ou acineto. A maioria das espécies encontra-se em águas continentais, mas algumas são marinhas ou ocorrem em solo úmido, ainda sendo encontradas em ambientes lacustres (principalmente hipersalinos), ambientes congelados, sob a cobertura de florestas, entre outros. Outras espécies são endossimbiontes em líquenes ou em protistas e corais, fornecendo energia aos seus hospedeiros (Carmichael, 1994).

Os fósseis das cianobactérias indicam que estes seres fotossintéticos apareceram no éon geológico Arqueano (compreendido aproximadamente entre 3,85 e 2,5 bilhões de anos atrás) marcado pela atividade vulcânica e fluxo de calor três vezes maior que o atual (Carmichael, 1994). Acredita-se que foram responsáveis pelo aparecimento do oxigênio na atmosfera terrestre, o que parece ter acontecido há cerca de 2,5 bilhões de anos, desencadeando a origem da vida eucarionte e dando lugar ao que se chama

atualmente o éon Proterozóico (vulgarmente conhecido como éon dos "animais primitivos", Carmichael, 1994).

As Cianobactéria não têm relação filogenética com qualquer dos grupos de algas, a não ser como prováveis antepassados dos cloroplastos e por isso encontram-se classificados como um filo dentro do domínio Bactéria (Hayes 1983, Hitzfeld *et al.*, 2000).

As cianobactérias apresentam grande capacidade de colonização de diversos habitats, estando presentes desde ambientes aquáticos, com variados índices de salinidade, àqueles terrestres, incluindo regiões temporariamente congeladas na Antártida (Carmichael *et al.*, 1990; Yoo *et al.*, 1995; Hitzfeld *et al.*, 2000).

3.3 CIANOTOXINAS

As toxinas de cianobactérias, ou cianotoxinas, constituem um grupo de produtos naturais tóxicos. Ainda não estão devidamente esclarecidas as causas da produção dessas toxinas, podendo ser meramente um subproduto de seu metabolismo ou apresentando uma função protetora contra herbivoria, como acontece com alguns metabólitos de plantas vasculares (Carmichael, 1994).

Embora nem toda floração de cianobactéria produza compostos tóxicos (Brittain *et al.*, 2000), alguns autores sugerem um papel ecológico para as cianotoxinas, que podem exercer funções semelhantes a moléculas mensageiras ou armas biológicas (Christoffersen, 1996; Rohrlack *et al.*, 1999; Kaebernick & Neilan 2001). Na hipótese de molécula mensageira, sugere que esses compostos estão relacionados à comunicação intraespecífica (quórum sense), o que permitiria uma comunicação dentro das colônias e florações ou “blooms”, estabelecendo estratégias para aquisição de nutrientes e exposição à luz dentro do habitat. Um estudo abordando a influência de luminosidade

nas concentrações de microcistinas (MCYST) intra e extracelular evidenciou uma possível comunicação entre as células da colônia (Dittmann *et al.*, 2001).

Outros estudos sugerem que a função desses compostos esteja relacionada à proteção contra incidência de luz, concentrações intracelulares de metais ou o armazenamento de nitrogênio (Shi *et al.*, 1996; Utkilen & Jørgensen, 1995; Kaebernick *et al.*, 2000; Dittmann *et al.*, 2001). No entanto, não há um consenso com relação ao papel das toxinas produzidas por cianobactérias.

Algumas dessas toxinas são identificadas como alcaloides ou organofosforados neurotóxicos caracterizadas por sua ação rápida, e dependendo da dose e do organismo, podem causar a morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição. Outras atuam mais lentamente e são identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos (Carmichael & Schwartz, 1984; Beasley *et al.*, 1989). Um terceiro grupo de toxina, as dermatotóxicas, causam alergias e irritação na pele.

É cada vez mais comum o relato de ocorrência de grandes massas verdes ou vermelhas de cianobactérias em lagos, rios, represas e estuários. Esses fenômenos têm chamado a atenção mundial devido ao potencial de risco para a saúde humana (Carmichael, 1994; Chorus & Bartram, 1999; Falconer, 1999; Matthiensen *et al.*, 2000; Proença 2006).

A descrição de florações tóxicas e a intoxicação por água contaminada por espécies tóxicas de cianobactérias, que tem conduzido à mortalidade de vários animais como peixes, bovinos, ovelhas, porcos, cães, pássaros, já foram relatadas em diversas partes do mundo, como Austrália, Inglaterra, China, África do Sul, Chile, Alemanha, Itália, Escócia, Brasil, Argentina (Carmichael, 1994; Lagos, 1999; Falconer, 1999).

3.4 TOXINAS PARALISANTES

Entre as neurotoxinas encontram-se aquelas conhecidas como toxinas paralisantes de molusco PSP (*Paralytic Shellfish Poison*), também denominadas PSTs (*Paralytic Shellfish Toxins*), toxinas responsáveis por paralisia, ou veneno paralisante de moluscos, é chamada de “paralisante” pelos efeitos que produz. É também chamada de neurotoxina ou saxitoxina. Atualmente, já foram descritos ao menos 57 análogos de PSTs (Wiese *et al.*, 2010), que são produzidos por organismos marinhos e de água doce, algumas espécies de bactérias e algas. As cianobactérias *Aphanizomenon flos-aquae*, *Lyngbya wollei*, *Anabaena circinalis*, *Planktothrix spp* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, já foram identificadas como produtores destas toxinas (Codd 2000).

Alguns gêneros de bactérias (*Pseudomonas*, *Alteromonas* e *Acinetobacter*) e dinoflagelados (*Alexandrium (Gonyaulax)*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium*) apresentam espécies já identificadas como produtoras de saxitoxinas, sendo capazes de transferi-las através da cadeia trófica (Michaud *et al.*, 2002). Como resultado da filtração contínua dos bivalves, tais como mexilhões e ostras, grandes quantidades de micro-organismos do plâncton, produtores de toxina, podem ser ingeridos. A concentração das toxinas principalmente nas glândulas digestivas dos moluscos, tornando esses organismos em vetores de intoxicação de predadores, inclusive o homem, pois mesmo com o cozimento ou congelamento dos organismos contaminados não degrada a toxina bioacumulada (Lagos, 2002). A contaminação dos filtradores por PSTs pode ocorrer ainda pela ingestão de fezes de organismos da mesma espécie contaminados (Kikuchi *et al.*, 1996). As PSTs produzidas por cianobactérias também podem se acumular em filtradores de água doce (Chorus & Bartram, 1999), como foi observado por Negri *et al.*, (1995), que

verificaram bioacumulação de toxinas paralisantes no mexilhão *Alathyria condola*, produzidas pela cianobactéria *Anabaena circinalis*.

Algumas espécies de dinoflagelados marinhos produtores de PSTs, como *Alexandrium tamarensise* e *Gymnodinium catenatum*, já foram encontrados na costa brasileira (Odebrecht *et al.*, 2002). O laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos da FURG tem identificado a presença de dinoflagelado (*Alexandrium tamarensise*) na praia do Cassino desde 1994. Florações destes organismos representam problemas, principalmente em áreas utilizadas para cultivos de mexilhão, como o litoral de Santa Catarina, justificando a manutenção de programas de monitoramento em águas costeiras (Proença *et al.*, 1999 e 1998). Freitas *et al.* (1996) identificaram a presença de PSTs em extratos do tunicado *Phallusia nigra*, bem como no molusco *Perna perna*, ambos coletados na costa brasileira, no litoral norte de São Paulo. Em agosto de 1997 foi obtido um cultivo em laboratório da espécie que foi utilizada no trabalho de Persich (2001), no qual foi detectada a presença de quatro variantes de PSTs.

3.5 AÇÃO DAS PSTs

Para secretar a acetilcolina, ou qualquer outro neurotransmissor, os neurônios devem primeiro ser excitados, gerando um estímulo elétrico. O impulso elétrico gerado se propaga ao longo do axônio, através do fluxo de íons sódio nos canais existentes na membrana, liberando o neurotransmissor para estimular o músculo. Os canais de sódio são os responsáveis pela geração do potencial de ação com a despolarização das membranas de neurônios e células eletricamente excitáveis (Hodgkin & Huxley, 1952).

As PSTs interferem na comunicação entre neurônio e células musculares (Figura 1.). Estas toxinas se ligam aos canais de sódio, bloqueiam os canais de sódio, impedindo a geração do impulso elétrico, o qual estimula a secreção da acetilcolina e conseqüentemente a transmissão de impulsos nos nervos periféricos e músculos esqueléticos podendo causar a morte do indivíduo contaminado em até 12 horas. As principais vias de exposição humana a estas toxinas ocorrem pelo consumo de água e de bivalvos marinhos (Carmichael, 1994).

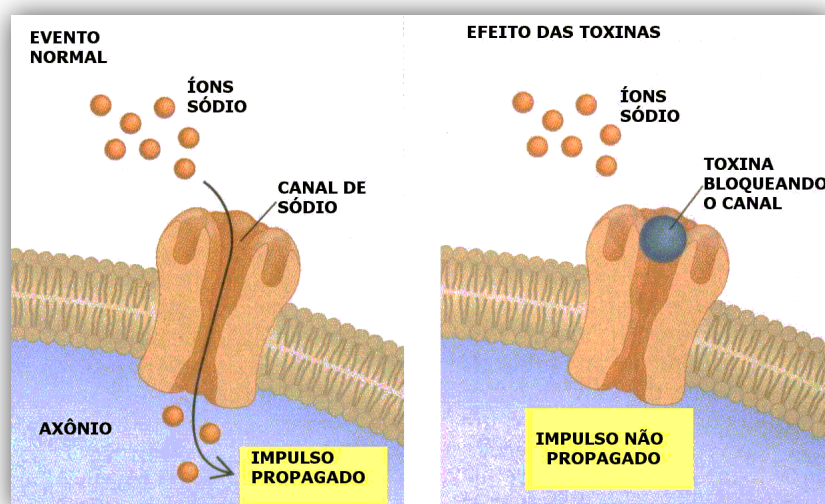


Figura 1: Ação das PSTs sobre os canais de sódio. Fonte: Adaptado de Carmichael (1994).

A toxicidade das PSTs é bastante variável, sendo a saxitoxina (STX) a mais tóxica, e estão entre as cianotoxinas mais tóxicas, sendo a DL50 (via intraperitoneal) em camundongos para saxitoxina (STX) purificada de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal, enquanto que por consumo oral a DL50 é de $263 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal (Chorus & Bartram, 1999; Fernandes 2003). As PSTs são um grupo de alcalóides carbamatos, basicamente constituídos de um núcleo tetrahidropurínico. Atualmente já foram

descritos ao menos 57 análogos de PSPs (Wiese *et al.*, 2010), como as saxitoxinas não-sulfatadas (STX) e neo-saxitoxina (Neo-STX), goniautoxinas monossulfatadas (GTX), ou ainda duplamente sulfatadas as C-toxinas (Figura 2 e Tabela 2).

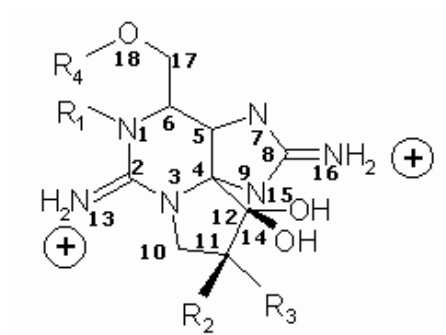


Figura 2: Estrutura genérica das PSTs. Fonte: Extraído de Indrasena & Gill (1998)

Tabela 2: Diferentes análogos das PSTs, seus radicais e peso molecular.

Toxina	Massa Molecular (g.mol ⁻¹)	R1	R2	R3	R4
STX	301,31	H	H	H	CONH ₂
Neo-STX	317,31	OH	H	H	CONH ₂
dcSTX	258,28	H	H	H	H
dcNeo-STX	274,28	OH	H	H	H
GTX 1	412,36	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂
GTX 4	412,36	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂
GTX 2	396,36	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂
GTX 3	396,36	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂
GTX 5 (B1)	380,36	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻
GTX 6 (B2)	396,36	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻
dcGTX 1	369,33	OH	OSO ₃ ⁻	H	H
dcGTX 4	369,33	OH	H	OSO ₃ ⁻	H
dcGTX 2	353,33	H	OSO ₃ ⁻	H	H
dcGTX 3	353,33	H	H	OSO ₃ ⁻	H
C1	475,41	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻
C2	475,41	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻
C3	491,41	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻
C4	491,41	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻

Sob pH neutro, as PSTs apresentam carga líquida 2⁺, 1⁺ e carga nula (Oshima, 1995). Os grupos guanidina e hidroxila são essenciais para ligação aos canais de sódio, e quanto maior a carga líquida, maior a toxicidade, sendo que as toxinas produzidas variam conforme a espécie e o ambiente no qual a cianobactéria se encontra (Lehane, 2000).

Segundo Indrasena & Gill (2000), as PSTs são solúveis em água e metanol, estáveis por no mínimo um ano em solução ácida pH (3-4), sob temperatura de 4°C, sendo altamente sensíveis a pH alcalino (Indrasena & Gill, 2000).

Para expressar o resultado em eq. STX considera-se a diferença entre o potencial tóxico de cada variante (Tabela 3), conforme Equação 1.

Tabela 3: Toxicidade relativa das variantes de PSTs (Hall *et al.*, 1990).

Toxina	Toxicidade relativa
STX	1,0000
GTX 1	0,9940
Neo-STX	0,9243
GTX 4	0,7261
GTX 3	0,6379
Dc-STX	0,5131
dc-GTX 3	0,3766
GTX 2	0,3592
dc-GTX 2	0,1538
C2	0,0963
GTX 6 (B2)	0,0644
GTX 5 (B1)	0,0644
C4	0,0576
C3	0,0133
C1	0,0060

$$\text{eq. STX} = \sum_{i=1}^n C_i * T_i$$

C_i= concentração da toxina (µg.L⁻¹)

T_i= toxicidade relativa da toxina

Equação 1: conversão dos análogos de PSTs em equivalentes de STX

As diferenças estruturais das toxinas geram diferentes afinidades pelo receptor celular, conseqüentemente, sua toxicidade também torna-se distintas (Lagos, 2002). As toxinas paralisantes podem ser detectadas no ser humano por sintomas que são principalmente neurológicos, caracterizados por leve entorpecimento dos lábios, sensação de queimação na boca e garganta, vertigens, fraqueza, perda da coordenação motora, paralisia muscular e respiratória. Outros sintomas associados à intoxicação são citados, tais como: náusea, vômitos, sensação de boca e garganta secas, além de taquicardia. Ocorrem em até 5 minutos após a contaminação, e em casos fatais, a morte pode ocorrer em até 12 horas, caso contrário, a desintoxicação total do organismo ocorre de 1 a 6 dias (CDC, 1990). Diversos casos de intoxicação por PSTs são relatados na literatura. Um dos primeiros incidentes registrados de intoxicação por PST ocorreu quando o capitão George Vancouver desembarcou em British Columbia em 1793. A tragédia aconteceu quando vários de seus tripulantes morreram agonizando devido à paralisia e asfixia após comer marisco retirado de uma área que o Capitão Vancouver chamou "Poison Cove". A saxitoxina foi identificada apenas em 1950 (Quayle 1969), desde então, muitos outros análogos de saxitoxina foram identificados como membros desta classe de toxinas (Indrasena & Gill 1998). Na Venezuela 256 pessoas foram intoxicadas, onde 10 morreram, e episódios de intoxicação neste país têm ocorrido desde 1977 (Sánchez *et al.*, 1999). Em 1987, na Guatemala, 187 pessoas apresentaram sintomas neurológicos de envenenamento por PSTs, sendo que 26 destas vieram a falecer (Rodrigue *et al.*, 1990). Já no ano de 1997, foi registrada em Nagasaki, Japão, a ocorrência de envenenamento alimentar pelo consumo de ostras, onde 26 pessoas foram afetadas, sendo 16 destas hospitalizadas (Akaeda *et al.*, 1998). Segundo Lagos (1999), florações de algas tóxicas resultaram na morte de 26 pessoas no Chile entre 1972 e

1999, através do consumo de molusco contaminado com PSTs. Casos envolvendo morte de humanos por envenenamento com PSTs após o consumo do caranguejo *Zosimus aeneus* foram registrados em locais como Filipinas, Japão e Ilha Palau, sendo esta espécie omnívora e não filtradora (Llewellyn *et al.*, 2002)

Nenhum medicamento foi ainda aprovado para uso no caso de intoxicação por PSTs, sendo o tratamento apenas sintomático, o que torna relevante a prevenção da intoxicação através do monitoramento da presença de algas tóxicas.

3.6 FLORAÇÕES E PRODUÇÃO TOXINA

A toxicidade de florações de cianobactérias pode apresentar uma variação temporal, desde intervalos curtos de tempo até diferenças sazonais, e também espaciais, provavelmente decorrentes de alterações na proporção de cepas tóxicas e não tóxicas na população. Essas variações de toxicidade nas cianobactérias ainda não foram devidamente esclarecidas. Entretanto, está se tornando cada vez mais frequente a ocorrência de florações tóxicas que apresentam os grupos comuns de cianotoxinas; tipicamente, cerca de 50% de todas as florações testadas em diferentes países mostraram-se tóxicas em bioensaios (Carmichael & Gorham, 1981; Sivonen *et al.*, 1990).

Sabe-se que são inúmeros os fatores que influenciam qualitativa e quantitativamente a produção de toxinas por cianobactérias. Constatou-se que nos últimos anos aumentaram os registros de florações em mananciais com Saxitoxinas, sendo *Cylindropemopsis raciborskii* a principal produtora. Colvara *et al.* (2010) verificaram que até o ano de 2004 eram raros os registros de amostras dos mananciais do Sul do Brasil contendo saxitoxina. No entanto, em 2006 foram registrados quase vinte casos e em 2009, aproximadamente, cinquenta. A *C. raciborskii* é comumente

observada em regiões tropicais, mas sua presença em regiões mais temperadas se deve tanto pela habilidade em tolerar diversas condições ambientais, quanto pelo fenômeno de mudanças climáticas evidenciadas nos últimos anos (Briand *et al.*, 2004).

A invasão de cianobactérias tóxicas é uma ameaça emergente para o mundo inteiro. A versatilidade das cianobactérias, somada às mudanças climáticas e à eutrofização, torna necessária não só a proteção dos mananciais, mas também o tratamento e controle dos mesmos. Como as toxinas de cianobactérias são bastante variáveis, os tratamentos requerem alterações, como adição de carvão para remoção das toxinas e análises específicas para monitorar das toxinas.

De acordo com taxonomia atual, existem 150 gêneros de cianobactérias, com cerca de 2000 espécies, e pelo menos 40 delas já foram identificadas como sendo produtoras de toxinas, estas representadas principalmente por *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, e *Radiocystis* (Carmichael, 1994; Bouaïcha, 2001; Haider *et al.*, 2003; Lombardo *et al.*, 2006).

Entender os fatores que afetam a produção de cianotoxinas proporcionaria uma ferramenta para monitorar e prevenir o aparecimento de florações tóxicas de cianobactérias. Produção de cianotoxinas em cianobactérias parece ser um mero metabólito, mas as evidências sugerem que o impacto ambiental pode alterar as condições de uma floração e os níveis de toxina produzida. Vários estudos têm se concentrado nos fatores ambientais que podem influenciar as mudanças na produção de toxinas. A exposição de cianobactérias tóxicas a diferentes regimes ecológicos, envolvendo variação de temperatura, luz, nitrogênio, ferro, fosfato, predadores, e outros microrganismos, pode levar a mudanças principalmente no perfil das toxinas

produzidas. Por exemplo, para a produção de microcistinas por *Planktothrix agardhii* foi observada uma correlação com a intensidade de luz e com a suplementação com aminoácidos (Tonk *et al.*, 2005, 2008). Também foi proposto que a luz induz ao aumento da toxicidade por absorção de ferro em *Microcystis aeruginosa* (Utkilen & Jolme, 1995). O grupo de genes MCY contém uma região promotora com um regulador (de absorção de ferro), o que sugere que os genes MCY podem ser regulados por ferro (Martin-Luna *et al.*, 2006). Estudos sobre a produção de cylindrospermopsina foram realizados em duas cianobactérias das espécies *Aphanizomenon ovalisporum* e *Cylindrospermopsis raciborskii*. A ausência de uma fonte de nitrogênio e a alta intensidade de luz em *C. raciborskii* levaram a uma maior concentração da toxina, mesmo que o crescimento não tenha sido significativamente diferente entre os grupos (Saker & Neilan, 2001, Dyble *et al.*, 2006). Medições das toxinas só foram realizadas na fase exponencial. Para *A. ovalisporum*, a falta de fósforo, sulfato e nitrogênio, levou a uma redução do teor de Cylindrospermopsina (CYN) celular, que se acentuou ainda mais com o aumento da intensidade da luz (Shalev-Malul *et al.*, 2008, Bácsi *et al.*, 2006).

Outros estudos expuseram *Aphanizomenon flos-aquae* e *C. raciborskii*, ambos produtores de diferentes análogos de PST, a condições de cultivo semelhantes. A quantidade de toxinas produzidas por *A. flos-aquae* não foi afetada nas culturas com limitação de fósforo, mas a proporção dos diferentes análogos PST mudou no decorrer do crescimento da cultura, aumentando a produção de variantes mais tóxicas de PST. A privação de nitrogênio aumentou a produção da toxina no final da fase de crescimento (Dias *et al.*, 2002), mas em organismos diazotróficos como *A. flos-aquae*, a limitação de

nitrogênio é rapidamente superada pela fixação de N₂, de forma que a limitação de nitrogênio em fases posteriores de crescimento não pode ser inferida.

Tem sido demonstradas mudanças na toxicidade da cepa T3 de acordo com a intensidade e qualidade da luz (Carneiro *et al.*, 2009) e concentração do íon sódio (Pomati *et al.*, 2004).

Já no trabalho de Medeiros (2011) foi avaliado o comportamento da cepa T3 em diferentes temperaturas, uma temperatura tipicamente tropical de 28°C e um cultivo a temperatura mais baixa, subtropical de 16°C. Foi feito durante 37 dias de cultivo, para verificar o crescimento e o teor de toxinas. Constatou que durante a fase exponencial, a cepa cultivada a 28°C apresentou crescimento diário significativamente maior que aquele demonstrado pela cepa cultivada a 16°C. Com relação às toxinas observou-se que na fase exponencial ocorreu uma mudança na proporção dos análogos STX e Neo-STX produzidos. O teor de cada análogo diferiu significativamente entre as duas temperaturas testadas. O teor de STX por µm de *C. raciborskii* foi maior nas células a 16°C do que a 28°C, enquanto o teor de Neo-STX por µm foi maior nas células a 28°C que a 16°C.

O maior crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii* a 28° C era esperado uma vez que esta cianobactéria é originalmente uma espécie tropical e temperaturas altas estão mais associadas ao seu metabolismo de crescimento. Apesar de florações desta espécie ocorrerem tanto nas regiões tropicais quanto nas regiões subtropicais do país (Bouvy *et al.*, 2000; Yunes *et al.*, 2003; Molica *et al.*, 2002; 2005), as florações tropicais ou de verão de *C. raciborskii* podem crescer mais rapidamente que florações subtropicais ou de inverno.

O resultado relevante de Medeiros (2011) foi a mudança da proporção da produção dos análogos de acordo com a temperatura de crescimento imposta, sendo a mesma cepa T3 capaz de produzir mais STX a 16°C e mais Neo-STX a 28° C. Em laboratório, mesmo ocorrendo alteração na toxina mais acumulada, a cianobactéria *C. raciborskii*, cepa T3, não apresentou diferença significativa na sua toxicidade total teórica, expressa em equivalentes de STX, entre as temperaturas testadas. Este resultado difere do observado para alguns organismos, como a cepa C10 de *C. raciborskii* (Castro *et al.*, 2004) e os dinoflagelados *Alexandrium fundyense* (Etheridge & Roester, 2005) ou *Pyrodinium bahamense* (Gedaria *et al.*, 2007), que apresentam maior toxicidade quando expostos a temperaturas mais baixas.

Essa mudança na produção dos análogos de PSTs observada por Medeiros (2011) em *C. raciborskii* é contrária à observada no dinoflagelado de águas frias *Alexandrium fundyense*. Este dinoflagelado, em águas frias, diminui a produção de STX e aumenta a produção de Neo-STX e GTX 1+4 (Etheridge & Roester, 2005).

No trabalho Mihali *et al.*, (2009) propôs uma rota para a biossíntese das PSPs, segundo os autores as células de *C. raciborskii* produzem primeiro a toxina STX e posteriormente com alterações na molécula desta, produzem os outros análogos como a Neo-STX.

A toxicidade total da cepa T3 é o resultado da respectiva ocorrência e balanço dos análogos STX e Neo-STX, produzidos concomitantemente. Análises de amostras ambientais de florações no sul do Brasil mostraram uma tendência em aumentar o teor de saxitoxinas de 0,03 fg cel⁻¹ em 2003 para 0,18 fg cel⁻¹ em 2009 (Colvara *et al.*, 2010).

Compostos que não são naturalmente encontrados no ambiente também podem influenciar na produção de toxina. Suzuki (2000) observou que cloridrato procaína afeta o crescimento de *Anabaena cylindrica* e *Anabaena variabilis*. Pomati (2003) testou cloreto de lidocaína na cepa de *Cylindrospermopsis* T3, onde diferentes concentrações do composto apresentaram um aumento de até 298% no teor de toxina intracelular, porém sendo dependente do pH e da concentração de sódio.

Uma das cepas *C. raciborskii* com o maior número de trabalhos científicos é a cepa T3, isolada em 1996 em amostra de água coletada na represa Billings (São Paulo – Brasil) para a qual o primeiro relato de produção da toxina PSP e caracterização do perfil apresentou três toxinas (Lagos *et al.*, 1999). Lagos *et al.* (1999) mencionaram que a cepa T3 produziu saxitoxina (STX), e os epímeros gonyautoxin 2 e gonyautoxin 3 (GTX2/3) em uma proporção de 1:9. Esta cepa foi posteriormente selecionada por diferentes pesquisadores para investigar sua via de biossíntese de toxinas PST (Pomati *et al.* 2004). Embora Pomati *et al.*, (2003) tenham utilizado nos seu coquetel padrão de calibração as variantes de STX e GTX2/3, encontrou apenas a variante STX na cepa T3, eles observaram também que a cepa produz em pequena proporção o análogo N-sulfocarbamoyl derivados C1/2, não referenciados no trabalho de Lagos *et al.* (1999). Esta confusão foi posteriormente agravada por Pomati *et al.*, (2004), que consideraram o perfil "STX e C1/2" de T3 como a base para a experimentação da hipótese de uma possível nova rota para a síntese de análogos de C1/2, modificando assim a rota para biossíntese proposta por Shimizu (1996) e Sako *et al.* (2001). Kellmann *et al.* (2008) descreveram ainda um outro perfil de toxina para T3: STX, neosaxitoxin (NEO), decarbamoyl saxitoxin (DcSTX) e a toxina B1 N-sulfocarbamoyl (GTX5). Esses

autores não se referem à síntese de análogos de C1/2, estranhamente, pois na discussão mencionou trabalhos de Pomati *et al.* (2003 e 2004).

Obviamente, devido a esta discrepância, a interpretação dos resultados existentes sobre o perfil de toxina e evidência genética molecular para a via biossintética de STX e análogos da cepa T3 têm sido confusa. Além disso, o grupo brasileiro responsável pela distribuição da cepa original T3 não especificou o perfil de toxina desta, e só expressa a soma de todas áreas dos picos de toxinas como equivalentes de concentração de STX (Ferrão Filho *et al.*, 2008).

Os efeitos do estresse salino e das variações de pH na produção de toxinas de cianobactérias PSTs ainda precisam ser investigados. A alcalinidade é uma das principais características associada às florações de cianobactérias tóxicas. Este parâmetro, combinado com alta salinidade, tem sido relatado em correlação com florações de espécies produtoras de PSP, como *Anabaena circinalis* na Austrália (Bowling & Baker, 1996).

Para *Cylindrospermopsis sp* as condições que são frequentemente associadas com florações incluem: baixo fluxo, baixa proporção entre nitrogênio e fósforo, alta temperatura da água, estratificação térmica estável, pH elevado, alta concentração de sulfato, anoxia em pelo menos alguns estratos, alta turbidez, irradiação incidente alta, e biomassa de macrófitas baixa (Ramberg, 1987; Bowling 1994; Fabbro & Duivenvoorden 1996; Mayer *et al.*, 1997; McGregor & Fabbro 2000; Saker & Neilan 2001; Silva *et al.*, 2001; Briand *et al.*, 2002; Bouvy *et al.*, 1999; Tucci & Sant'Anna 2003; Chellappa & Costa 2003; Bormans *et al.*, 2004; Bouvy *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2006).

O intervalo ótimo de temperatura para o crescimento da *Cylindrospermopsis sp.* é de 25-30°C, embora possa ocorrer entre 15°C e 35°C, dependendo da espécie. A intensidade de luz ideal para o crescimento é 80-121 mmol m⁻² s⁻¹, mas o crescimento ocorre em níveis tão baixos como 22 mmol m⁻² s⁻¹ (Chonudomkul *et al.*, 2004;. Briand *et al.*, 2004;. Saker & Griffiths 2000). A salinidade máxima tolerada é de 4 (Moisander *et al.*, 2002).

3.7 CYLINDROSPERMOPSIS

Segundo Sant'Anna & Azevedo (2000) haviam sido identificados até o ano 2000, no Brasil 20 espécies de 14 gêneros de cianobactérias tóxicas. O monitoramento de mananciais tem registrado a presença e o desenvolvimento de florações de algas nocivas (FANs) em águas de abastecimento público da região sul do Brasil, nos estados do Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS), e ainda na região sudeste, no estado de São Paulo (SP), onde se tem verificado o desenvolvimento de cianobactérias produtoras de toxinas (Yunes *et al.*, 2003; 2000; Lagos *et al.*, 1999). Desta forma, exigem-se maiores investimentos das empresas de saneamento, bem como das indústrias para garantir a qualidade adequada da água e produtos destinados à população. Também têm sido registradas florações de cianobactérias no Estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS) em diversas ocasiões. (Matthiensen *et al.* 2000). A Lagoa dos Patos, encontra-se na região deste estudo, em sua planície costeira, que representa a maior área lagunar da América do Sul e a maior laguna costeira do tipo “estrangulada” do mundo (Kjerfve 1986). Esta laguna estende-se ao longo de 250 km de comprimento, possuindo uma área superficial de 10.360 km² e drena uma bacia hidrográfica de aproximadamente 200.000 km² (Möller *et al.* 1996). O sistema Lagoa dos Patos destaca-se entre as regiões

costeiras do Atlântico Sudoeste principalmente pela sua importância ecológica (zona de produção biológica e diversidade) (Asmus & Tagliani 1998).

Na região estuarina da Lagoa dos Patos o aporte de águas salgadas provenientes do Oceano Atlântico é essencialmente regido pelas condições meteorológicas da região, principalmente pelo regime de precipitação pluvial e intensidade dos ventos (Möller *et al.*, 2001, Fernandes *et al.*, 2004). De acordo com as diferentes combinações entre a intensidade deste aporte e a direção do vento incidente na Lagoa dos Patos, a salinidade da laguna tende a variar ao longo do seu comprimento, experimentando variações que alcançam de 0-34 (Castello, 1985).

A presença da cianobactéria tóxica *Cylindrospermopsis raciborskii* (Figura 3) tem sido verificada no estado do Rio Grande do Sul, e também Santa Catarina, na Lagoa do Peri (Matthiensen & Barbosa, 2003), e no nordeste do país (Bouvy *et al.*, 1999).

Florações desta também têm sido registradas em diversos países, como Austrália, Hungria, França, Estados Unidos, México e Tailândia (Bernard *et al.*, 2003). Embora fosse considerada uma espécie de regiões tropicais e sub-tropicais, tem sido encontrada em regiões temperadas (Padisák, 1997).

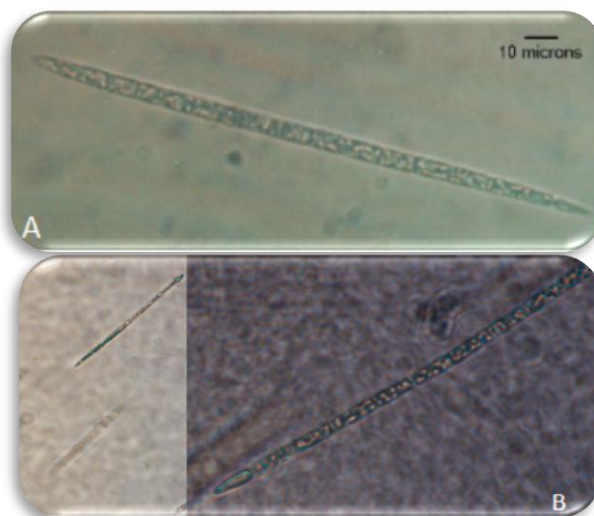


Figura 3: Fotomicrografia da *Cylindrospermopsis raciborskii*. Fonte: Imagem A Burks & Schneegurt – Cyanosite (2003), Imagem B de cepa isolada neste trabalho.

Trichodesmium erythraeum é uma cianobactéria que forma, anualmente, florações (maré vermelha) em oceanos tropicais (Carpenter, 1983; Zehr *et al.*, 2001; Lugomela *et al.*, 2002; Capone *et al.*, 2005). Em Silva (2005), foi estudada uma floração de *Trichodesmium*, que ocorreu na praia do Cassino em Rio Grande (RS), em março de 2004. Através da análise por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) foram encontrados picos no perfil cromatográfico semelhantes aos das saxitoxinas (STX, GTX-1 GTX-3 e GTX-4).

Entre as cianobactérias, *Cylindrospermopsis raciborskii* é uma cianobactéria formadora de florações com alto potencial tóxico e que vem recebendo atenção da comunidade científica devido ao seu comportamento invasivo em diversos locais no mundo (Molica *et al.*, 2002; Dyble *et al.*, 2002; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2001; Neilan *et al.*, 2003; Tucci & Sant'Anna, 2003; Briand *et al.*, 2004; Chonudomkul *et al.*, 2004; Jones & Sauter, 2005; Dufour *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2006; Mohamed, 2007;

Dvorak & Hasler, 2007). *C. raciborskii* foi descrita em 1912 a partir de material coletado pelo pesquisador Woloszynska em Java, Indonésia, e classificada inicialmente como *Anabaena raciborskii*, seção *Anabaenopsis* (Woloszynska 1912, Komarková 1998). Em 1923, Miller criou o gênero *Anabaenopsis*, caracterizado pelos heterocitos secundariamente terminais formados a partir da divisão desigual de duas células intercalares contíguas e posterior quebra do tricoma. No mesmo ano, o pesquisador Elenkin transferiu *Anabaena raciborskii* para o novo gênero, apesar do modo especial de desenvolvimento do heterocito pela divisão desigual de célula apical e pela posição primariamente terminal da célula fixadora de nitrogênio (Jeeji-Bai *et al.* 1980, Komárek & Komárková 2003). Seenayya & Subba Raju (1972) consideraram esta característica distintiva de um novo gênero, *Cylindrospermopsis*, na época monoespecífico. Desde então, nove novas espécies foram descritas (Komárek & Hauer 2004), algumas delas de importância sanitária crescente, em função da formação de florações, de sua expansão crescente por todo o mundo (Padisák 1997) e da capacidade de produção de alcalóides neuro e citotóxicos (saxitoxinas e cilindrospermopsinas) (Sivonen & Jones 1999, Codd *et al.* 2005, Falconer 2005). No Brasil, a espécie *C. raciborskii* possui ampla distribuição, sendo encontrada em corpos d'água de todo o país. Além desta espécie, é registrada no país a ocorrência de *C. philippinensis*, *C. catemaco* e *C. acuminato crispata* (Couté & Bouvy 2004).

Diversos autores têm contextualizado que a *C. raciborskii* tem característica predominante em suas ocorrências em diversas regiões, observando uma expansão de suas florações pelo mundo (Molica *et al.*, 2002; Dyble *et al.*, 2002; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2001; Neilan *et al.*, 2003; Tucci & Sant'Anna, 2003; Briand *et al.*, 2004;

Chonudomkul et al., 2004; Jones & Sauter, 2005; Dufour et al., 2006; Berger et al., 2006; Mohamed, 2007; Dvorak & Hasler, 2007).

Esta rápida expansão das *Cylindrospermopsis* demonstra sua alta capacidade de adaptação e vantagem competitiva (Padisák, 1997; Oliveira, 2005). Dentre suas estratégias adaptativas estão:

- Presença de aerótopos, que permitem o posicionamento na coluna d'água;
- Fixação de nitrogênio atmosférico, que permite o crescimento em ambientes pobres em nutrientes nitrogenados;
- Formação de acineto, que permite a formação de células de resistência em condições ambientais não ideais;
- Produção de toxinas, apesar da função das toxinas ainda não ser clara;
- Tolerância a temperaturas altas e estratificação da coluna d'água;
- Tolerância à baixa intensidade luminosa;

C. raciborskii forma florações, e a densidade máxima de células ocorre, tipicamente, entre 2 e 3 metros abaixo da superfície, sendo de difícil detecção. Outra peculiaridade atribuída a *C. raciborskii* é o fato desta não produzir compostos orgânicos voláteis, tais como geosmina e MIB (2-metil-isoborneol), que causam sabor e odor à água e são comumente associados às florações (Jones & Sauter, 2005). Comparada a outras cianobactérias, a *C. raciborskii* é pequena, apresentando filamentos (tricomas) com cerca de 2 a 3 µm de largura e comprimento bastante variável (Jones & Sauter, 2005). A similaridade entre os morfo tipos, outras espécies de *Cylindrospermopsis* e mesmo outras cianobactérias, dificulta a sua identificação.

Apesar de descrita originalmente para regiões tropicais (Java, Indonésia), observou-se um aumento na frequência de florações de *C. raciborskii* nos trópicos (Branco & Senna, 1994) e a espécie também tem sido observada em regiões subtropicais (Vidal & Kruk, 2008) e temperadas (Fastner *et al.*, 2003). Atualmente, sua distribuição alcança regiões ao norte da Europa (Wiedner *et al.*, 2002), Nova Zelândia (Ryan *et al.*, 2003), África do Sul e América do Norte (Vidal & Kruk, 2008). Na América do Sul, *C. raciborskii* é muito conhecida nas águas tropicais e sub-tropicais brasileiras (Huszar *et al.*, 2000) e subtropicais uruguaias (Vidal & Kruk, 2008), tendo sido encontrada como espécie não dominante na Argentina (De Tezanos-Pinto *et al.*, 2006). A produção de toxinas por *C. raciborskii* é geograficamente diversa. Em alguns continentes produz PSTs e em outros, Cilindropermopsinas que é uma citotoxina, que em humanos afeta o fígado e os rins (Tabela 4).

A *C. raciborskii* foi relatada como produtora de cilindropermopsina e deoxicilindropermopsina na América do Norte, Ásia e Oceania, e de saxitoxinas no Brasil (Tabela 4). Na Europa, a produção de cilindropermopsina pela espécie ainda é matéria de controvérsia (Fastner *et al.*, 2007), embora a toxina tenha sido detectada em corpos d'água europeus concomitantemente à ocorrência de *Cylindropermopsis raciborskii*, a espécie não foi confirmada como sua produtora (Fastner *et al.* 2003, 2007). Entretanto, outros compostos tóxicos são relatados tanto para a Europa, como para a África (Tabela 4).

Outra cianobactéria estudada é o gênero *Raphidiopsis*, que tem importância, quanto à produção de toxina (Fritsch & Rich 1929), que possui ampla distribuição geográfica no mundo (Falconer 2005). Já foram descritas até o momento seis espécies, das quais foram identificadas três espécies produtoras de cianotoxinas, sendo duas

produtoras de neurotoxinas (saxitoxinas, anatoxinas) (Namikoshi *et al.* 2003, 2004, Mohamed 2007, Yunes *et al.* 2007, 2009) e de citotoxinas (Cilindrospermopsina e Deoxicilindrospermopsina) (Tabela 5). Sendo que no Brasil, *Raphidiopsis brookii* foi relatada como produtora de “*Paralytic Shellfish Toxin*” (PSTs), sendo este o primeiro registro de produção de saxitoxinas pelo gênero (Yunes *et al.* 2007)., (Tabela 5).

Tabela 4 Toxinas produzidas por *Cylindrospermopsis raciborskii* no mundo.

Toxina produzida	Origem	Referência
Cilindrospermopsina	Austrália	Hawkins <i>et al.</i> 1985, 1997, Ohtani <i>et al.</i> 1992, Falconer <i>et al.</i> 1998, Saker & Griffith 2000, Saker <i>et al.</i> 1999, Mc Gregor & Fabbro 2000, Saker & Neilan 2001
	Estados Unidos	Carmichael 2001
	China	Shen <i>et al.</i> 2002
	Tailândia	Li <i>et al.</i> 2001
	Nova Zelândia	Wood & Stirling 2003
	Japão e Tailândia	Chonudomkul <i>et al.</i> 2004
Deoxicilindrospermopsina	Austrália	Norris <i>et al.</i> 1999
	Tailândia	Li <i>et al.</i> 2001
	Nova Zelândia	Wood & Stirling 2003
Saxitoxinas (PSTs)	Brasil (SP)	Lagos <i>et al.</i> 1999, Pomati <i>et al.</i> 2003,2004, Castro <i>et al.</i> 2004, Yunes <i>et al.</i> 2003
	Brasil (PR, RS)	Yunes <i>et al.</i> 2003
	Brasil (PE)	Molica <i>et al.</i> 2002
Anatoxina	Hungria	Kiss <i>et al.</i> 2002
β -N-methylamino-L-alanine (BMAA)	Austrália	Cox <i>et al.</i> 2005

Tabela 5. Toxinas produzidas por espécies do gênero *Raphidiopsis* no mundo

Toxina produzida	Origem	Referência
Cilindropermopsina e Deoxicilindropermopsina	China	Li <i>et al.</i> 2001
Anatoxina-a, homoanatoxina-a	Japão	Namikoshi <i>et al.</i> 2003, 2004
PSTs	Brasil (Rio Grande do Sul)	Yunes <i>et al.</i> 2007

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de *C. raciborskii* foi feito por Palmer (1969) para o Lago Paranoá em Brasília, que na época identificou a população encontrada como *Aphanizomenon flos-aquae*. Atualmente, sabe-se que se tratava de *C. raciborskii* (Branco & Senna 1991). Na década de 80, passou-se a verificar a ocorrência desta cianobactéria em outras regiões brasileiras (Sant'anna *et al.*, 1988; Torgan & Garcia, 1989). A partir da década de 90, observou-se grande expansão na distribuição de *C. raciborskii*, devido ao aumento da eutrofização dos sistemas aquáticos nas mais diversas regiões do país (Branco & Senna, 1991; 1994; Padisák, 1997; Bouvy *et al.*, 2000; Huszar *et al.*, 2000; Sant'anna & Azevedo, 2000; Azevedo & Brandão, 2003; Nishimura *et al.*, 2008).

Apesar de não ter sido confirmada a presença de toxina em todos os casos, a presença de cianobactérias produtoras de PSTs já foi registrada em vários mananciais e em diferentes regiões brasileiras (Tabela. 6).

Tabela 6. Alguns mananciais brasileiros onde foi registrada a presença de cianobactérias produtoras de PSTs.

Local	Manacial	Gênero	Região	PSTs	Fonte
Maracanaú/CE	Maracanaú	<i>Anabaena</i>	NE	NI	Yunes <i>et al.</i> , 2003
Itapiuna/CE	Castro	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Ferreira <i>et al.</i> , 2008
Fortaleza/CE	Acarape do Meio	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Barroso <i>et al.</i> , 2004
Pacatuba /CE	Gavião	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Von Sperling <i>et al.</i> , 2008
Assu/RN	Armando Ribeiro Gonçalves	<i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Aphanizomenon</i>	NE	sim	Costa <i>et al.</i> , 2006
Cruzeta/RN	Cruzeta	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Chellapa <i>et al.</i> , 2008
São João do Sabugi/RN	Sabugi	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	não	Panosso <i>et al.</i> , 2007
Caicó/RN	Itans	<i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Anabaena</i>	NE	sim	Panosso <i>et al.</i> , 2007
São José do Seridó/RN	Passagem das Traíras	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i>	NE	não	Panosso <i>et al.</i> , 2007
Parelhas/RN	Boqueirão de Parelhas	<i>Anabaena</i>	NE	não	Panosso <i>et al.</i> , 2007
Acari/RN	Gargalheiras	<i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Anabaena</i>	NE	não	Panosso <i>et al.</i> , 2007
Itatuba/PB	Acauã	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Mendes <i>et al.</i> , 2003
Congo/PB	Cordeiro	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	França <i>et al.</i> , 2009
Recife/PE	Tapacurá	<i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Anabaena</i>	NE	sim	Molica <i>et al.</i> , 2005
Ipojuca/PE	Ipojuca	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Aragão <i>et al.</i> , 2009
Uruburetama/PE	Mundaú	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Oliveira & Moura, 2009
Pedra/PE	Arcoverde	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Dias, 2009
Surubim-Cumaru/PE	Jucazinho	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Travassos Junior <i>et al.</i> , 2005
Serra Talhada/PE	Saco I	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Cardoso <i>et al.</i> , 2006
Araripina/PE	Araripina	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000

NI= não informado

Local	Manacial	Gênero	Região	PSTs	Fonte
Araripina/PE	Lagoa do Barro	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Araripina /PE	Rancharia	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Araripina/PE	Barriguda	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Gergelim/PE	Gergelim	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Bodocó/PE	Lopes II	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Ouricuri/PE	Algodões	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Parnamirim/PE	Entremontes	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Parnamirim/PE	Chapéu	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Serra Talhada/PE	Jazigo	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Serra Talhada/PE	Cachoeira II	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Carnaíba/PE	Chinelo	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
São José do Egito/PE	São José II	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Iguaraci-Ingazeira/PE	Rosário	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Afogados da Ingazeira/PE	Brotas	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Ibimirim/PE	Poço da Cruz	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Custódia/PE	Custódia	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Cedro/PE	Barrinha	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Itapetim/PE	Boa Vista	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Pedra/PE	Mororó	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Venturosa/PE	Ingazeira	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Pesqueira/PE	Ipaneminha	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Buíque/PE	Buíque	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Itaíba/PE	Itaíba	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Iati/PE	Iati	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Bouvy <i>et al.</i> , 2000
Pesqueira/PE	Pão de Açúcar	<i>Cylindrospermopsis</i>	NE	NI	Huszar <i>et al.</i> , 2000
Belém/PA	Utinga	<i>Aphanizomenon</i>	NE	NI	Vieira <i>et al.</i> , 2005
Manaus/AM	5 ambientes (NI)	<i>Anabaena</i>	N	NI	Ribeiro <i>et al.</i> 2009

NI= não informado

Local	Manacial	Gênero	Região	PSTs	Fonte
AM	Rio Amazonas	<i>Cylindrospermum</i> e <i>Anabaena</i>	N	NI	Fiore <i>et al.</i> , 2005
AM	Rio Solimões	<i>Cylindrospermum</i> e <i>Anabaena</i>	N	NI	Fiore <i>et al.</i> , 2005
AM	Rio Negro	<i>Cylindrospermum</i> e <i>Anabaena</i>	N	NI	Fiore <i>et al.</i> , 2005
AM	Rio Japurá	<i>Cylindrospermum</i> e <i>Anabaena</i>	N	NI	Fiore <i>et al.</i> , 2005
AM	Rio Madeira	<i>Cylindrospermum</i> e <i>Anabaena</i>	N	NI	Fiore <i>et al.</i> , 2005
Corumbá/GO	Corumbá	<i>Cylindrospermopsis</i>	CO	NI	Bazza <i>et al.</i> , 1999
Brasília/DF	Paranoá	<i>Cylindrospermopsis</i>	CO	NI	Branco & Senna, 1991
Ilha Mutum/MS	Lagoa do Osmar	<i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i>	CO	NI	Jati <i>et al.</i> , 2006
MS/PR	Lagoa das Garças	<i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i>	CO	NI	Jati <i>et al.</i> , 2006
MS/PR	Lagoa Ventura	<i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i>	CO	NI	Jati <i>et al.</i> , 2006
MS/PR	Rio Baía	<i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i>	CO	NI	Jati <i>et al.</i> , 2006
MS/PR	Rio Paraná	<i>Anabaena</i> e <i>Aphanizomenon</i>	CO	NI	Jati <i>et al.</i> , 2006
Belo Horizonte/MG	Pampulha	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	sim	Carvalho <i>et al.</i> , 2009
Medina/MG	Ribeirão	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	NI	Viana, 2009
Pedra Azul/MG	Soberbo	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	NI	Viana, 2009
Ouro Preto/MG	Rio das Velhas	<i>Anabaena</i>	SE	NI	Jardim <i>et al.</i> , 2009
Contagem/MG	Vargem das Flores	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	NI	Von Sperling., 2008
Lagoa Santa/MG	Lagoa Santa	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	NI	Figueredo & Giani., 2009
Cariacica/ES	Duas Bocas	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	NI	Fernandes <i>et al.</i> , 2004
Resende/RJ	Funil	<i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Anabaena</i>	SE	sim	Ferrão-Filho <i>et al.</i> , 2008
Barra do Piraí/RJ	Lajes	<i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Anabaena</i>	SE	não	Ferrão-Filho <i>et al.</i> , 2008
Araruama/RJ	Juturnaíba	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	NI	Huszar <i>et al.</i> , 2000
Marica/RJ	Lagoa da Barra	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	NI	Huszar <i>et al.</i> , 2000
São Paulo/SP	Taiáçupeba	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	sim	Yunes <i>et al.</i> , 2003
São Paulo/SP	Guarapiranga	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	sim	Gemelgo <i>et al.</i> , 2008
São Paulo/SP	Billings	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	sim	Gemelgo <i>et al.</i> , 2008

NI= não informado

Local	Manacial	Gênero	Região	PSTs	Fonte
São Paulo/SP	Rio Grande	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	sim	Yunes <i>et al.</i> , 2003
São Paulo/SP	Guaraú	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	sim	Yunes <i>et al.</i> , 2003
São Paulo/SP	Jacaraí	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	sim	Yunes <i>et al.</i> , 2003
São Paulo/SP	Jundiaí	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	sim	Yunes <i>et al.</i> , 2003
São Paulo/SP	Lago das Garças	<i>Cylindrospermopsis</i>	SE	NI	Tucci & Sant'Anna, 2003
Barra Bonita/SP	Barra Bonita	<i>Anabaena</i>	SE	NI	Gouvêa <i>et al.</i> , 2005
São Carlos/SP	Monjolinho	<i>Anabaena</i>	SE	não	Sotero-Santos <i>et al.</i> , 2008
Curitiba/PR	Iraí	<i>Cylindrospermopsis</i>	S	sim	Yunes <i>et al.</i> , 2003
Ponta Grossa/PR	Alagados	<i>Cylindrospermopsis</i>	S	sim	Yunes <i>et al.</i> , 2003
Florianópolis/SC	Peri	<i>Cylindrospermopsis</i>	S	sim	Grellmann, 2006
São Bento do Su/SC	Rio Vermelho	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Anabaena e Lyngbya</i>	S	NI	Figueiredo, 2004
São Bento do Sul/SC	Rio Negrinho	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Anabaena e Lyngbya</i>	S	NI	Figueiredo, 2004
Fraiburgo/SC	Rio Mansinho	<i>Anabaena</i>	S	NI	Bento <i>et al.</i> , 2009

NI= não informado

A ocorrência de cianobactérias que produzem PSTs em águas brasileiras é uma realidade incontestável, o que requer atenção cada vez maior no que diz respeito ao uso da água dos mananciais. Além disto, o crescimento de peixes e crustáceos em estações de cultivo em águas doce, salobras ou marinhas pode estar sujeito à contaminação por toxinas, tendo em vista a rápida disseminação de florações produtoras de PSTs em águas brasileiras. E na região sul do Brasil há indícios que as florações de cianobactérias estão cada vez mais frequentes, e dentre as espécies, a *Cylindrospermopsis* é uma das que se destacam (Chaves *et al.*, 2009, Yunes *et al.*, 2003 Grellmann, 2006, Figueiredo, 2004, Bento *et al.*, 2009). Com isto, as PSTs estão sendo encontradas com maior frequência, visto que são produzidas por esta espécie (Yunes *et al.*, 2003 Grellmann, 2006).

3.8 ISOLAMENTOS E CULTIVOS

A importância da obtenção de culturas de cianobactérias está na grande variedade com que as mesmas podem e devem ser utilizadas: estudos genéticos, taxonômicos citológico, fisiológicos, nas pesquisas de caráter experimental (Magalhães *et al.* 2006) .

Apesar da existência de grande variedade de cianobactérias morfológicamente diferentes em diferentes habitats terrestres e aquáticos, trabalhos com cepas destas bactérias têm sido restritos, com relativamente poucos representantes. As dificuldades encontradas parecem ser, em parte, pelo isolamento e pela, subsequente, purificação dessas cianobactérias (Castenholz 1988).

O ágar, que é rotineiramente usado como um agente de solidificação em meios bacteriológicos, pode conter impurezas (Allen & Gorham 1981, Bretscher & Kaiser 1978) e algumas destas são responsáveis pela inibição do crescimento de algumas cianobactérias (Allen & Gorham 1981). Diferentes abordagens têm sido usadas numa tentativa de baixar ou eliminar os efeitos inibitórios do crescimento, estas incluíram o uso de concentrações de ágar baixo (Shirai *et al.*,1989), a esterilização separada de soluções ágar e nutrientes, a substituição de agarose para outras alternativas de agentes solidificantes (Shirai *et al.*,1989 , Thiel *et al.*, 1989), filtração diferencial (Heaney & Jaworski 1977, Meffert & Chang 1978) e transferência repetida de células (Vaara *et al.*, 1979). Outras abordagens têm envolvido o uso de um agente que é considerado relativamente inofensivo para as cianobactérias, mas é tóxico para os contaminantes. Agentes utilizados incluíram fenol (Carmichael & Gorham. 1974.), hipoclorito de sódio à temperatura elevada (Wieringa, 1968) e antibióticos (Rippka 1988).

Um aspecto frustrante de lidar com cianobactérias seja o trabalho muitas vezes árduo e demorado, que está envolvido na tentativa de produzir culturas em contraste, com a baixa taxa de sucesso. Algumas técnicas foram adotadas na tentativa de desenvolver métodos mais eficientes para purificar as cepas de cianobactérias.

Como parte dos estudos para explorar as cianobactérias como possível fonte de PSTs, buscou-se desenvolver diferentes métodos para o isolamento e purificação de cianobactérias.

3.9 MÉTODOS PARA DETECTAR PSTs

As PSTs estão entre as toxinas naturais com maior grau de toxicidade, como as florações de organismos produtores destas toxinas, são cada vez mais frequentes, é de grande importância existirem métodos analíticos para monitorar estas toxinas (Molica *et al.*, 2002; Neilan *et al.*, 2003; Tucci & Sant'Anna, 2003; Briand *et al.*, 2004; Chonudomkul *et al.*, 2004; Jones & Sauter, 2005; Dufour *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2006; Mohamed, 2007; Dvorak & Hasler, 2007).

Os métodos que permitem detectar a presença das PSTs são os bioensaios com camundongos, as análises utilizando kits imunoenzimático tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), e a cromatografia líquida, os quais são descritas detalhadamente a seguir.

3.9.1 BIOENSAIO

Inicialmente a técnica mais usada para determinar as toxinas PSTs era “Bioensaio com camundongo”, que foi aplicado primeiro por Sommer e Meyer (1937) em extratos ácidos de mexilhões da Califórnia. O procedimento geral foi padronizado e validado em uma série de estudos inter-colaborativos (*Association of Official Analytical Chemists*; AOAC, “Associação de Química Analítica Oficial”, 1990). Este método é reconhecido

internacionalmente para quantificar a toxicidade das PSTs e é usado no mundo em programas de monitoramento, embora com alguma variação no limite de regulamentação de toxicidade aceitável.

Para este ensaio, uma amostra da biomassa da floração é coletada, centrifugada, e liofilizada. É preparado um extrato com solução fisiológica, o qual posteriormente ultrasonificado para que ocorra a lise celular. Esse extrato é injetado intraperitoneal em diferentes doses em camundongos machos.

Por um período de 24 horas é observado o comportamento e registrados os efeitos e eventual morte dos organismos teste. Geralmente, uma floração neurotóxica causa a morte dos animais em poucas horas ou minutos. Os animais são observados para ver se apresentam os sintomas da contaminação por PSTs, tais como saltos logo após a injeção, seguido de morte em menos de 15 minutos por parada respiratória. O tempo de injeção inicial até morte do camundongo é registrado e a toxicidade é determinada (em unidades de camundongos). Uma unidade de camundongo é a quantidade de toxina necessária para matar um camundongo de 20g num tempo de 15 minutos. Várias diluições do extrato podem ser necessárias para obter um valor mais baixo da concentração e dentro deste limite. (Sommer & Meyer, 1937; Hall *et al.*, 1990).

Finalmente, após a padronização dos camundongos em unidades são convertidas em unidades de toxicidade (μgSTXeq) por 100g de amostra. Os resultados dos testes com camundongos são expressos em DL_{50} (dose onde é verificada a morte de 50% dos organismos).

Existem algumas ressalvas a serem consideradas, como a diferenças entre os laboratórios, espécie do camundongo, sacrifício de animais (questões éticas) e baixa precisão dos resultados.

Considerações éticas contra sacrificar um grande número de animais são uma crítica crescente sobre os órgãos reguladores e pesquisadores, visando pressioná-los a fornecer métodos alternativos. Vários outros métodos são descritos na literatura. Dentre eles podem ser citados dois: - os ensaios bioquímicos delineados para estimar a toxicidade total (Usleber *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 1996; Jellett *et al.*, 2002); e as técnicas de química analítica capazes de proporcionar uma maior detecção e seletividade dos análogos individuais da toxina (Lawrence *et al.*, 1995; Locke & Thibault, 1994; Oshima, 1995; Pleasance *et al.*, 1992; Sullivan & Wekell, 1986).

3.9.2 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Os ensaios imunoenzimáticos ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), baseiam-se na interação anticorpo-antígeno, e são amplamente usados em análises de diferentes compostos, e também muito utilizados para análises de cianotoxinas, sendo já bem difundidos para microcistinas. Porém, são poucos os estudos a cerca dos kits para análise de PSTs que recentemente foram disponibilizados no mercado.

A toxina presente na amostra compete com o conjugado (Enzima-Toxina) na reação por um número limitado de anticorpos ligados à superfície de cada cavidade da placa. Após uma simples etapa de lavagem, o resultado deste processo competitivo pode ser visualizado com o desenvolvimento de cor. Como todo Imunoensaio Competitivo, a concentração de toxina é inversamente proporcional ao desenvolvimento da cor.

O kit ELISA para Saxitoxina é utilizado para a análise semi-quantitativa de saxitoxina em amostras de florações de cianobactérias. A curva de calibração é feita com um padrão PST (STX) de concentrações conhecidas e é praticamente linear. O kit utiliza um anticorpo policlonal de coelho, que mostra reação diferenciada (cruzada) para cada análogo de PSTs, sendo exata apenas para a variante STX.

Os imunoenaios para PSTs tem reatividade diferente para os análogos da toxina, sendo assim sua exatidão é comprometida. Cada fabricante apresenta diferente faixa de concentração de trabalho e diferentes reatividades, (exceto a STX, quantificação é errada e subestimada para cada análogo das variantes de PSTs), os resultados das análises de cada variante testada, são descritos no manual, sendo percentuais de reação, ou seja, um percentual de quantificação. Abaixo são apresentados alguns exemplos dos imunoenaios que estão disponíveis no mercado e seus dados:

Kit Abraxis.

No Kit comercial da Abraxis, a variante de PST usada como padrão para o levantamento da curva de calibração é a STX e estão nas concentrações de 0,00 (controle), 0,02 0,05, 0,10, 0,20 e 0,40 $\mu\text{g L}^{-1}$. Juntamente ao material do kit vem um catálogo onde se encontram algumas especificações do produto, entre as informações descreve que o kit apresenta uma “reatividade cruzada” que resulta em uma quantificação relativa apresentada na Tabela 7.

Tabela 7: Reatividade Cruzada de cada variante de PSTs do Kit ABRAXIS.

Variante de PST	Quantificação relativa %
Saxitoxin (STX)	100
Decarbamoyl STX	29
GTX 2 & 3	23
GTX-5B	23
Sulfo GTX 1 & 2	2,0
Decarbamoyl GTX 2 &3	1,4
Neosaxitoxin	1,3
Decarbamoyl Neo STX	0,6
GTX 1& 4	<0,2

Kit Bioo Scientific.

No Kit comercial da Bioo Scientific, a variante de PST usada como padrão para o levantamento da curva de calibração é a STX e estão nas concentrações de 0,00 (controle), 0,02 0,04, 0,08, 0,16 e 0,32 $\mu\text{g L}^{-1}$. Juntamente ao material do kit vem um catálogo onde se encontram algumas especificações do produto, entre as informações descreve que o kit apresenta uma “reatividade cruzada” que resulta em uma quantificação relativa apresentada na Tabela 8.

Tabela 8: Reatividade cruzada de cada variante de PSTs do Kit Bioo Scientific

Variante de PST	Quantificação relativa %
Saxitoxin (STX)	100
Decarbamoyl STX	31
GTX 2 & 3	25
GTX-5B	21
Decarbamoyl GTX 2 &3	1,7
Neosaxitoxin	1,3
Decarbamoyl Neo STX	0,5
GTX 1& 4	<0,2

Kit Beacon.

No Kit comercial da Beacon, a variante de PST usada como padrão para o levantamento da curva de calibração é a STX e estão nas concentrações de 0,00 (controle), 0,02, 0,08 e 0,32 $\mu\text{g L}^{-1}$. Juntamente ao material do kit vem um catálogo onde se encontram algumas especificações do produto, entre as informações descreve que o kit apresenta uma “reatividade cruzada” que resulta em uma quantificação relativa apresentada na (Tabela 9.)

Tabela 9: Reatividade cruzada de cada variante de PSTs do Kit Beacon

Variante de PST	Quantificação relativa %
Saxitoxin (STX)	100
Decarbamoyl STX	18
GTX 2 & 3	12
Decarbamoyl GTX 2 &3	0,4
Neosaxitoxin	0,8
Decarbamoyl Neo STX	0,7
GTX 1& 4	<0,1

Kit Ridascreen.

No Kit comercial da Ridascreen, a variante de PST usada como padrão para o levantamento da curva de calibração é a STX e estão nas concentrações de 0,00 (controle), 0,01, 0,03, 0,09 0,27 e 0,81 $\mu\text{g L}^{-1}$. Juntamente ao material do kit vem um catálogo onde se encontram algumas especificações do produto, entre as informações descreve que o kit apresenta uma “reatividade cruzada” que resulta em uma quantificação relativa apresentada na Tabela 10.

Tabela 10: Reatividade cruzada de cada variante de PSTs do Kit Ridascreen.

Variante de PST	Quantificação relativa %
Saxitoxin (STX)	100
Decarbamoyl STX	10-30
GTX 2 & 3, GTX-5B, C1 e C2	10-30

Apesar de existirem inúmeros Kits no mercado para determinação das PSTs, há muita polêmica e controvérsia com relação ao uso deles como ferramenta de monitoramento para quantificação das PSTs. Segundo Casais (1991), estes ensaios imunoenzimáticos têm uma série de inconvenientes, tais como a incapacidade de detectar de forma eficiente a baixa toxicidade e diferenciar os análogos .

Segundo Sullivan & Wekell (1988), o número de diferentes variantes de PSTs e sua tendência para a transformação química em outros análogos tóxicos são os principais fatores que interferem em uma análise qualitativa e quantitativa e que impedem o desenvolvimento de um teste de campo simples para determinar as toxinas.

3.9.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em inglês: *High Performance Liquid Chromatography*, (HPLC) é um método físico-químico de separação no qual os constituintes da amostra são particionados em duas fases, uma estacionária e outra móvel (fluido que percola através da primeira). A fase estacionária empregada pode ser um sólido ou um líquido enquanto que a fase móvel deve ser um líquido. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos através da comparação de picos dos analitos com os do padrões previamente existentes.

Para atingir a alta sensibilidade e especificidade no monitoramento das toxinas PSTs e para evitar a morte excessiva de ratos, Sullivan *et al.* (1985) e Nagashima *et al.* (1987) desenvolveram métodos de análise de toxinas por cromatografia líquida (CLAE). Mais tarde foram desenvolvidos métodos para confirmar as PSTs e para determinar os

perfis de toxinas (Franco & Fernández 1993, Oshima 1995, Lawrence & Niedzwiadek 2001, Vale & Sampayo, 2001).

Dentre os métodos mais utilizados para a detecção de toxinas paralisantes (PSTs) através de CLAE e detecção por fluorescência (CLAE-RF), um se dá por derivatização (reação de oxidação que dá as moléculas de PST a característica de fluorescer) pré-coluna (Lawrence *et al.*, 1995) e outro por derivatização pós-coluna (Oshima, 1995).

O método Lawrence *et al.* (1995) que utiliza derivatização pré-coluna consiste em uma reação de derivatização com periodato, em 100 μL de amostra neutralizada com hidróxido de sódio 200 mmol L^{-1} , adiciona-se 250 μL de solução oxidante (30 mmol L^{-1} de ácido periódico, formiato de amônio e bifosfato de sódio, corrigido o pH a 8,2 com hidróxido de sódio 200 mmol L^{-1}), é feita a homogeneização e deixado em repouso por 1 minuto sob temperatura ambiente, adicionando-se então 2,5 μL de ácido acético concentrado. Após 10 minutos a amostra é injetada no sistema cromatográfico. A quantificação é feita por comparação direta com o padrão comercial de PSTs, submetido às mesmas condições de oxidação.

Este método apresenta desvantagem, pois apesar de ser apenas uma corrida no cromatógrafo, seus cromatogramas (Figura 4) apresentam uma anomalia da linha de base resultante dos reagentes utilizados na derivatização sobrepondo os picos das toxinas, causando problemas na integração dos picos e na determinação da quantidade de toxina presente na amostra (Rodríguez *et al.* 2010, Costa *et al.* 2009).

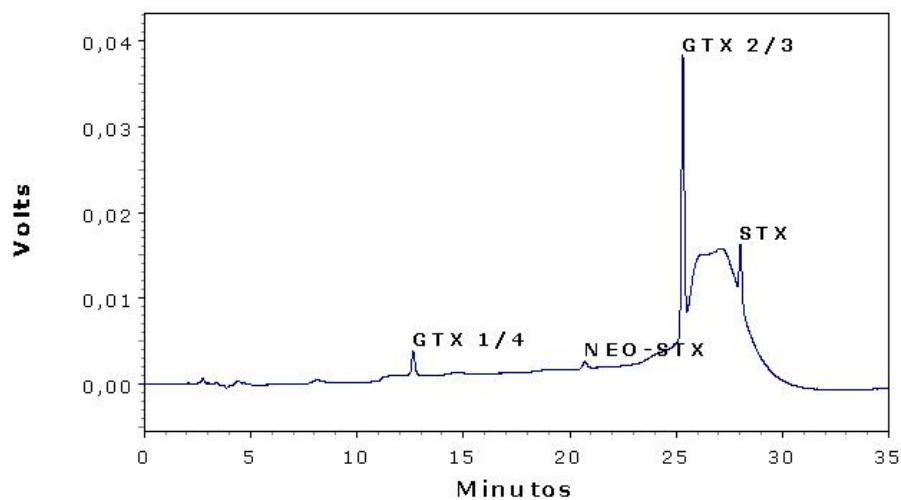


Figura 4: Cromatograma dos padrões de PSTs em derivatização pré-coluna segundo a técnica de Lawrence (1995).

Já no método de Oshima (1995) com derivatização pós-coluna, é necessário que se faça duas análises para detecção dos diferentes grupos de PSTs (STX, Neo-STX, DcSTX) e (GTX1, GTX2, GTX3, GTX4 e GTX5) gerando assim dois cromatogramas (Figura 5). A derivatização das toxinas ocorre após a separação na coluna cromatográfica através da oxidação da amostra ou do padrão, com ácido periódico em banho-maria a 80°C. A reação é então cessada pelo acréscimo de ácido acético. O procedimento ocorre em fluxo contínuo, com auxílio de bombas adicionais ligadas ao sistema. A detecção do composto derivatizado se dá pela medida da fluorescência emitida.

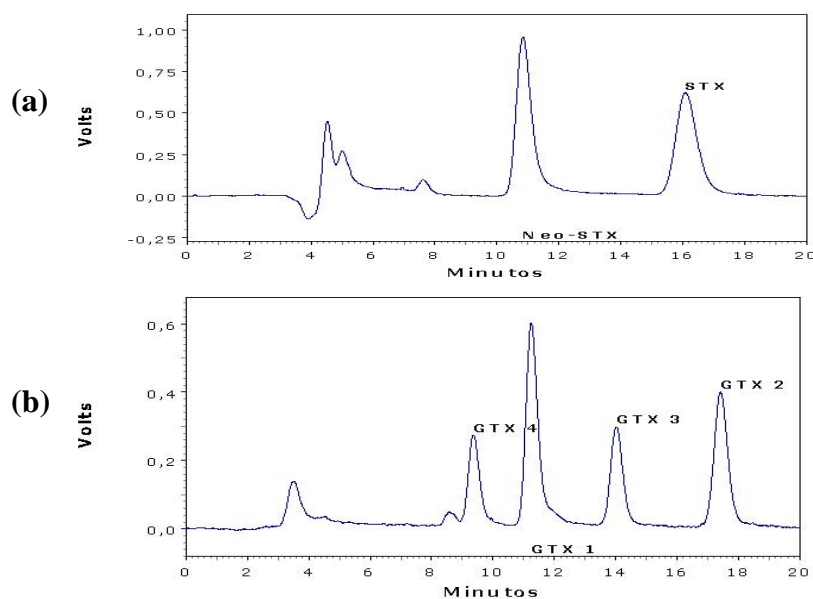


Figura 5: Padrões de PSTs em derivatização pós-coluna segundo a técnica de Oshima (1995), em duas separações. (a) STX, neo-SXT e dc-STX; (b) GTX 1-5.

Apesar do método de Oshima (1995) apresentar melhores cromatogramas, como visto na figura 5, o método de cromatografia líquida que foi validado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para determinação PSTs é o de Lawrence *et al.* (2005) e agora está incluído nas diretivas da União Européia (Regulamento CE n.º 1664/2006) para atuar como uma alternativa legal para o Bioensaio. Apesar disso este método não é considerado prático para triagem rápida das toxinas, devido à sua natureza demorada e exigência de equipamentos caros e profissionais com experiência considerável.

Com o avanço da tecnologia, vários estudos têm analisado de PSTs por espectrometria de massas (EM e EM/EM), CLAE-EM e CLAE EM/EM, principalmente usando como interface entre CLAE e a EM a ionização por *electrospray* (Quilliam 2003, Johnson *et al.*, 2009). Porém, por se tratar de isômeros e pelo fato da molécula ser

instável, esta ainda é uma técnica com alguns obstáculos a serem ultrapassados, conforme descrito por Dorr *et al.* (2011).

Alguns autores têm comparado os métodos de Lawrence *et al.*,(1995) e o de Oshima (1995) para determinação de toxinas PSTs por CLAE (Rodríguez *et al.* 2010, Costa *et al.* 2009). Embora ambos os métodos tenham sofrido modificações contínuas, ainda existem algumas vantagens e desvantagens que os tornam difíceis de empregar como métodos oficiais.

O método de Oshima (1995) tornou-se recentemente muito popular, porque pode separar cromatograficamente todas as PSTs. No entanto, não é um método muito aplicável para monitoramento, porque necessita realizar três diferentes ensaios demorados para determinar a presença de todas as toxinas. O método de derivatização pré-coluna proposto por Lawrence e Ménard (Lawrence *et al.* 1991a, 1991b.,1995.,1996), também consome muito tempo e não separa todas as toxinas, mas tem o limite de detecção menor que o método de Oshima(Rodríguez *et al.* 2010, Costa *et al.* 2009). Isto é especialmente importante em níveis de segurança, porque amostras que contêm menor quantidade de toxinas podem ser quantificadas pelo método Lawrence *et al.* (1995), em concentrações aproximadamente 10 menores do que o Limite de Quantificação do método de Oshima (1995). Contudo o método de Lawrence *et al.* (1995) não é fácil de implementar em uma rotina diária (Ben-Gigirey *et al.* 2007).

3.10 PURIFICAÇÃO DE PSTs

Uma série de métodos analíticos tem sido desenvolvida até o momento, entre eles temos a Cromatografia Líquida com Detecção por Fluorescência (CLAE-FD) e por espectrometria de massas (CL-EM e CL-EM/EM). Estas metodologias cromatográficas, assim como nos ensaios imunoenzimáticos, precisam indispensavelmente, de um padrão para calibração.

Nas publicações científicas são poucos os artigos que descrevem metodologias para produção de padrões de cianotoxinas, e para PSTs são ainda mais raros. A publicação que melhor detalha a metodologia é o de Laycock *et al.*(1994), sendo que os demais trabalhos fazem referência a este artigo, como Watanabe *et al.* (2011), que se deteve nas interconverções dos análogos de PSTs tendo usado duas colunas nas purificações, as mesmas do trabalho de Laycock *et al.*,(1994) porém com dimensões menores. No trabalho, Laycock e colaboradores (1994) ressaltaram a importância da escolha do organismo produtor da toxina a partir do qual será feita a purificação, principalmente devido à natureza da matriz e seus interferentes. Assim, eles consideraram que a produção dos padrões de PSTs a partir de algas e cianobactérias poderiam ser mais simples e mais eficientes do que a partir de marisco. Por outro lado, um tempo considerável e esforço são necessários para cultivar algas ou cianobactérias em quantidades suficientes, por isso optaram pelos mariscos que podem ser encontrados no ambiente já com grande quantidade de PSTs bioacumuladas. Comumente, mariscos são encontrados com até 50mg/100g de hepatopancreas (Hsu *et al.*,1979) enquanto uma *Aphanizomenon flos-aquae*, por exemplo, tem apenas 3mg/100g de células de toxina. Estes dados concluíram que a cianobactéria tem muito menos toxinas por grama e, além disto, é mais difícil obter 100g de células de

cianobactéria do que 100g de hepatopâncreas de marisco, por isso optaram pelo marisco.

Mesmo cientes que um hepatopâncreas é uma matriz com muitos interferentes, Laycock *et al.* (1994) optaram por desenvolver uma metodologia para esta matriz, a qual foi complexa e demorada. Para isso, utilizaram uma coluna cromatográfica de permeação em gel com 2,6cm de diâmetro e 80 cm de comprimento, Bio-Gel P2, onde o eluente é ácido acético $0,1\text{mol L}^{-1}$, e a eluição total tem um tempo de duração de 26h 40min. Para concluir a purificação, cada grupo de toxinas passa por mais uma coluna de troca iônica, Bio-Rex-70 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) de 2,6cm de diâmetro e 20cm de comprimento, onde a fase móvel é Tris-HCl 2mol L^{-1} pH 7,5. Nesta metodologia o monitoramento das frações para saber onde se encontravam as variantes foi realizado através de eletroforese capilar com detecção em UV no comprimento de onda de 200nm, visto que, segundo Thibault *et al.*, (1991), as PSTs em altas concentrações absorvem naquele comprimento de onda.

Embora alguns padrões de calibração estejam disponíveis comercialmente a partir do National Research Council do Canada (NRC), a falta de padrões de calibração tem dificultado a implementação destas técnicas no monitoramento de rotina de PSTs (Watanabe *et al.*, 2011) e o uso em experimentos científicos, como avaliação dos seus efeitos no ambiente, remoção das toxinas entre outros. No Brasil, a obtenção destes padrões é ainda mais difícil por ter que ser importado, o que requer um tempo maior de entrega do produto e onera o custo.

Para preparação de padrões de calibração em grande quantidade, um dos fatores mais importantes é a seleção de matéria-prima natural. Os mariscos, com um alto teor

de toxina é uma das fontes naturais de PSTs mais importantes, porém, são dependentes de eventos naturais de floração produtoras de PSTs, para bioacumularem as toxinas (Oshima *et al.*, 1982, Goto *et al.*, 1998). Outra fonte pode ser alguns dinoflagelados, como *Alexandrium excavatum* (Laycock *et al.*, 1994) e *A. tamarense* (Thomas *et al.*, 2004) podem ser utilizados como matéria-prima apropriada, em termos de fonte estável de toxina. Algumas cianobactérias produtoras de toxina, como *Anabaena circinalis* e *Aphanizomenon flos-aquae*, também seriam uma boa opção de matéria-prima na produção de toxina (Watanabe *et al.*, 2011).

Os mariscos vêm sendo usados para produção de padrões de PSTs, mas sabe-se que neles os análogos destas toxinas sofrem reações químicas e enzimáticas que mudam sua estrutura química. Além de usar uma metodologia complexa e demorada, ainda assim, depois da purificação, se faz necessária uma conversão química das toxinas para que fiquem quimicamente iguais aos análogos encontrados no ambiente. Algumas reações químicas e enzimáticas foram citadas para transformação dos análogos por Oshima (1995b) e Watanabe *et al.*, (2011). Estas conversões químicas são inclusive usadas pelo NCR na produção dos padrões, o qual usa a metodologia de Laycock *et al.* (1994) para purificar as toxinas.

Desta forma, uma metodologia para produção de padrões de PSTs, usando como matéria prima as cianobactérias, que no fim do processo obtenha um padrão da variante encontrada em sua cepa ou seu ambiente de estudo, podendo até ser uma variante não disponível no mercado, é de extrema importância para experimentos com toxina purificada e calibração de equipamentos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MONITORAMENTO E COLETA DAS AMOSTRAS

Para monitorar os eventos de florações de cianobactérias no Rio Grande do Sul e este trabalho contou com a colaboração de companhias de tratamento de água, como a CORSAN (Companhia Riograndense de Saneamento), em mais de 360 localidades, e SAMAE (Serviço Autônomo Água e Esgoto de Caxias do Sul), entre outros. Com estes colaboradores teve-se um campo amostral bem representativo do estado, monitorando a água de abastecimento público de mais de 80% da população do estado, sendo que outros eventos que ocorreram em mananciais também foram monitorados. A coleta das amostras no Paraná, ocorreu com a colaboração da SANEPAR (Companhia de Saneamento do Paraná).

Nos dois estados foram estudadas um total de 540 florações de cianobactérias que poderiam ser produtoras de PSTs, no decorrer dos anos de 2003 a 2009. Foram avaliados resultados obtidos de 276 amostras analisadas durante o período de 2003 a 2006, e mais 264 amostras analisadas no período de 2007 a 2009. As análises foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por fluorescência segundo método de Oshima (1995).

Os técnicos de cada local coletaram as amostras e enviaram para a equipe de biólogos de sua unidade, os quais analisaram as amostras em microscópios e, se confirmada a presença de cianobactéria, encaminharam para a UPC (Unidade de Pesquisa em Cianobactéria da FURG), alíquotas congeladas e preservadas com ácido clorídrico $0,05\text{mol L}^{-1}$ para análises. Para os dados obtidos de 2003 a 2007 este era o procedimento padrão de coleta e preservação das amostras. A partir 2007 incluiu-se no procedimento, o envio de uma alíquota da amostra *in natura*, juntamente com as demais

amostras. Então, de 2007 a 2009 além das análises foram feitas tentativas de cultivo em laboratório de todas as amostras que apresentaram alguma variante de PSTs.

4.2 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Todos os reagentes usados foram das marcas Merck e Sigma, grau analítico ou cromatográfico. A água ultrapura foi obtido do equipamento Milli-Q. Para as purificações e análises foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu LC-20A (Figura 6), composto por uma controladora CBM-20A, detector de fluorescência RF-10Ax1, detector SPD-M20A UV-VIS, PDA (Photo Diode Array), bombas LC-20AD e forno de coluna CTO-20A, controlados através do software LabSolution 5.41.240. A coluna utilizada foi confeccionada na UPC, com um diâmetro interno de 10mm e comprimento de 150mm, preenchida com C18 (uma fase estacionária composta por sílica RMe_2SiCl , onde R é um grupo alquila de cadeia linear $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$).



Figura 6: Shimadzu LC-20^a, com controladora CBM-20A, detectores de fluorescência (RF-10Ax1), UV-VIS, (SPD-M20A PDA Photo Diode Array), bombas LC-20AD e forno CTO-20A.

4.3 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CIANOBACTÉRIA

Com a finalidade de manter as cianobactérias vivas e viáveis para o isolamento foi feito enriquecimento das amostras, imediatamente após sua chegada ao laboratório. Para o enriquecimento foi utilizado o meio de cultura BG-11 líquido, suplementado ou não com fontes de nitrogênio (N) (Allen & Stanier, 1968, modificado por Pontes, 1988) e também o meio de cultura ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964). Os meios foram feitos na forma líquida e solidificados com 10 g L⁻¹ de ágar, esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120°C e 1,0 atm de pressão. Posteriormente, o material foi transferido para uma estufa com fotoperíodo com 10 horas de luz e 14 horas de escuro, temperatura de 25°C (±2) e intensidade luminosa de 25 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por 4 lâmpadas fluorescentes brancas, frias, do tipo luz do dia de 20 Watts de potência (Metting, 1994).

O isolamento de espécies fitoplanctônicas foi realizado utilizando-se o método de micropipetagem e plaqueamento, proposto por Kugrens *et al.* (2000) no qual são feitas repicagens sucessivas de pequenas porções contendo filamentos em placas com meio de cultivo, e pelo método da “pescaria” (Rippka, 1979), no qual pinga-se uma gota da amostra ambiental numa lâmina, isola-se um filamento (tricoma) por capilaridade e, com o auxílio de pipeta Pasteur de ponta afilada, fazem-se sucessivas lavagens em gotas de meio de cultura esterilizado. Ao confirmar a presença de apenas um filamento do gênero desejado, esse é transferido, em condições assépticas, para meio de cultura líquida e para placas de Petri contendo 25 mL de meio de cultura sólido esterilizado. Os inócuos foram mantidos, durante 20 dias, em condições controladas de cultivo, como descrito anteriormente. Os organismos que apresentaram crescimentos, o procedimento foi repetido, sendo feitas várias repicagens sucessivas até a obtenção de isolados. A eficiência do isolamento das espécies foi avaliada pela observação de porções das

culturas obtidas ao microscópio óptico, e depois de isoladas, as cepas foram mantidas no banco de cultivo da UPC e também cultivadas em volumes maiores (10 e 20L) (Figura 7).



Figura 7: Fotografia dos cultivos em escala de 20L.

As culturas unialgais foram mantidas em sala de crescimento da UPC, em uma estufa com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, temperatura de 25°C (± 2) e intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As culturas são mantidas em frascos Erlenmeyer, com capacidade para 125 mL, em meio ASM1 líquido, e são renovados os meios de cultura a cada 30 dias.

4.3.1 CULTIVOS COM SALINIDADE

Tendo em vista a polêmica do perfil de toxina da cepa T3 e a disponibilidade desta na UPC, o experimento descrito a seguir teve como objetivo avaliar qual é perfis

de produção de toxina desta cepa na UPC, e quais seriam os efeitos, quando exposta à diferentes concentrações de salinidade, na produção de toxina.

Nos experimentos com salinidade foi utilizada cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii*. A cepa foi mantida em meio de cultivo ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964), temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $35\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12/12 horas em câmara de cultivos.

Para identificar faixas de salinidade que possam limitar a distribuição e persistência de *Cylindrospermopsis* e avaliar o que ocorre com a produção de toxina em diferentes salinidades, e para determinar o nível de salinidade tolerado pela espécie e o efeito da salinidade em seu crescimento e produção de toxina. Foram realizados dois experimentos:

O primeiro expôs a cultura já na fase exponencial de crescimento a salinidades de 0, 5, 10 e 20. Este experimento objetivou simular a entrada de uma floração em uma região estuarina com diferentes salinidades. Para isto, manteve-se a cultura em condições normais de crescimento em laboratório até a fase exponencial em seguida se adicionou sal marinho (sal marinho Saludem®) para atingir diferentes salinidades, e foi feito o monitoramento das células e das toxinas.

Para o experimento foram preparados doze inóculos de *C. raciborskii*, sendo três para cada salinidade. Cada inóculo foi realizado em 500 mL de meio de cultivo ASM-1, previamente esterilizados em autoclave ($1,2 \text{ kgf cm}^{-2}$ por 30 minutos). Após os inóculos, todas as culturas foram mantidas na temperatura de 25°C (± 2). A

luminosidade e o fotoperíodo durante o experimento foram os mesmos para todos os tratamentos.

Após o trigésimo sétimo dia da cultura, foi adicionado sal marinho (Salutem®), em cada tréplica para atingir salinidade igual 5, 10, e 20, e uma triplicata não foi adicionado sal sendo considerado o controle da cultura. Foram feitas coletas para análises de toxina a 1 e 12 h após a adição do sal.

No segundo experimento foram feitos seis inoculos, sendo uma triplicata em apenas meio de cultura ASM1 e outra com mesmo meio de cultura com adição de sal marinho até atingir salinidade 5. Para cada inóculo de *C. raciborskii* foi realizado em dois litros de meio de cultivo ASM-1, previamente esterilizados em autoclave (1,2 kgf cm⁻² por 30 minutos). Após os inóculos, em três cultivos foi adicionados sal marinho para atingir a salinidade de 5 e os outros três não foi adicionado sal. Todos os cultivos foram mantidos nas mesmas condições de temperatura, luminosidade e o foto período citados anteriormente.

Para avaliar se havia diferença na produção de toxinas em salinidade 0 e 5 realizou-se teste não-paramétrico, Kruskal-Wallis ANOVA.

4.4 PROCEDIMENTO DE COLETAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE TOXINAS

No 37° dia de cultivo foi feita a coleta para verificar o crescimento e o teor de toxinas intracelular. O cultivo foi homogeneizado e então foram coletados 10 mL de cultivo para medida dos filamentos (µm) e 100 mL para análise de toxinas. Para medir

os filamentos da cianobactéria, os 10 mL foram armazenados em ampola de vidro e fixados com três gotas de lugol 0,5%.

Os 100 mL para análises de toxina foram coletados e filtrados em filtros de fibra de vidro GF/C Whatman para reter os filamentos e concentrar a amostra, para a análise de toxinas. O filtro contendo os filamentos de *C. raciborskii* foi colocado em um tubo de centrífuga com 5 mL de ácido clorídrico 0,05 mol L⁻¹. Após agitação em vortex a amostra foi armazenada congelada, e posteriormente ultrassonificada para a extração das toxinas intracelulares. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (8000 g por 10 minutos) e o teor de PSP analisado por cromatografia líquida de pós-derivatização, utilizando o método de Oshima (1995). A concentração total de toxinas foi expressa em equivalentes de STX, para converter as concentrações das outras variantes de PSTs usou-se a equação de Hall *et al.* (1990).

4.5 ANÁLISE E CULTIVOS PARA AVALIAR SE HÁ DIFERENÇA NA PRODUÇÃO DE TOXINAS ENTRE AS FLORAÇÕES E CEPAS

Para avaliar se havia diferença entre as florações e as cepas isoladas, foram utilizados dados de toxinas produzidas por cianobactérias nos mananciais de origem em amostras de cinco locais diferentes e de suas respectivas cepas isoladas neste trabalho. Quatro cepas de *Cylindrospermopsis* (Farroupilha, Camaquã e Lajeado - RS e da barragem de Alagados em Ponta Grossa - PR) e uma cepa de *Raphidiopsis brookii* (lago Biguás em Rio Grande - RS) foram analisadas. As cepas foram nomeadas conforme o nome do local de origem da floração e estavam mantidas no laboratório em meio ASM1.

No laboratório (UPC) as cepas foram cultivadas em triplicata e assim como as amostras de florações, foram analisadas por cromatografia (CLAE), segundo método de Oshima 1995. Para cada cepa foram preparados três erlenmeyers de 200 mL com meio ASM1, onde elas foram inoculadas. As culturas foram mantidas em câmara de cultivo a uma temperatura de 25°C (± 2), intensidade luminosa de 127 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ e fotoperíodo 12/12 horas por trinta dias. Após o período de trinta dias foram retiradas duas amostras de cada erlenmeyer. Para a primeira amostra foram retirados 10 mL da cultura e fixados em Lugol (0,5%) para contagem e medida de filamentos em microscopia óptica. Para a segunda amostra foram retirados 100 mL da cultura, que foi imediatamente filtrada em microfiltro de fibra de vidro, com uma porosidade nominal de 1,2 μm (Whatman GF/C). Posteriormente, o filtro foi imerso em 10 mL de HCl 0,05 mol L⁻¹ para análise de toxinas.

4.6 CONTAGENS DE CÉLULAS

A densidade de cianobactérias foi feita por meio da contagem em câmara de Sedgwick-Rafter de 1mL, a amostra com lugol foi deixado em decantação durante 30 minutos em câmaras de Sedgwick-rafter para a realização da contagem em microscópio óptico. Foram escolhidos trinta campos aleatórios para a contagem de filamentos, e a partir do resultado foi estimado o número de filamentos por mL. Para obter a densidade, expressa em micrômetros por mL, foi feita a média do tamanho de quarenta filamentos encontrados aleatoriamente. O tamanho total do cultivo em cada amostra foi estimado multiplicando a média dos tamanhos de 50 filamentos pelo número de filamentos totais estimado da amostra.

As medidas de comprimento de filamento e células foram feitas em lâmina na qual se colocava a amostra e cobria com uma lamínula, sobre esta se adicionava óleo de

imersão para uso da objetiva com aumento de 100 vezes, a ocular tinha um aumento de 10 vezes e uma régua com medidas em micrômetros. Com os resultados de densidade de filamentos em tamanho médio dos filamentos de cada cepa, foi possível obter valores de densidade em micrômetros por mililitros ($\mu\text{m mL}^{-1}$), e com os resultados de densidade de filamentos em tamanho médio dos filamentos de cada cepa, e tamanho da célula foi possível obter valores de densidade de células por mililitros (cel mL^{-1}). A análise estatística com as contagens e medidas foi realizada através de uma ANOVA, seguida de um test post-hoc de Tukey, para verificar quando e onde a diferença entre os valores era significativa (Mann, 2003).

As imagens das cepas de cianobactérias foram feitas com um sistema composto de um microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Tóqui, Japão) equipado com objetivas de 4X, 10X, 20X, 40X e 100X e pela câmera DP72 (Olympus, Tóqui, Japão), conectada a um computador tipo desktop. A captura das imagens foram realizadas com o auxílio do programa Cell^D (Olympus 1986–2008)

4.7 MÉTODOS DE ANÁLISES DE PSTs

As metodologias de análises para determinação das PSTs foram de cromatografia e imunensaio.

4.7.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA

Neste trabalho todas as análises cromatográficas para determinar as concentrações das PSTs foram feitas utilizando o método de Oshima (1995), esta metodologia foi implantada e validada na Unidade de Pesquisa em Cianobactérias por Cunha (2004), o qual utiliza cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por

fluorescência, com derivatização pós-coluna, utilizando uma coluna C8 (150x4,6mm D.I. 5µm de partícula) sob temperatura controlada de 40°C (STX, dc-STX e Neo-STX) e 19°C (para as GTX-1 a GTX-5) e dois eluentes diferentes, para dois grupos de toxinas, em fluxo isocrático:

1- Fase móvel para Neo-STX, dc-STX e STX: heptanosulfonato de sódio 2mmol L⁻¹ em tampão fosfato de amônio 30 mmol L⁻¹ pH 7,1 : acetonitrila (100:6); Fluxo: 0,7mL min⁻¹

2- Fase móvel para GTX1 a GTX5: heptanosulfonato de sódio 2 mmol L⁻¹ em tampão fosfato de amônio 10 mmol L⁻¹ pH 7,1; Fluxo: 0,8mL min⁻¹

Como reagente oxidante para derivatização utiliza-se uma solução de ácido periódico 7 mmol L⁻¹ em tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH=9,0) e, como reagente acidificante, ácido acético 500 mmol L⁻¹, ambos com fluxo de 0,3mL min⁻¹. A reação pós-coluna ocorre sob aquecimento em banho-maria a 80°C. A detecção por fluorescência emprega como comprimento de onda de emissão e de excitação 390nm e 330nm, respectivamente. O cálculo da concentração de toxinas na amostra é feito por comparação entre as áreas dos picos das amostras e dos padrões comerciais.

4.7.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A metodologia usada para análise de massa foi adaptada de Diener *et al.* (2007), com uma coluna zic-HILIC: 150mm x 1mm, partícula com 3,5µm (Sequant Merck), com a vazão de 40µL min⁻¹, sendo a fase móvel A- 5 mmol L⁻¹ formiato de amônio + 0,05% Ácido Fórmico e B- acetonitrila/água 70/30. O Cromatógrafo conectado a uma fonte ESI (Electrospray ionization) do EM (Esquire HCT, Bruker Daltonics - iontrap),

com gás (N^2) de nebulização a 30 psi e a 250 °C, e o gás de secagem com vazão de 5 L min^{-1} , a corrida cromatográfica divide-se em dois segmentos: sendo o primeiro de 0 a 14,5 min no modo negativo a 3000 V e o segundo de 14,5 min em diante no modo positivo a 3500 V.

4.7.3 ANÁLISES POR IMUNOENSIO

Os dois kits usados neste trabalho foi o da Abraxis e Bioo Scientific, os quais as metodologias estão descritas a seguir.

4.7.3.1 KIT ABRAXIS

O kit comercializado no Brasil da Abraxis vem com tiras com 96 poços com anticorpo, 6 mL de solução anticorpo (anti-saxitoxina de coelho), seis padrões para calibração (0,00, 0,02, 0,05, 0,10, 0,20 e 0,40 $ng mL^{-1}$) 6 mL enzima conjugada (saxitoxina-HRP), 12 mL solução de cor (substrato), 500mL de solução de lavagem (tampão fosfato) e 12 mL solução Stop ($HCl 1mol L^{-1}$)

Procedimento tem os seguintes passos:

1. Deixar todos os reagentes do Kit e amostras a temperatura ambiente, pelo menos 30 minutos antes de iniciar o teste.
2. Remover as tiras contendo o número requerido de poços. Certificar de lacrar o saco com o dessecador para limitar a exposição das tiras à umidade.
3. Adicionar 50 μL da enzima conjugada em cada poço.
4. Adicionar 50 μL dos calibradores, do controle e das amostras dentro dos poços apropriados. Utilizar pipeta limpa para cada solução, evitando contaminação cruzada.
5. Adicionar 50 μL de Solução de Anticorpo em cada poço.

6. Agitar a placa rapidamente para misturar os conteúdos e cobrir os poços com fita ou Parafilm.
7. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Após a incubação, remover a fita e desprezar o conteúdo dos poços. Preencher completamente os poços com a solução de lavagem, e desprezar em seguida. Repetir esta etapa de lavagem 4 vezes, num total de 5 lavagens. Inverter a placa num papel absorvente e retirar o máximo de água possível.
9. Adicionar 100 μ L do Substrato em cada poço.
10. Cobrir os poços e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
11. Adicionar 100 μ L da solução “STOP” em cada poço na mesma ordem da adição do substrato.

Realizar a leitura da placa em leitor de placa de duplo comprimento de onda, ler a 450 nm menos 650 nm.

A leitura é feita no máximo 15 minutos após a adição da solução Stop.

4.7.3.2 KIT BIOO SCIENTIFIC

O kit comercializado no Brasil da Bioo Scientific vem com tiras com 96 poços com anticorpo, 6 mL de solução anticorpo (anti-saxitoxina de coelho), seis padrões para calibração (0,00, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16 e 0,32 ng mL⁻¹) 6 mL enzima conjugada (saxitoxina-HRP), 12 mL solução de cor (substrato), 560mL de solução de lavagem (tampão fosfato) e 20 mL solução Stop (HCl 1mol L⁻¹)

Procedimento tem os seguintes passos:

1. Deixar todos os reagentes do Kit e amostras a temperatura ambiente, pelo menos 30 minutos antes de iniciar o teste.

2. Remover as tiras contendo o número requerido de poços. Certificar de lacrar o saco com o dessecador para limitar a exposição das tiras à umidade.
3. Adicionar 50 μL da enzima conjugada em cada poço.
4. Adicionar 50 μL dos calibradores, do controle e das amostras dentro dos poços apropriados. Utilizar pipeta limpa para cada solução, evitando contaminação cruzada.
5. Adicionar 50 μL de Solução de Anticorpo em cada poço.
6. Agitar a placa rapidamente para misturar os conteúdos e cobrir os poços com fita ou Parafilm.
7. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Após a incubação, remover a fita e desprezar o conteúdo dos poços. Preencher completamente os poços com a solução de lavagem, e desprezar em seguida. Repetir esta etapa de lavagem 4 vezes, num total de 5 lavagens. Inverter a placa num papel absorvente e retirar o máximo de água possível.
9. Adicionar 100 μL do Substrato em cada poço.
10. Cobrir os poços e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
11. Adicionar 100 μL da solução “STOP” em cada poço na mesma ordem da adição do substrato.

Realizar a leitura da placa em leitor de placa de duplo comprimento de onda, ler a 450 nm menos 650 nm.

A leitura é feita no máximo 15 minutos após a adição da solução Stop.

4.8 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS

Uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* que produz apenas Neo-STX e STX na proporção 3:1 foi utilizada em todos os testes deste trabalho. A cepa foi mantida em meio de cultivo ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964), temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12/12 horas em câmara de cultivos da UPC.

Para o experimento prepararam-se três inóculos de *C. raciborskii*. Cada inóculo foi realizado em dois litros de meio de cultivo ASM-1, previamente esterilizados em autoclave ($1,2\text{ kgf cm}^{-2}$ por 30 minutos). Após inoculá-los, os três cultivos foram mantidos na temperatura de 25°C .

No 37º dia de cultivo, ou seja, na fase exponencial do crescimento, foram realizadas coletas para verificar o crescimento e o teor de toxinas intracelulares. Cada réplica de cultivo foi dividida em seis, sendo que na primeira réplica de cada cultivo não foram feitas diluições; na segunda foi diluída a metade; na terceira diluída quatro vezes e assim até a sexta, sendo que cada diluição ficou com a metade do número de células da anterior. Antes da coleta para contagem de células e para análise de toxinas, o cultivo foi homogeneizado com agitação manual. Para contagem foram coletados 10 mL de cada amostra do experimento e armazenados em ampola de vidro e fixados com três gotas de lugol 0,5 %. Um mL da amostra com lugol foi deixado em decantação, durante 30 minutos, em câmaras de Sedgewick-rafter para a realização da contagem em microscópio óptico. O número de células de cada cultivo foi estimado.

Outros 100 mL de cada amostra do experimento foram coletados e filtrados em filtros de fibra de vidro GF/C Whatman para reter os filamentos e concentrar a amostra para posterior análise de toxinas. O filtro contendo os filamentos de *C. raciborskii* foi colocado em um tubo de centrífuga com 5mL de ácido clorídrico $0,05\text{ mol L}^{-1}$. Após

agitação a amostra foi congelada, descongelada e ultrassonificada para a extração das toxinas intracelulares. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (8000 g por 10 minutos) e o teor de PST foi analisado por cromatografia líquida, utilizando o método de Oshima (1995) e os Kits Abraxis e Bioo Scientific. A concentração total de toxinas foi expressa em equivalentes de STX e foi calculada com a concentração de STX e somada a toxicidade relativa de 0,9243 vezes a concentração de neo-STX (Hall *et al.*, 1990).

4.9 PURIFICAÇÃO DE PSTs

4.9.1 ESCOLHAS DAS CEPAS

Estavam disponíveis para o trabalho seis cepas de cianobactérias produtoras de PSTs, sendo cinco *Cylindrospermopsis sp.*, de Alagados, Camaquã, Farroupilha, Lajeado e T3, e uma de *Raphidiopsis sp.*, de Biguás. Todas estas cepas produziam, em condições de laboratório, as variantes Neo-STX e/ou STX, sendo as cepas T3 e a de Farroupilha, as que produziram em maior quantidade, suficientes para os testes de purificação das duas toxinas em ambas as cepas. Por isto, estas foram usadas para produzir padrões de Neo-STX e STX.

4.9.2 CULTIVO DAS CÉLULAS PRODUTORAS DAS TOXINAS

As cepas de *Cylindrospermopsis* utilizadas na purificação das toxinas PSTs passaram a ser mantidas na coleção de cultivos da UPC. As cepas foram cultivadas em frascos de 20 L, meio ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964), estufa de fotoperíodo com 12 horas de luz e 12 horas de escuro, temperatura de 25°C(±2) ou 16°C (±2) e intensidade luminosa de 35µmol m⁻²s⁻¹ fornecida por 4 lâmpadas fluorescentes brancas, frias, do tipo luz do dia e de 20 Watts de potência (Metting, 1994).

4.9.3 CONCENTRAÇÃO DAS CÉLULAS E EXTRAÇÃO DA TOXINA

As células dos cultivos foram concentradas por centrifugação a 10^4 g e, posteriormente, filtradas. Com três ciclos de congelamento e descongelamento do material concentrado, as células romperam liberando as PSTs intracelulares. O extrato foi centrifugado por 20 minutos a 10^4 g, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante armazenado sob refrigeração, a -20°C , até a análise em cromatografia e purificação.

Anteriormente à injeção para purificação ou análise, o extrato foi descongelado e um volume de 1,5 mL do extrato concentrado foi transferido a um tubo de centrífuga e centrifugado, novamente, a 10^4 g, para remoção de algum precipitado e então, analisado ou purificado.

4.10 METODOLOGIAS CROMATOGRÁFICAS TESTADAS PARA PURIFICAÇÕES

A coluna usada para purificação foi uma coluna feita no próprio laboratório, com as dimensões de 10mm de diâmetro 150mm de comprimento, recheada com C18 (Bulk Septra C18 – E $50\mu\text{m}$, 65\AA), a temperatura do forno de coluna foi de 20°C e alça de amostragem (loop) de 1mL (Figura 8).

O monitoramento dos compostos que eluíram durante a purificação foi feito por detecção de UV, com varredura de 190 a 800nm. Este monitoramento foi feito para poder observar o perfil de absorção das PSTs no UV, sendo que elas têm sua maior absorbância em 200nm (Thibault *et al.*, 1991), e também para verificar a presença de outros compostos contaminantes que absorvam entre 190 a 800nm. Após passar pelo detector de UV, sendo este um detector não destrutível, ou seja, a amostra não sofre

alteração após a leitura, eram coletadas manualmente frações de 1mL (de 30 em 30 segundos) (Figura 9).



Figura 8: Forno de coluna com coluna e loop.

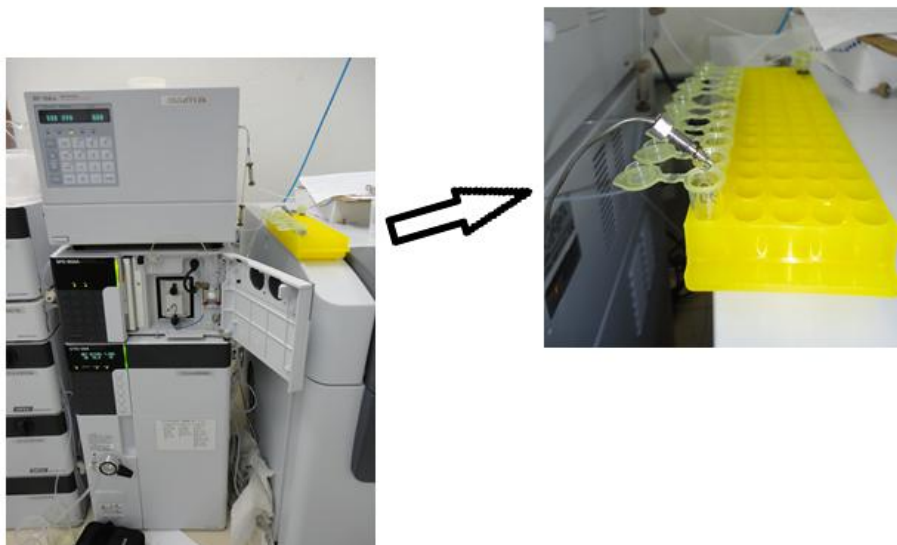


Figura 9: Coleta de frações, pós detector de UV.

Para as purificações foram testadas três combinações de fase móvel, sendo estas detalhadas a seguir:

Fase móvel 1:

Eluente A: ácido octano-sulfônico $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$, heptanosulfonato de sódio $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$, fosfato de amônio $48,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e tetra hidro furano $1,0\% \text{ (v/v)}$. O pH foi ajustado a $7,0$ com ácido fosfórico $20,0\% \text{ (v/v)}$. Fase móvel adaptada de Soto *et al.*, (2010).

Eluente B: acetonitrila.

Fase móvel 2:

Eluente A: heptanosulfonato de sódio $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, fosfato de amônio $30,0 \text{ mmol L}^{-1}$. O pH foi ajustado $7,1$ com hidróxido de amônio. Fase móvel adaptada de Oshima (1995).

Eluente B: acetonitrila.

Fase móvel 3:

Eluente A: ácido clorídrico 0,05 mol L⁻¹

Eluente B: acetonitrila.

No cromatógrafo, o fluxo foi ajustado a 2,0mL min⁻¹. As fases móveis utilizadas foram as citadas acima e todas as soluções foram preparadas com água ultra pura. Previamente à injeção, o aparelho foi aclimatado durante 20 minutos com o Eluente A e foram injetados 1,0mL do extrato previamente preparado.

Para as corridas de purificação foram testados diferentes gradientes entre os eluentes de cada fase móvel, conforme observado nas Tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11: Gradiente que melhor separou as toxinas com a Fase móvel 1.

Tempo de Corrida em Minutos	% do Eluente A	% do Eluente B
0	100	0
10	90	10
30	85	15
40	50	50
50	0	100
60	100	0
80	100	0

Tabela 12: Gradiente que melhor separou as toxinas com a Fase móvel 2.

Tempo de Corrida em Minutos	% do Eluente A	% do Eluente B
0	100	0
10	97	3
30	90	10
40	50	50
50	0	100
60	100	0
80	100	0

Tabela 13: Gradiente que melhor separou as toxinas com a Fase móvel 3.

Tempo de Corrida em Minutos	% do Eluente A	% do Eluente B
0	100	0
10	90	10
30	50	50
50	0	100
60	100	0
80	100	0

As frações foram coletadas a cada 30 segundos de corrida cromatográfica, (Figura V.3). As frações recolhidas nos tempos de retenção, onde no cromatograma de UV, tinha picos no comprimento de 200nm, foram posteriormente analisadas por CLAE-RF, para verificar se continha PSTs e sua concentração e pureza.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 MONITORAMENTO DAS FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE PSTs NO RIO GRANDE DO SUL

Na economia do estado do Rio Grande do Sul, a agricultura, pecuária e a indústria são de grande importância, porém estas atividades que geram lucro para o estado, também vêm causando prejuízo: a poluição dos corpos hídricos. Esta poluição proporciona a ocorrência de florações de cianobactérias, que são produtoras de toxinas nocivas ao ser humano. E para evitar que a população seja contaminada com estas toxinas, programas de monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas em mananciais, apesar de caros, são indispensáveis. Neste estudo, em especial monitorou-se somente florações de cianobactérias produtoras de PSTs. Com o monitoramento no estado do Rio Grande do Sul, foram obtidos os principais eventos registrados e encontram-se listados na Tabela 14.

Os dados listados na Tabela 14 foram obtidos através de registros históricos e de amostras analisadas na UPC/FURG, na qual o presente trabalho estava inserido. Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade de que outros mananciais e regiões apresentem ocorrência dessas cianobactérias, mas que esses resultados não estejam registrados ou disponíveis bibliograficamente. Esses resultados apenas mostram a ocorrência de espécies produtoras de saxitoxinas no Rio Grande do Sul.

Tabela 14. Florações de cianobactérias produtores de saxitoxinas encontradas em águas do estado do Rio Grande do Sul

Local	Manacial	Gênero	PSTs	Fonte
Esteio	Rio dos Sinos	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	Chaves <i>et al.</i> , 2009
Esteio	Rio Caí	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	Chaves <i>et al.</i> , 2009
Caxias do Sul	Faxinal	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	UPC/SAMAE
Caxias do Sul	São Miguel	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	UPC/SAMAE
Santiago	Lageado Pinheiro	<i>Anabaena</i>	Sim	UPC/CORSAN
Cachoerinha	Rio Gravataí	<i>Anabaena</i>	Sim	UPC/CORSAN
Osório	Lagoa Peixoto	<i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Aphanizomenon</i>	Sim	UPC/CORSAN
Dom Pedrito	Serrinha	<i>Cylindrospermopsis</i>	Não	UPC/CORSAN
Passo Fundo	Fazenda	<i>Anabaena</i>	Não	UPC/CORSAN
Garibaldi	Marrecão	<i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Aphanizomenon</i>	Sim	UPC/CORSAN
Farroupilha	Buratti	<i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Anabaena</i>	Sim	UPC/CORSAN
Guaíba	Guaíba	<i>Aphanizomenon</i>	Sim	UPC/CORSAN
Três Coroas	Rio dos Sinos	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	UPC/CORSAN
Canela	Rio Santa Cruz	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	UPC/CORSAN
Parobé		<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	UPC/CORSAN
Itaqui	Rio Uruguai	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> e <i>Anabaena</i>	Sim	UPC/CORSAN
São Borja	Rio Uruguai	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> e <i>Anabaena</i>	Sim	UPC/CORSAN
Uruguaiana	Rio Uruguai	<i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Aphanizomenon</i>	Sim	UPC/CORSAN
Porto Xavier	Rio Uruguai	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> e <i>Anabaena</i>	Não	UPC/CORSAN
Guaporé	Rio Carreiro	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	UPC/CORSAN
Bento Gonçalves	São Miguel	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	UPC/CORSAN
Bento Gonçalves	Buratti	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	UPC/CORSAN
Bento Gonçalves	Barracão	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	UPC/CORSAN
Camaquã	Arroio Duro	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	UPC/CORSAN
Curumim	Rio Cornélios	<i>Anabaena</i>	Não	UPC/CORSAN
Erechim	Arroio Ligeirinho	<i>Aphanizomenon</i>	Sim	UPC/CORSAN
Lajedo	Lago do Parque Prof. Theobaldo Dick	<i>Cylindrospermopsis</i>	Sim	UPC

No trabalho de Sant'Anna e Azevedo (2000) é apresentada uma compilação de dados de estudos sobre cianobactérias potencialmente tóxicas e sua distribuição geográfica no território brasileiro. De acordo com este estudo, todas as regiões apresentam ocorrências de cianobactérias, entretanto esses valores representam somente

os casos registrados na literatura específica. Certos estados como São Paulo e Rio Grande do Sul, apresentaram elevado índice de ocorrências dessas florações. A espécie *Microcystis aeruginosa* apresentou o maior número de ocorrência no Brasil, além de possuir uma ampla distribuição nos estados brasileiros. Entretanto, identifica-se um aumento da presença de *Cylindrospermopsis raciborskii* em diferentes regiões brasileiras (Chellapa e Costa, 2003; Silvestre *et al.*, 1999; Yunes *et al.*, 2003; Molica *et al.*, 2005).

Os resultados deste trabalho, reforça a revisão feita por Sant'Anna e Azevedo (2000), demonstrando que no Rio Grande do Sul tem um elevado índice de florações de cianobactérias e também foi constatada a presença de *Cylindrospermopsis*, que diferentes autores (Chellapa e Costa, 2003; Silvestre *et al.*, 1999; Yunes *et al.*, 2003; Molica *et al.*, 2005) citam um aumento da suas ocorrências no Brasil, e que no Rio Grande do Sul ocorrem florações de cianobactérias que produzem PSTs. Estas florações se distribuem em diferentes regiões do estado, sendo encontradas em diferentes tipos de corpos d'água, como rios, arroios, lagos, lagoas e barragens, e em diferentes estações do ano. Isto mostra que elas estão bem adaptas às condições físicas, químicas e biológicas que propiciam a ocorrência e a dominância destas cianobactérias. Sendo assim, estes organismos e suas toxinas merecem muita atenção dos pesquisadores e dos órgãos responsáveis pelo monitoramento de locais de recreação, abastecimento de água e qualquer local que possa expor a população a estas toxinas. No entanto, deve-se perceber que *Cylindrospermopsis*, a cianobactéria produtora de PSTs mais ocorrente no estado, tem algumas peculiaridades tais como posição na coluna d'água, tamanho e ausência odor, que dificultam sua detecção.

**5.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS
FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS NO DECORRER DOS
ANOS 2003-2009 NO RIO GRANDE DO SUL E NO PARANÁ.**

Na Tabela 15 e na Figura 10 e 11 estão representados os números de amostras analisadas em cada ano, que apresentaram resultado positivo para pelo menos uma variante de PSTs, e seus respectivos percentuais com o total de amostras analisadas no período.

Tabela 15: Relação numérica de análises de amostras com presença de PSTs no Rio Grande do Sul e Paraná

Ano	Nº de Análises	Nº de Amostras com PSTs	%
2003	99	2	2,02
2004	63	0	0,00
2005	54	15	27,78
2006	60	18	30,00
2007	48	13	27,08
2008	95	16	16,84
2009	121	53	43,80
Total	540	117	21

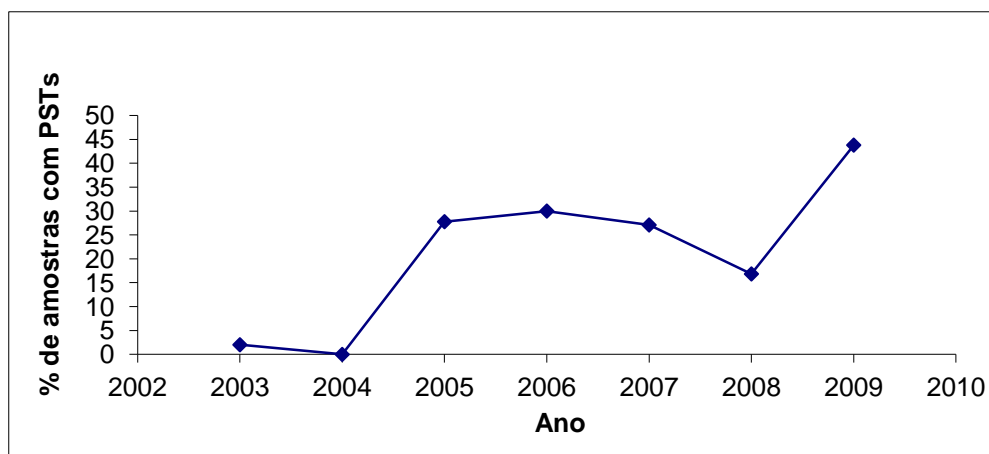


Figura 10: Percentual de amostras que apresentaram PSTs.

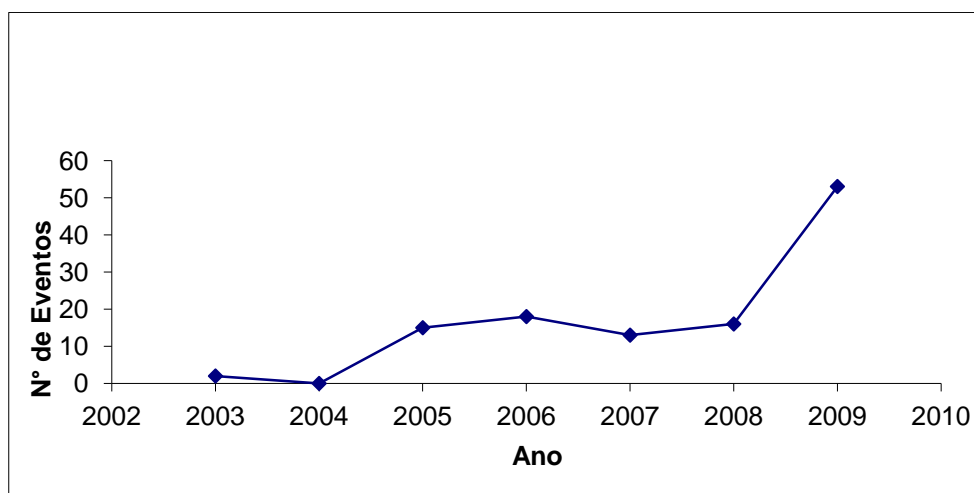


Figura 11: Número absoluto de amostras nas quais foram detectadas STXs no Rio Grande do Sul e Paraná.

A média total de concentração da toxina encontrada para cada 10.000 cel mL⁻¹ foi de 0,098 µg L⁻¹, ou seja, aproximadamente 0,1fg por célula, porém este teor de toxina também variou no decorrer dos anos, o que pode ser observado na Tabela 16 e também na Figura 12.

Tabela 16: Média do teor de toxinas em cada ano

Ano	Teor de eq.STX fg cel ⁻¹ .	Desvio Padrão
2003	0,036	0,0290
2004	0,00	0,0000
2005	0,016	0,0097
2006	0,029	0,0027
2007	0,024	0,0236
2008	0,035	0,0188
2009	0,185	0,0913
Média	0,046	0,0250

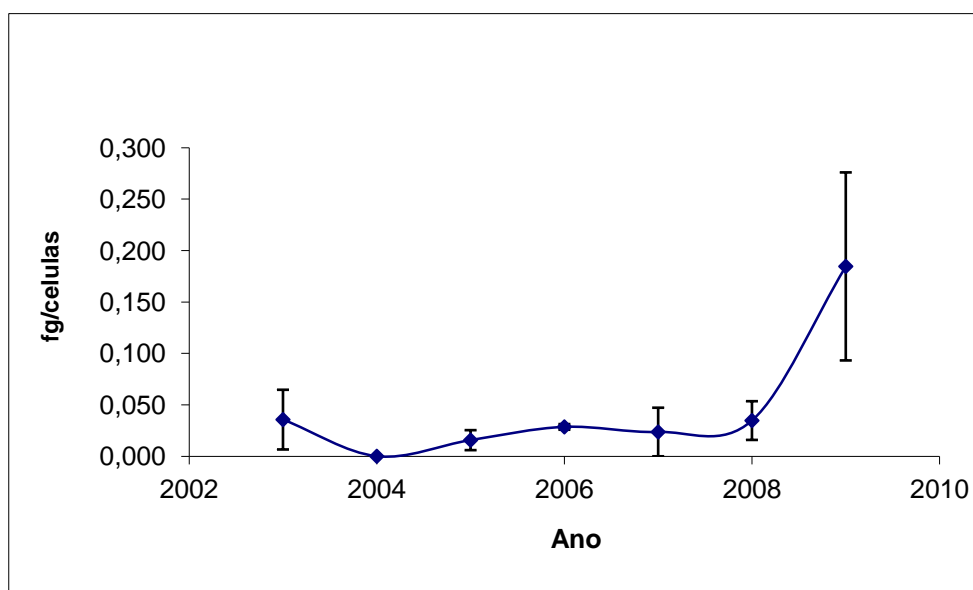


Figura 12: Evolução do teor de toxina por células em eq. de STX , no decorrer dos anos, 2003 a 2009, na região sul do Brasil.

Conforme os dados listados na Tabela 15, das 540 amostras analisadas em 117 foi detectado pelo menos uma variante de PSTs. Em 112 destas, a cianobactéria responsável pela produção da toxina foi uma *Cylindrospermopsis*, sendo então, esta a

responsável pela produção de PSTs em aproximadamente 95,7% das amostras com esta toxina.

Com relação ao teor de toxina por célula, outro dado que se observou em um local específico, foi uma variação no decorrer dos meses do ano de 2006, onde os teores de toxina por célula da represa de Alagados, localizada na cidade de Ponta Grossa PR, manancial usado pela Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR), variaram de 0,05 a 1 fg cel⁻¹, ou seja, passou a produzir vinte vezes mais toxina (Figura 13).

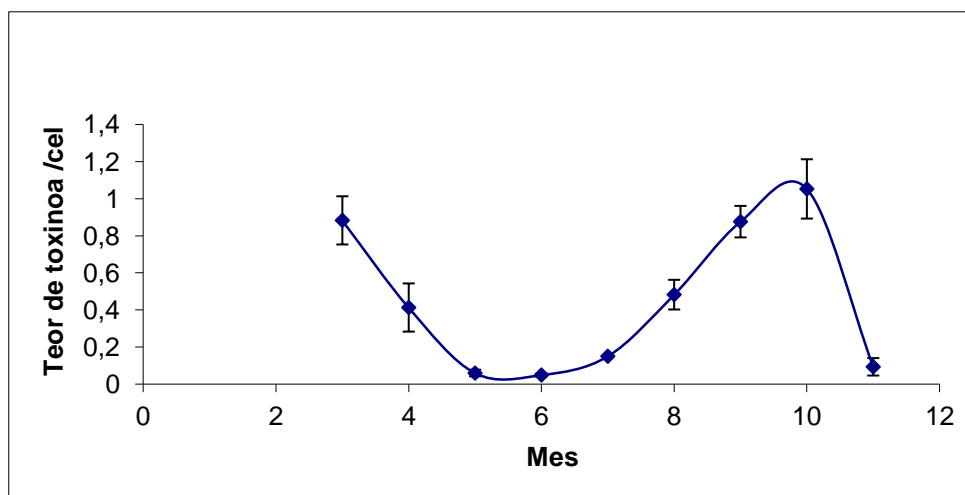


Figura 13: Teor de STX nas amostras coletada pela SANEPAR, na represa de Alagados (Ponta Grossa) durante o ano de 2006.

Nas últimas décadas documentaram-se a frequência da ocorrência de *Cylindrospermopsis* em águas de diferentes reservatórios Brasileiro (Tabela 6), e uma das regiões que se tem observado um aumento da frequência de trabalhos que relatam sua presença na região Sul. Os resultados neste trabalho comprovam este fato, pois foram registrados centenas de eventos onde a *Cylindrospermopsis* era predominante ou estava presente, e sendo esta a grande responsável pela produção de PSTs. Em estudos como Bouvy, *et al*, (2000) no estado de Pernambuco, dos 39 reservatórios amostrados,

entre setembro e novembro de 1998, 31 apresentaram florações de *Cylindrospermopsis* e, em 17 destes, esta cianobactéria representou 50% da densidade fitoplâncton total. Situação semelhante foi relatada na Austrália no estado de Queensland, entre outubro de 1997 e junho 1999. Dos 47 reservatórios de águas amostrados, 35 apresentaram população de *Cylindrospermopsis* (McGregor and Fabbro 2000), sendo que em 15 estas cianobactéria foi dominante sazonalmente e em 1 durante o ano inteiro. Assim como no trabalho de McGregor and Fabbro (2000) foi observado que além de estar presente na grande maioria dos locais amostrados, e em locais como Ponta Grossa (PR) e Camaquã (RS), a *Cylindrospermopsis* esteve presente e dominante durante as quatro estações do ano. Mostrando que assim como em diferentes partes do mundo e do país a cianobactéria *Cylindrospermopsis* é uma invasora que está predominando em diferentes corpos d'água dos estados do Rio Grande do Sul e Paraná.

Embora muito se saiba sobre sua química e farmacologia, as toxinas PST raramente têm sido estudadas quanto ao metabolismo das cianobactérias produtoras de PST. Os estímulos que induzem ou reprimem a produção de toxina por cianobactérias são atualmente desconhecidos. Estudos de laboratório constataram que em condições mais favoráveis para crescimento, crescerão preferencialmente cianobactérias que produzem as toxinas PST (Sivonen & Jones, 1999), os resultados que mostram uma tendência no aumento no teor de PSTs por célula pode estar relacionado com a predominância das espécies de cianobactérias que produzem mais toxinas sobre as que produzem menos.

5.3 ISOLAMENTO E CULTIVO

Após centenas de tentativas de cultivo e isolamento, os trabalhos resultaram em 5 cepas isoladas e cultivadas em laboratório (Figura 14 e 19), destas cepas isoladas 4 eram de *Cylindrospermopsis sp.* sendo elas da represa de Alagados (Ponta Grossa – PR), da barragem Arroio do Duro (Camaquã – RS), da barragem do Rio Buratti (Farroupilha-RS) do lago do parque professor Theobaldo Dick (Lajeado - RS), e uma *Raphidiopsis sp.* do lago Biguás (Rio Grande – RS)

O trabalho também contou com a cepa T3 (Figura 20), *Cylindrospermopsis raciborskii*, que foi isolada do reservatório Taiacupeba em São Paulo por Pedro Zagatto (Zagatto, 1995) e, gentilmente, cedida pelo Dr. Alessandro Minillo da Universidade de São Paulo (USP), de São Carlos.

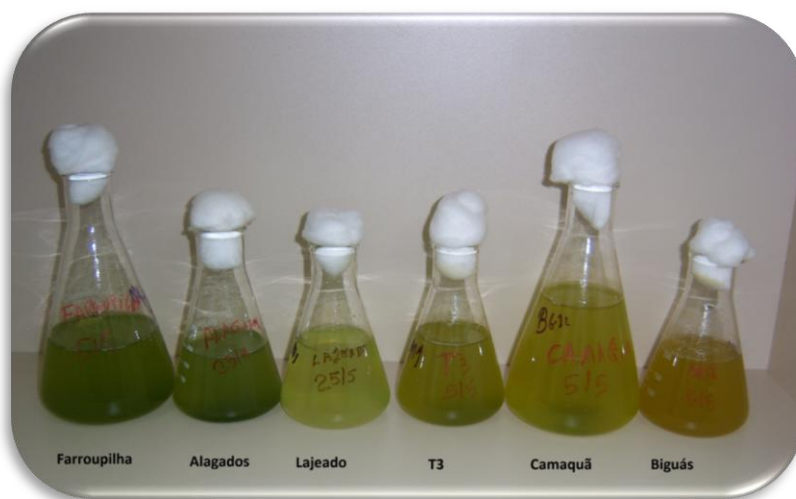


Figura 14: Fotografia das 6 cepas usadas no trabalho

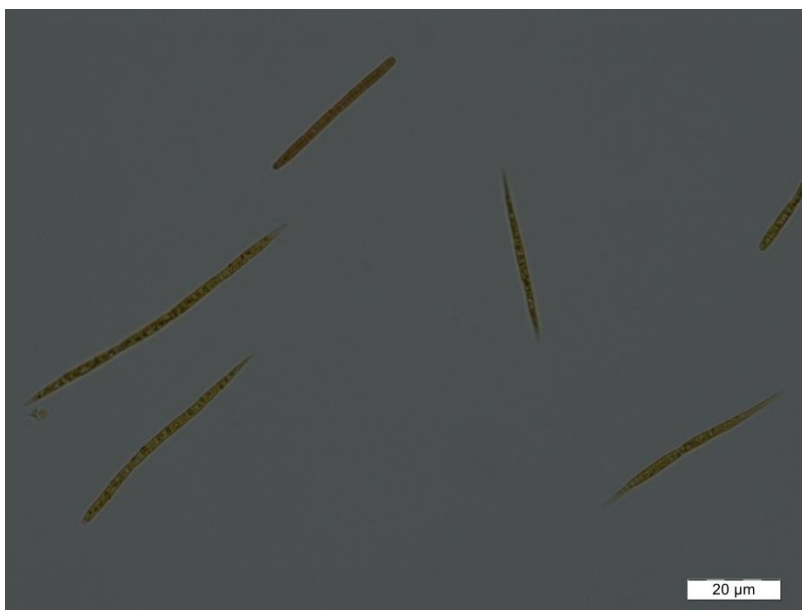


Figura 15: Imagem de microscopia ótica da cepa de Alagados.



Figura 16: Imagem de microscopia ótica da cepa de Camaquã.

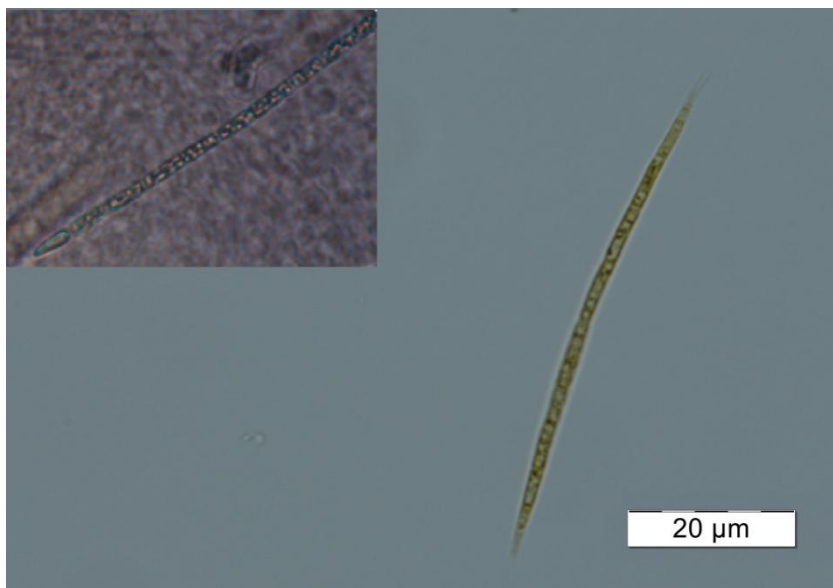


Figura 17: Imagem de microscopia ótica da cepa de Farroupilha.



Figura 18: Imagem de microscopia ótica da cepa de Lajeado.



Figura 19: Imagem de microscopia ótica da cepa de Biguás.

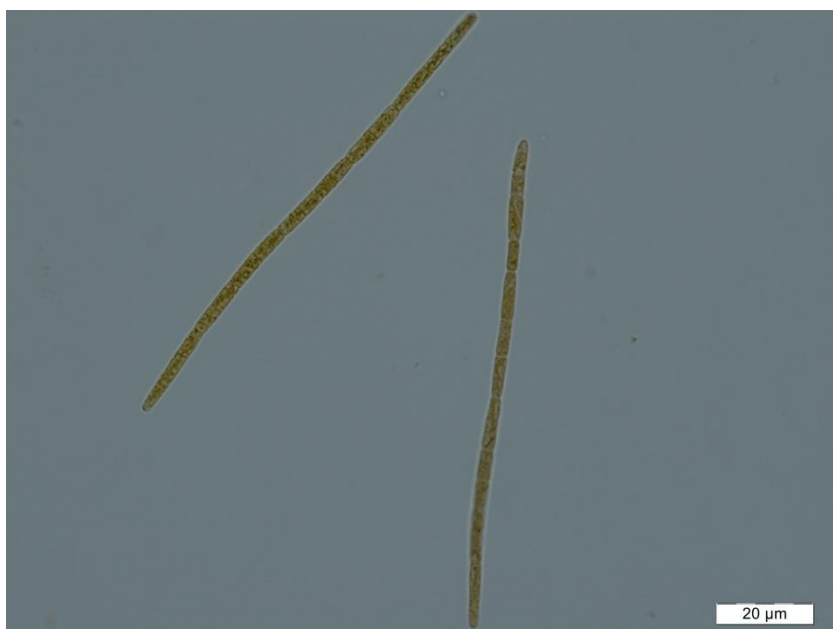


Figura 20: Imagem de microscopia ótica da cepa T3.

A micropipetagem e as lavagens sucessivas mostraram-se eficientes para o isolamento destes organismos filamentosos. A vantagem desses métodos é a diminuição

do crescimento de bactérias na cultura, possibilitando a obtenção de culturas unialgais. O isolamento de cianobactérias é um processo que, embora simples, é sempre muito moroso e com baixo sucesso (Vázquez-Martínez *et al.* 2004 Choi *et al.* 2002).

No período de 2007 a 2009, isolaram-se 4 cepas de *Cylindrospermopsis sp.* e uma de *Raphidiopsis sp* com uma percentagem de sucesso de 4,5%.

A importância da obtenção de culturas unialgais de cianobactérias tóxicas é permitir estudos contínuos acerca de muitas espécies desses organismos em várias linhas de pesquisas (ficologia, fisiologia, genético e toxicologia), e também obter como matéria-prima para produção das cianotoxinas purificada.

Um emprego de culturas unialgais planctônicas é em estudos ecofisiológicos, com acoplamento entre os trabalhos de campo e de laboratório. Também podem ser usadas em alguns experimentos em tratamento de águas para abastecimento público. As pesquisas nesse sentido encontram-se atualmente em pleno desenvolvimento, abrindo novas perspectivas para trabalhos de ecologia aquática.

Para efetuar a caracterização morfológica das culturas, foram medido o comprimento (medição na direção do crescimento do tricoma) e a largura (medição na direção perpendicular ao crescimento do tricoma).

A classificação taxonômica de espécies cianobactérias, utilizando a microscopia óptica é difícil, por vezes pouco precisa, exigindo uma formação especializada e treinada. As células são de pequenas dimensões o que, associado à sua estrutura muito simples, torna a sua morfologia bastante semelhante entre espécies do mesmo gênero.

Segundo critérios morfológicos tradicionais, a forma do filamento é um caráter taxonômico que distingue espécies diferentes. Segundo Komarková (1998), as formas retas são identificadas como *C. raciborskii*, e as espiraladas *C. philippinensis* (Taylor)

Komárek e *C. catemaco* Komarková-Legnerová et Tavera. No entanto, admite-se atualmente que é próprio da *C. raciborskii* apresentar uma extensa plasticidade fenotípica refletindo-se em filamentos retos, sigmóides ou espiralados que podem ocorrer simultaneamente (Bouvy *et al.* 1999, 2000). Nas cepas isoladas neste trabalho a plasticidade fenotípica das *Cylindrospermopsis*, apresentando em momentos diferentes uma morfologia diferente, como pode ser observado na Figura 13, onde a cepa de Camaquã apresentava no mesmo cultivo o ticom na forma reta e espiralado oque já foi observado por diversos autores, no Brasil (Bouvy *et al.* 1999, 2000,) e em outros países (Fabbro *et al.* 1996, McGregor & Fabbro 2000, Saker *et al.* 1999, Dyble *et al.* 2002)

A técnicas filogenéticas seriam necessárias para complementar a classificação taxonômica das cepas isoladas neste trabalho, como a técnica de biologia molecular PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizada já em inúmeros laboratórios (Rasmussen & Svenning, 1998; Fergusson & Saint, 2003).

5.4 DIFERENÇA NA PRODUÇÃO DE TOXINAS ENTRE AS FLORAÇÕES AMBIENTAIS E AS CEPAS CULTIVADAS EM LABORATÓRIO

Nos cultivos em laboratório não houve diferença significativa entre a densidade de filamentos das cepas de *Cylindrospermopsis* sp. (Farroupilha, Camaquã, Alagados e Lajeado). No entanto, a cepa de *Raphidiopsis brookii* apresentou densidade significativamente maior que as cepas Alagados e Lajeado (Figura 21.).

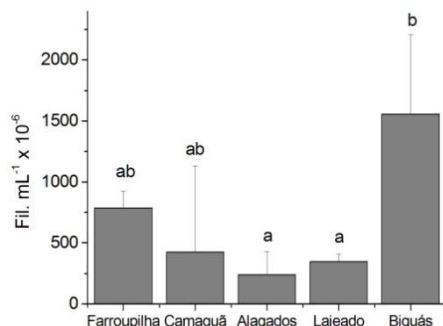


Figura 21: Número de filamentos por mililitro das cepas Biguás, Farroupilha, Lajeado, Alagados e Camaquã em meio de cultura ASM1, com ANOVA de uma via (*a*, *b* e *ab*).

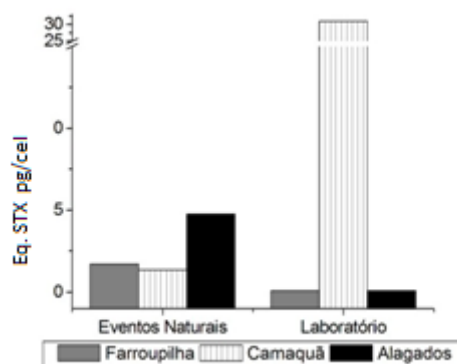


Figura 22: Comparação do teor de equivalentes de Eq.STX (pg Cel⁻¹) em eventos naturais e de suas respectivas cepas em meio ASM1 de Farroupilha, Camaquã e Alagados.

A produção de toxina pelas cepas variou qualitativa e quantitativamente quando comparada à produção pelas florações em seus eventos naturais (Figura 22 e Tabela 17). As cepas Farroupilha, Camaquã e Alagados produziam em seus mananciais três tipos diferentes de PSTs cada uma, e passaram a produzir em laboratório apenas uma ou duas variantes. Lajeado seguiu produzindo apenas uma variante, enquanto Biguás, que

produzia duas, passou a produzir apenas uma. Farroupilha, Camaquã, Lajeado e Biguás deixaram de produzir suas toxinas de origem (STX, DC-STX, GTX-1, GTX-2, GTX-3, GTX-5) e passaram a produzir Neo-STX. Apenas Farroupilha e Alagados seguiram produzindo algumas das toxinas que produziam em seus mananciais (STX e Neo-STX, respectivamente), conforme visto na Tabela 17.

Enquanto Farroupilha e Alagados tiveram uma redução de 1,70 para 0,10 e 4,77 para 0,10 no teor de toxina expresso em Eq. de STX pg Cel⁻¹, respectivamente, Camaquã teve um aumento de 1,36 para 31,00 Eq. STX pg Cel⁻¹, resultado que pode ser observado na Figura 21.

Tabela 17 Toxinas produzidas pelas cianobactérias de Biguás, Farroupilha, Lajeado, Alagados e Camaquã em eventos naturais no ambiente e em cepas cultivadas em meio ASM1 no laboratório, as quais foram isoladas a partir das suas florações naturais.

	Farroupilha	Camaquã	Alagados	Lajeado	Biguás
Eventos Naturais	GTX2	GTX2	GTX2	GTX1	DC-STX
	GTX3	GTX3	GTX3		STX
	STX	GTX5	Neo-STX		
Laboratório	Neo-STX	Neo-STX	Neo-STX	Neo-STX	Neo-STX
	STX		STX		

A ocorrência irregular da toxicidade nas cianobactérias ainda não foi devidamente esclarecida e uma questão importante que precisa ser considerada nesta variabilidade é: Existem cepas geneticamente distintas que não produzem toxinas ou fatores ambientais que regulariam a síntese dessas toxinas? (Carmichael,1992). Além

disso, está se tornando cada vez mais frequente a ocorrência de florações tóxicas (Carmichael & Gorham, 1981; Sivonen *et al.*, 1990; Lawton & Cood, 1991; Watanabe *et al.*, 1991, Costa & Azevedo, 1995).

A produção de cianotoxinas depende de vários fatores e estes influenciam de maneira distinta nas diversas espécies de cianobactérias, que respondem de forma diferente para cada condição ambiental específica (luminosidade, temperatura, concentrações de nutrientes, pH e micronutrientes), em razão da qual não se podem fazer generalizações relativas aos efeitos de qualquer uma variável ambiental na produção de toxinas (Domingos, 2001).

Neste contexto surge uma polêmica, não se sabe se em uma floração onde morfologicamente se tem apenas uma espécie, na realidade exista geneticamente mais de uma espécie e as condições do meio que vai determinar qual vai prevalecer, mudando assim o perfil toxicológico da floração, ou se em uma florações onde morfologicamente e geneticamente existe realmente uma única espécie são as condições do meio que influenciam na produção de toxina. Com os resultados deste trabalho, devido não existirem dados genético das florações e cepas, não foi possível concluir se a condições do meio seleciona uma ou outra espécie ou se é a espécie que muda seu perfil em função das condições do meio. Mas constatamos, que um ou até mesmo os dois fenômenos ocorrem, o fato é que em condições diferentes as cepas ou florações de *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*, produzem toxinas diferentes. Isto impossibilita que as pesquisa de laboratório sejam extrapoladas para o ambiente, já que as produções de toxina em laboratório são diferentes do ambiente, e que provavelmente outros parâmetros também sejam diferentes em diferentes condições de cultivos.

5.5 TOLERÂNCIA A SALINIDADE PELA *CYLINDROSPERMOPSIS SP*, E SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE TOXINAS

5.5.1 EXPERIMENTO EM SANIDADE 0, 5, 10 E 20

Os resultados do experimento com diferentes salinidade podem ser observados na Figura 23, onde consta-se que na salinidade 5 não houve mudança significativa no teor de toxina intracelular, durante o tempo de experimento, comparado com o controle, foram $0,32 \pm 0,010 \text{ ng } \mu\text{m}^{-1}$ de Eq. STX para o controle e $0,30 \pm 0,010 \text{ ng } \mu\text{m}^{-1}$ de Eq. STX para salinidade 5. Já nas salinidades 10 e 20 após a primeira hora de experimento já não havia toxina intra celular, pois foi observado o rompimento das células (morte), liberando a toxina para o meio.

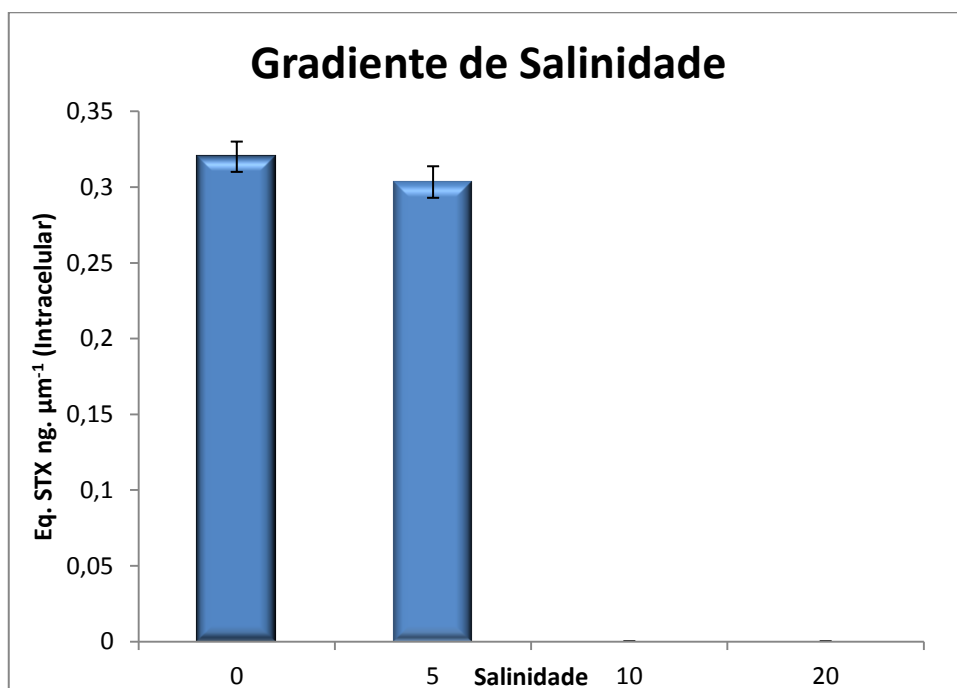


Figura 23: Teor de toxina intracelular de culturas de *Cylindrospermopsis raciborskii* expostas a diferentes salinidades.

5.5.2 CULTIVO COM SALINIDADE 0 E 5

Os resultados das análises e das contagens podem ser vistos na Tabela 18.

Nos cultivos sem adição de sal marinho o número de células era de $31,14 \cdot 10^6$ cel mL⁻¹ e o teor de toxina foi em média 1,00 ng cel⁻¹ de Neo-STX e 0,07 ng cel⁻¹ de STX ou seja, aproximadamente 1,0 ng cel⁻¹ de equivalentes de STX, seguindo aproximadamente, os teores e as proporções (9:1) que a cepa produz em condições normais de laboratório. Já na salinidade de 5, o número de células foi reduzido expressivamente à $1,23 \cdot 10^6$ cel mL⁻¹, e o teor de toxina foi em média de 0,28 ng cel⁻¹ de Neo-STX e de 0,29 ng cel⁻¹ de STX, resultando num total de aproximadamente 0,55 ng cel⁻¹ de equivalentes de STX, e ficando numa proporção de aproximadamente 1:1.

Tabela 18: Resultados das análises de PSTs e contagens de células nos cultivos sem adição de sal e com adição de sal marinho até atingir salinidade 5, ambas em meio de cultura ASM1.

Salinidade	N° cel mL ⁻¹	Teor de STX (ng cel ⁻¹)	Teor de Neo-STX (ng cel ⁻¹)	Teor de Eq.STX (ng cel ⁻¹)
0	$31,14 \cdot 10^6$	0,07	1,00	0,995
5	$1,23 \cdot 10^6$	0,29	0,28	0,548

Outra diferença observada entre os cultivo sem adição de sal e com adição de salinidade 5, é a morfologia e a coloração da célula como pode ser observado na Figura 24. Na salinidade 5 os filamentos ficaram mais estreitos e com uma coloração mais azulada, isto comprova que não foi somente a produção da toxina e o crescimento que foram alterados com salinidade 5, mas também outros parâmetros.

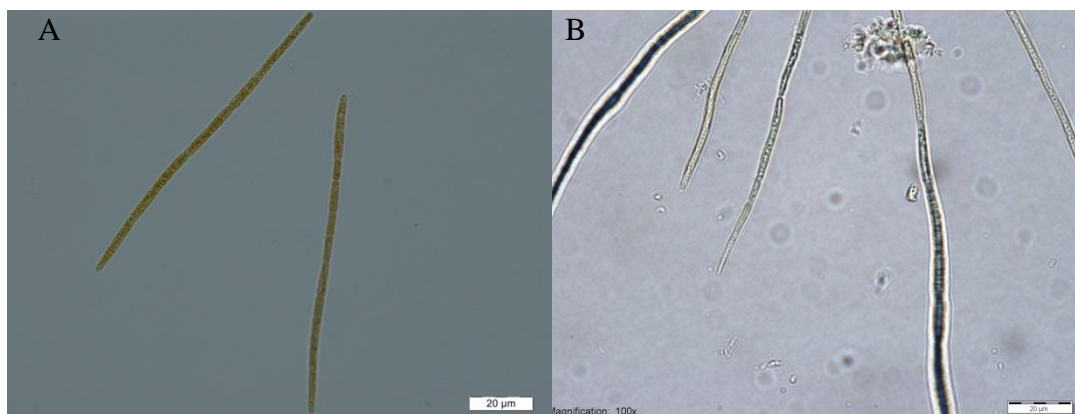


Figura 24: Imagem de microscopia ótica da cepa T3, sendo A sem adição de sal e B com salinidade 5.

Há relatos conflitantes sobre a tolerância da espécie *C. raciborskii* com relação à salinidade e seu crescimento. Segundo Dobberfuhl (2003), o magnésio pode ser um fator limitante para o crescimento da *C. raciborskii*. No trabalho de Moisander *et al.* (2002), na Carolina do Norte, foram verificada uma queda no crescimento da *C. raciborskii* com salinidade de 2 de NaCl, sendo 4 a salinidade limite para o crescimento da espécie. No entanto, foi registradas duas vezes no Mar Cáspio em salinidades de 15-20 (Padisák 1997). Semelhante à maioria das cianobactérias, *C. raciborskii* não é encontrada em águas ácidas, ocorrendo tipicamente em lagos com um pH de 8,0 a 8,7 (Padisák 1997).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a cepa em estudo não tem a mesma tolerância que as do estudo de Padisák (1997), mas foram semelhantes aos de Moisander *et al.* (2002), onde a *C. raciborskii* tem baixa tolerância à salinidade. A cepa em estudo teve seu crescimento comprometido em salinidade 5 morrendo na salinidade 10. Outro fator importante é que no experimento deste trabalho foi usado sal marinho (comercial saludem®, com a composição aproximada dos principais íons do sal sendo:

Cloreto (Cl^-) 55,04%; Sódio (Na^+) 30,61%; Sulfato (SO_4^{-2}) 7,68%; Magnésio (Mg^{+2}) 3,69%; Cálcio (Ca^{+2}) 1,16% e Potássio (K^+) 1,10%) que simula melhor o efeito de uma entrada de massas de águas oceânicas em uma região estuarina, do que com o uso de NaCl. Os resultados mostraram que esta *C. raciborskii* não sobrevive em regiões estuarinas com a salinidade superior a 5. No caso da Lagoa dos Patos (RS), na maior parte do ano a salinidade não ultrapassa 5 em sua extensão (Barbosa & Melo 2009), o que permitiria a ocorrência de florações de *C. raciborskii*.

5.6 COMPARAÇÕES ENTRE OS IMUNOENSAIOS PARA SAXITOXINAS E A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Na Tabela 19 e na Figura 25, estão descritos os resultados obtidos para as análises por cromatografia e ensaio imunoenzimático.

Tabela 19. Comparação entre os resultados em equivalentes de STX ($\mu\text{g L}^{-1}$) analisados por CLAE-RF e as técnicas de imunoensaio

Diluições (N° Cél mL ⁻¹)	Equivalentes de STX em $\mu\text{g L}^{-1}$		
	CLAE	ABRAXIS	BIOO SCIENTIFIC
400000	2,18 ($\pm 0,005$)	2,24 ($\pm 0,255$)	3,00 ($\pm 0,096$)
200000	1,24 ($\pm 0,098$)	1,20 ($\pm 0,111$)	1,64 ($\pm 0,163$)
100000	-	0,79 ($\pm 0,001$)	1,02 ($\pm 0,102$)
50000	-	0,50 ($\pm 0,001$)	0,47 ($\pm 0,135$)
25000	-	0,32 ($\pm 0,029$)	-
12000	-	0,19 ($\pm 0,001$)	-
0	-	-	-

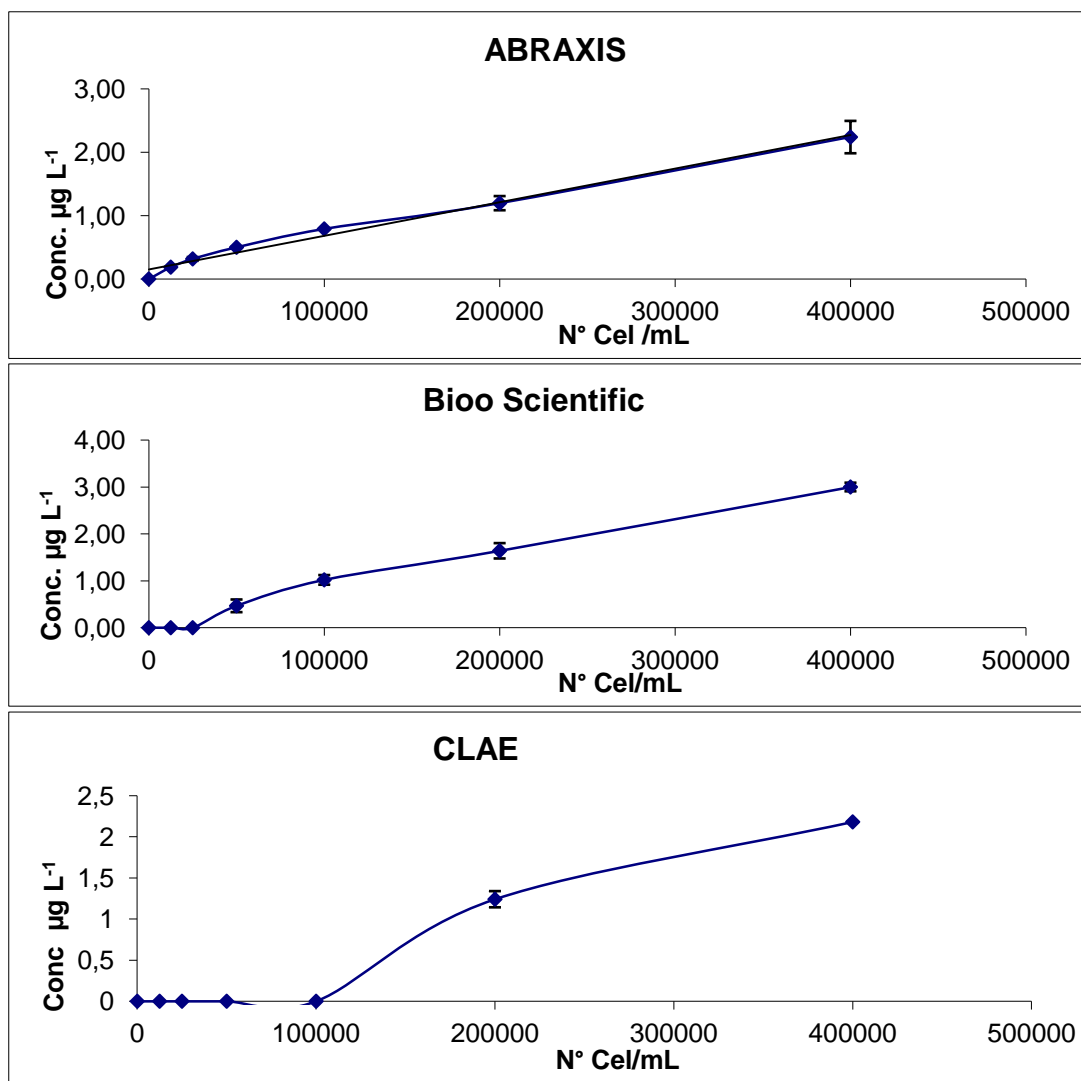


Figura 25. Relação entre o número de células e concentração em Eq. de STX analisados pelos métodos de imunoenensaio e cromatografia líquida.

Tendo em vista que as florações de cianobactérias produtoras de PST estão cada vez mais frequentes em águas brasileiras, obter técnicas confiáveis para detectar e quantificar estas toxinas é de extrema importância, no que diz respeito ao monitoramento das mesmas.

O primeiro método difundido (AOAC, 2000; NSSP, 2007; EFSA, 2009) para avaliar a concentração das PSTs foi o bioensaio com camundongo, e que apesar de

vários inconvenientes, incluindo baixa sensibilidade e reprodutibilidade, este método ainda continua sendo o método oficial de referência PSTs para determinação em muitos países. Vários métodos têm sido desenvolvidos com o objetivo de substituí-lo, destacando-se os métodos por CLAE e os ensaios imunoenzimático (ELISA), cada qual com suas vantagens e desvantagens. Os métodos cromatográficos são os mais confiáveis, porém muito mais complexos e demorados (de 2 a 3 dias, para o resultado final) além de depender de padrões de calibração os quais, até o momento, não são produzidos no Brasil, apresentando um custo elevado e uma demanda tempo até chegar ao laboratório. Em 2005, um método cromatográfico foi regulamentado para substituir os bioensaios, que foi o método de Lawrence *et al.*, (1995) validado para detectar PSTs, sendo hoje considerado um método regulamentado alternativo, adotado com exemplo pela AOAC (2005). Apesar da aprovação do método a Lawrence *et al.* (1995), este não foi implementado para monitoramento de rotina por uma série de razões. O tempo é uma delas, pois no método de Lawrence *et al.* (1995) demanda muito tempo e tem sido otimização por vários autores (Ben-Gigirey & Villar-González, 2008; Etheridge, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010; DeGrasse *et al.*, 2011), e está continuamente sendo otimizado, não sendo considerado um método concluído.

Os ensaios imunoenzimático ELISA são simples e rápidos (com resultado em aproximadamente 90 minutos), estes Kits são produzidos por vários fabricantes, sendo que há representantes comerciais no Brasil, porém os resultados são apenas estimados. A exatidão dos Kits ELISA depende muito do perfil de toxinas, devido à reatividade cruzada. Por exemplo, Etheridge *et al.*,(2006) considerou que o ELISA estima bem as concentrações PSTs sendo um bom indicador, onde STX foi o análogo dominante e dcSTX e B1 estiveram presentes em níveis baixos. Já em outros casos onde o perfil da

toxina é mais complexo, ou seja, com diferentes análogos, se torna difícil para os kits apresentarem resultados mais precisos e exatos como descreveu Costa *et al.*(2009). Neste estudo, amostras complexas foram analisadas por ELISA e, comparando com outros métodos, tendo oscilado entre resultados superestimados e subestimados dependendo das variantes de PSTs predominante na amostra. Sendo assim, as conclusões foram semelhantes às de Costa *et al.*(2009) que considerou o uso dos ELISA propício apenas para fins de triagem.

A cepa de *Cylindrospermopsis* usada neste experimento produzia apenas NEO-STX e STX na proporção 3:1. Dentre as técnicas de análises usadas não apresentaram falso positivo e os ensaios imunoenzimáticos apresentaram uma maior sensibilidade do que o CLAE-RF. Entre os Kits, o da Abraxis foi o mais sensível. O método que utiliza HPLC só detectou as PSTs quando o número de células era de no mínimo 200 mil por mL. O kit da Bioo Scientific detectou PSTs a partir de 50 mil células por mL e o da Abraxis com apenas 12 mil células por mL. Todos os métodos testados tiveram uma correlação linear com o número de células e essa correlação foi muito próxima entre os três métodos, sendo importante ressaltar que a cepa analisada produzia apenas Neo-STX e STX, e que em amostras ambientais a composição das variantes de PSTs é mais complexa, contendo outros análogos como as GTXs e C toxinas, além de outros compostos naturais que podem interferir na quantificação, no caso dos imunoenaios. Alguns autores que estudaram casos de florações no Brasil, relataram a presença de outras variantes além da STX e Neo-STX.

5.7 PURIFICAÇÃO

Os extratos concentrados das culturas cultivadas a 28°C tinham concentrações de aproximadamente 3mg L⁻¹ de Neo-STX (tempo de retenção de 10,78 min.) e 1mg L⁻¹ STX (tempo de retenção de 16,13 min). A estas concentrações foi viável para purificar as duas variantes, apesar de uma série de interferentes presentes no extrato, como mostra a (Figura 26).

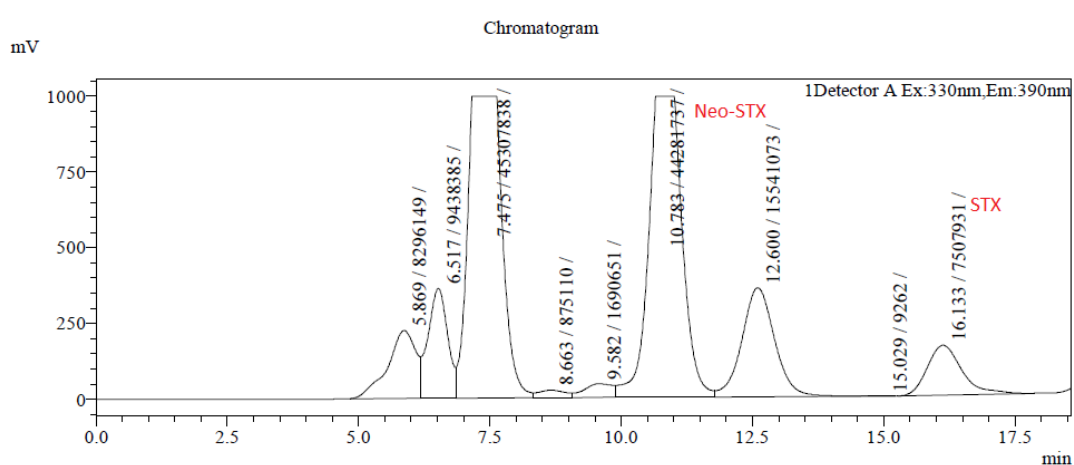


Figura 26. Cromatograma pelo método de pós-derivatização, método de Oshima (1995) do extrato bruto, pós-concentração.

Com o monitoramento por UV (Figura 27) foi possível selecionar, das 150 frações coletadas, quais seriam analisadas por fluorescência. Foram analisadas aquelas que continham os picos, ou fração de pico, com absorvância em 200nm, e correlacionando estes cromatogramas, foi possível determinar qual o perfil da absorvância e o tempo de retenção que continha as frações com PSTs. As toxinas foram encontradas entre a oitava a vigésima fração coletada, que é o pico entre o tempo de retenção de quatro a dez minutos, que pode ser observado na Figura 27.

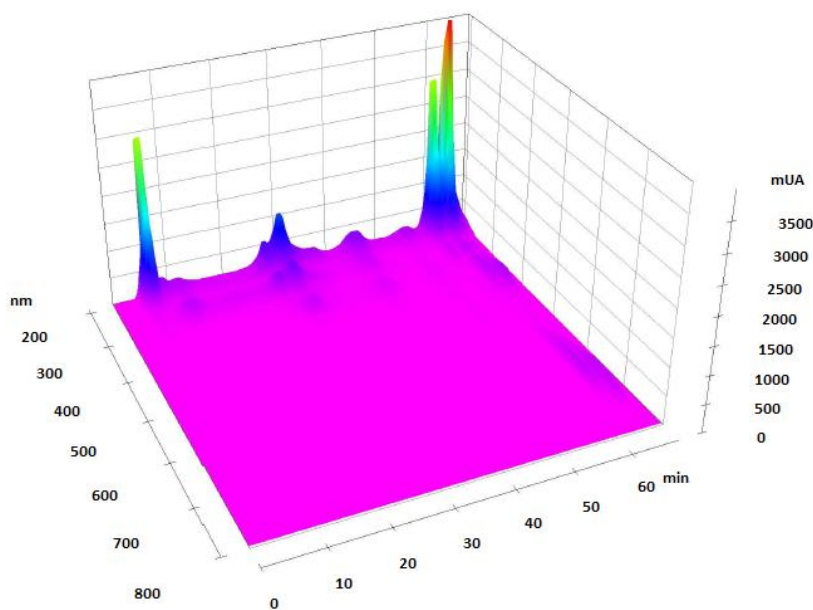


Figura 27. Espectro de UV em 3D das toxinas durante a purificação com a fase móvel 3, a partir do extrato bruto.

Através das análises das frações coletadas na purificação, foi possível determinar qual fase móvel é a mais adequada para ser usada na produção dos padrões de Saxitoxinas, sendo a fase móvel 3 que apresentou os melhores resultados. Esta resultou em frações com pureza das PSTs maior que 95% (pureza cromatográfica determinada através da varredura no UV e análise HPLC-RF), constituída por HCl 0,5 mol L⁻¹ e com acetonitrila (4 a 8%). Como em condições normais, de temperatura e pressão, a acetonitrila volatiliza facilmente, o padrão fica dissolvido apenas em HCl 0,5 mol L⁻¹, e nesta solução as toxinas são estáveis. Esta solução é a mesma que os padrões comerciais vem diluídos, não havendo a necessidade de nenhum tratamento ou reação adicional, os quais incluiriam perdas e degradações.

As demais fases móvel não apresentaram resultados satisfatórios, com frações de pureza das PSTs entre 80 e 90%, além de terem o inconveniente de conterem os sais de

suas respectivas fases móveis dissolvidos junto com as toxinas, os quais teriam que ser removidos, o que resultaria em perdas de toxinas.

Após a purificação com os eluentes da fase móvel 3, no gradiente descrito na Tabela 13, as frações foram analisadas segundo o método de Oshima (1995). As frações que continham os maiores teores de toxina (>95% pureza) e que já estavam em HCl 0,05 mol L⁻¹, foram separadas e consideradas padrão. Os padrões poderiam conter somente uma variante de PST (Figura 28 e 29) ou as duas (Figura 30)

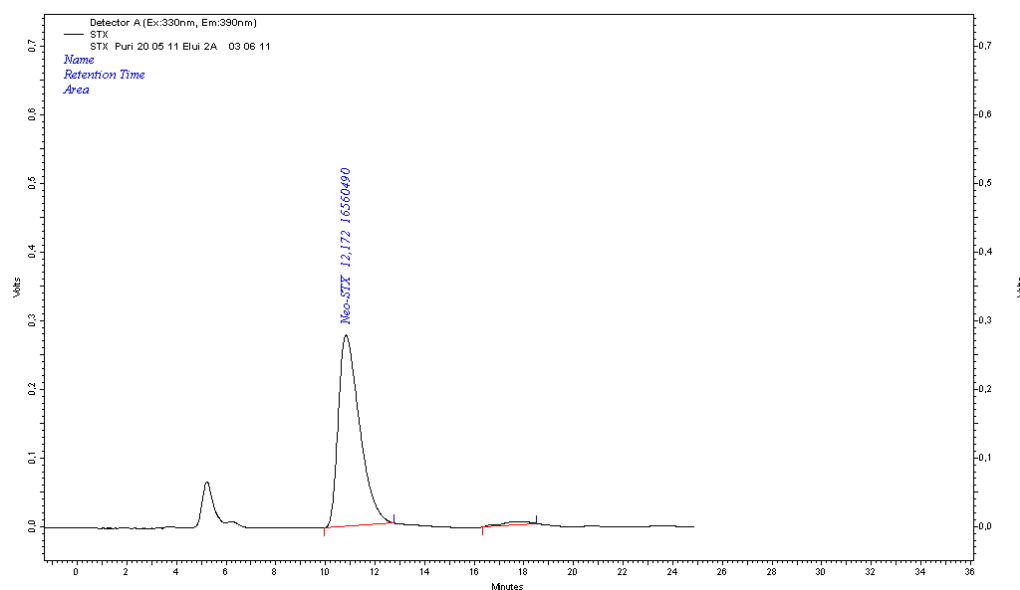


Figura 28: Cromatograma da fração que continha o maior teor de Neo-STX.

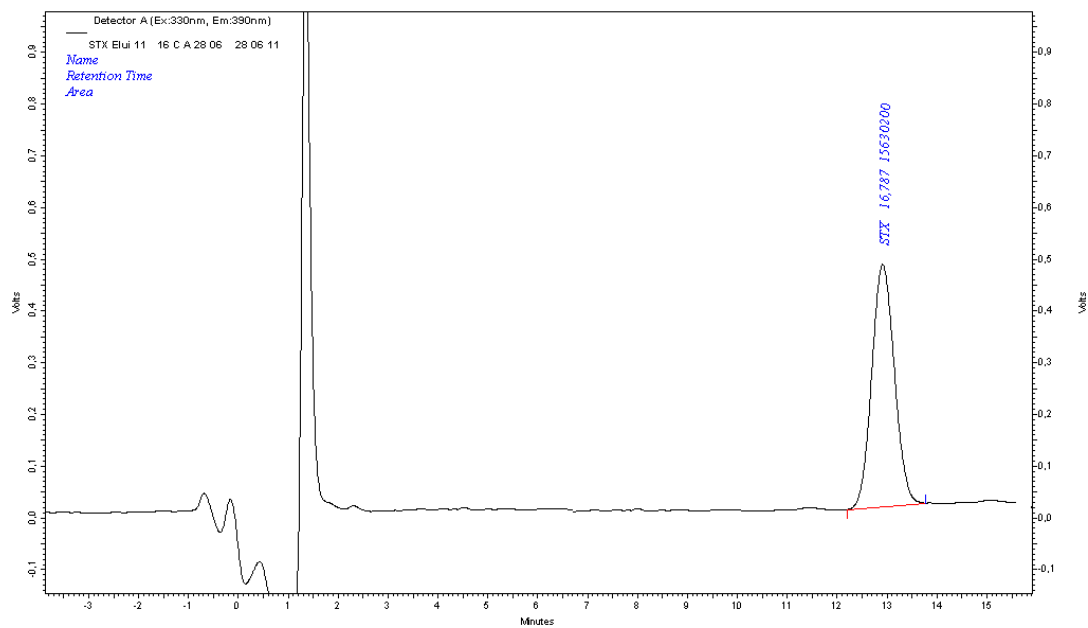


Figura 29: Cromatograma da fração que continha o maior teor de STX.

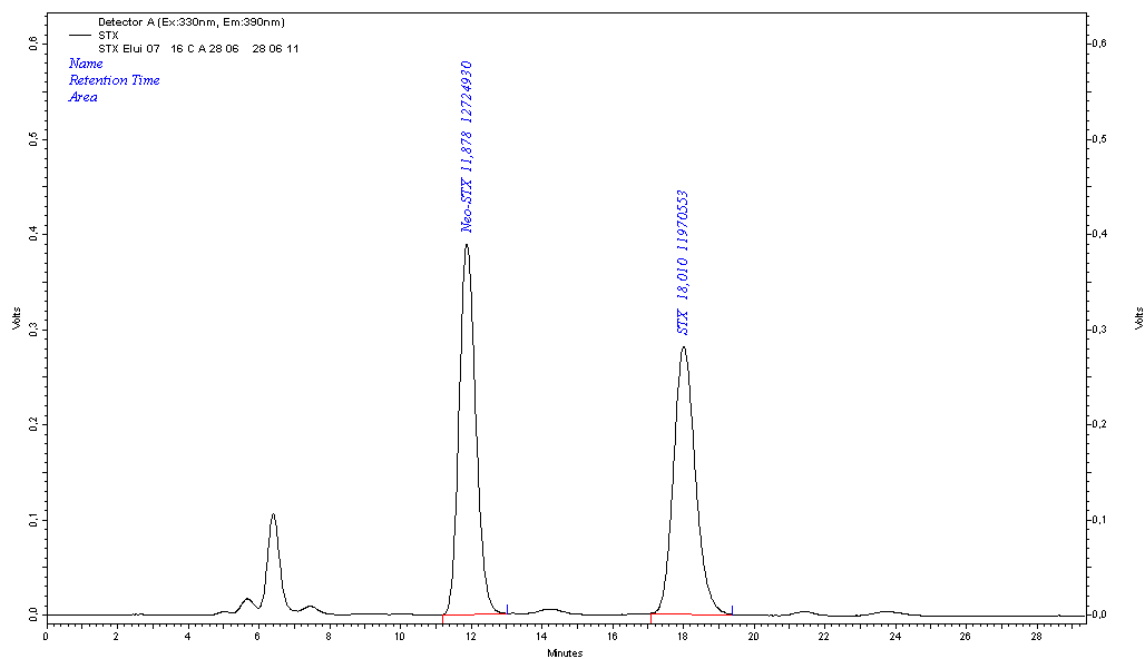


Figura 30: Cromatograma da fração que continham Neo-STX e STX.

Desta forma obtidas frações que continham apenas Neo-STX, outra intermediária que continha as duas variantes Neo-STX e STX e uma última que continha apenas a STX. A primeira foi denominada Padrão de Neo-STX, a segunda de Mix Neo-STX e STX e a terceira de Padrão de STX. Sendo que Mix também poderia ser feito da mistura do Padrão de Neo-STX e do Padrão de STX. As cepas usadas neste trabalho, em condições ideais de laboratório, produzem predominantemente Neo-STX, o que dificulta a produção do padrão de STX. No entanto, se as cepas forem cultivadas a 16°C passam a produzir predominantemente STX (Medeiros, 2011), o que facilita a purificação desta variante.

O primeiro padrão a ser produzido por esta metodologia foi o de Neo-STX, o qual foi analisado por espectro de massa no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas pelo Prof. Dr. Ernani Pinto e Dr. Felipe Augusto Dörr, do departamento de análises clínicas e toxicológicas – FCF/USP.

O espectro do padrão produzido neste trabalho foi comparado com os padrões comerciais (Figura 31 e 32)

Os cromatogramas de EM podem ser vistos na Figura 31.

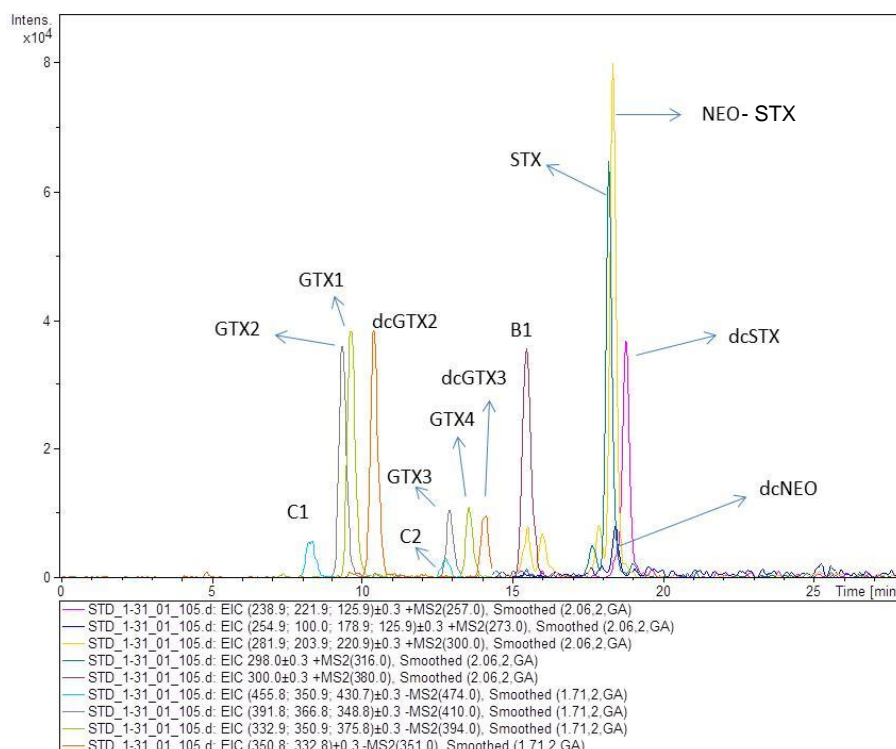


Figura 31: Cromatograma dos padrões PSTs, analisados por EM.

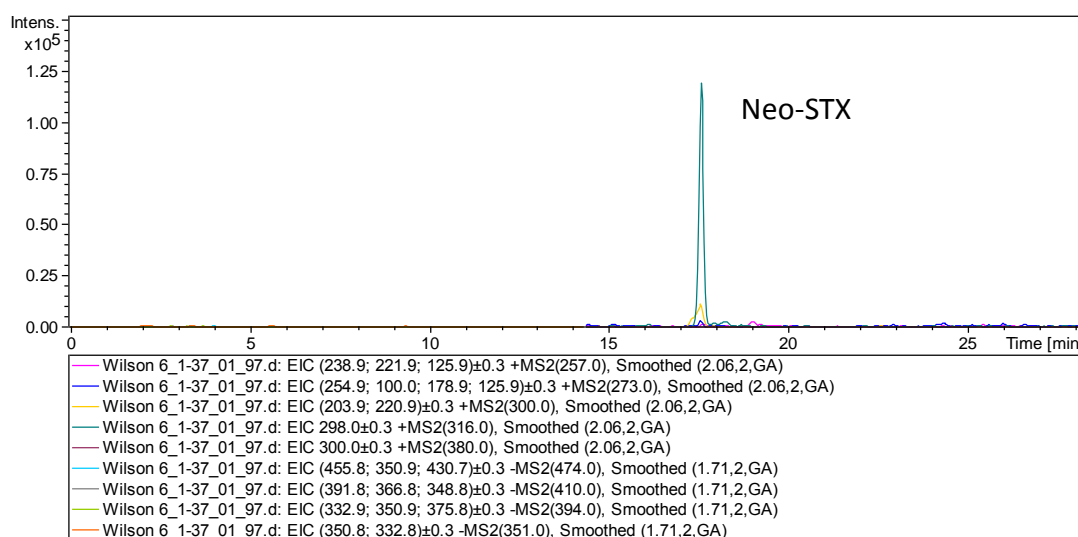


Figura 32: Cromatograma do padrão de Neo-STX produzido pela metodologia desenvolvida neste trabalho analisado EM.

O rendimento do processo de purificação foi de 50%, os padrões tinham concentrações de 1mg L⁻¹ e pureza satisfatória, maior que 95% (baseada na varredura

de 190 a 800 nm e por HPLC-FL), ideais para uso. As frações que não apresentavam pureza satisfatória foram armazenadas e posteriormente, reprocessadas, que aumenta o rendimento da purificação.

O direcionamento para a produção de uma ou de outra variante de PSTs, se deu a partir da variação na temperatura do cultivo, já que a cepa muda a proporção das variantes produzida em função da temperatura, o que foi discutido anteriormente.

Os trabalhos que existem na literatura, de metodologia de purificação de PSTs, como Watanabe *et al.*(2011), detalharam mais as interconverções químicas das variantes do que a metodologia de purificação em si. Sobre a metodologia de purificação foi citado apenas o uso de colunas como (Bio Gel P-2, 10 mm × 400 mm, Bio-Rad) e (Bio-Rex 70, 200–400 mesh, 10 mm × 400 mm, Bio-Rad), que são colunas de troca catiônicas com 40cm de comprimento, semelhantes as do trabalho de Laycock *et al.* (1994). E ainda, no trabalho de Watanabe *et al.*(2011), não mencionaram qual fase móvel foi utilizada enquanto que em Laycock *et al.*(1994) a metodologia é detalhada, porém, extensa, demorada e muito complexa.

Já neste trabalho, foi utilizada uma coluna de 15cm, preenchida com C18, onde a fase móvel continha apenas ácido clorídrico 0,5mol L⁻¹ e acetonitrila, que são reagentes comuns em laboratórios e de fácil aquisição. Pesquisadores que desejam ter a PSTs de interesse purificada necessitam apenas possuir o material utilizado e ter um organismo produtor ou amostra com a toxina, pois a metodologia de purificação é relativamente simples, podendo até purificar alguma variante que não está disponível no mercado.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados deste trabalho conclui-se que nos estados do Rio Grande do Sul e do Paraná existem florações de cianobactérias que são produtoras PSTs. Estas florações foram avaliadas por um período de 7 anos, de 2003 a 2009, sendo que no período de 2003 a 2004 foi detectado em média uma floração por ano, esta média passou para 15 no período de 2005 a 2008, e teve um aumento ainda mais expressivo em 2009, passando para 53. Apesar de serem dados de um período relativamente curto, existem evidências de que esta frequência pode estar aumentando. Este possível aumento está relacionado com as florações da cianobactéria *Cylindrospermopsis*, a qual é responsável pela produção de PSTs na grande maioria (95,7%) das amostras.

Outro fator evidenciado a partir dos resultados, é que o teor de toxina por célula de *Cylindrospermopsis* foi em média $0,1 \text{ fg cél}^{-1}$, porém podem ocorrer oscilações na média anual no teor de toxina por célula, por exemplo, $0,016 \text{ fg cél}^{-1}$. ($\pm 0,0097$) no ano de 2005 e $0,185 \text{ fg cél}^{-1}$. ($\pm 0,091$) em 2009 mostrando um aumento expressivo na produção de toxina. Além desta variação no decorrer dos anos, foi observada uma variação sazonal, nas amostras da SANEPAR para a represa de Alagados, quando uma floração de *Cylindrospermopsis* se estendeu ao longo de um ano e seu teor de toxina por célula esteve em média $0,05 \text{ fg cél}^{-1}$ nos meses do inverno e $1,00 \text{ fg cél}^{-1}$ nos do verão.

Com as amostras coletadas foi possível isolar cinco cepas de cianobactéria com potencial na produção de PSTs, as quais foram de extrema importância para realização deste trabalho, pois foram usadas como matéria-prima na produção de toxina purificada.

As cianobactérias *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* isoladas produziram diferentes toxinas, comparando a produção em florações ambientais, a produção das cepas cultivadas em laboratório. Desta forma, conclui-se que as cepas isoladas de florações alteram a produção de toxina no laboratório, quando comparadas com as florações de origem. Isto pode comprometer os resultados quando dados de laboratório são extrapolados para o ambiente, visto que os organismos isolados e mantidos em laboratório podem ter a produção de toxina, qualitativa e quantitativamente, distintas da qual realmente ocorre no ambiente.

Com os resultados dos testes de salinidade, concluiu-se que a cepa de *C. raciborskii* não tolera salinidade elevada e com salinidade relativamente baixa seu crescimento e a produção de toxina são comprometidos. No caso de uma floração de *C. raciborskii* em uma região estuarina, ou local onde haja um gradiente salino, com salinidade superior a 5 ela irá morrer e liberar toxina para a água, o que é um risco para toda a biota exposta à neurotoxina. Em locais com salinidade próxima 5, a *C. raciborskii* tem seu crescimento comprometido, diminuindo, em aproximadamente, trinta vezes o número de células e reduzindo à metade sua produção de toxina por célula.

Os resultados obtidos no presente trabalho e por outros pesquisadores, ficou evidenciado que a genética, fenótipo e produção de PSTs por *Cilindrospermopsis* é variável, o que confunde e leva pesquisadores a conclusões contraditórias e equivocadas. Tendo em vista que estas cianobactérias em questão apresentam uma genética complexa, com capacidade de produzir inúmeros análogos de toxina e apresentar diferentes morfologias, podem ser observados resultados diferentes. As

condições do meio podem ser naturais (florações no ambiente) ou artificiais (culturas em laboratório), sendo assim, a mesma cepa de cianobactéria, estudada por diferentes pesquisadores e em diferentes condições, apresenta resultados divergentes.

Na avaliação dos ensaios imunoenzimático, apesar dos bons resultados, estes devem ser testado frente a amostras de florações naturais, pois estas apresentam interferentes que podem alterar os resultados, e também presença de outras variantes de PSTs, que tem reações diferentes com os ensaios imunoenzimáticos, já que a cepa testada apresentava apenas Neo-STX e STX. Sendo assim podem ser usados apenas para fins semi-quantitativo ou triagem.

Com relação à metodologia desenvolvida para purificação das PSTs concluiu-se que esta metodologia, que usa cianobactérias como fonte de PSTs para purificar a toxina e produzir padrão, é uma metodologia simples que pode ser implantada em outros laboratórios. Tendo como vantagem que, no fim do processo, resultará em um purificado com a estrutura química igual às encontradas no ambiente, sendo a metodologia mais indicada para produção de padrão e purificação destas toxinas. A partir das cepas isoladas foi possível purificar as PSTs (Neo-STX e STX) com rendimento e pureza igual a outros trabalhos, os quais têm uma metodologia muito complexa.

Os padrões produzidos por este trabalho podem ser usados em pesquisas científicas e em calibração de equipamentos, tendo sido cedido para o professor José Fernando de Paiva do Instituto de Ciências Exatas e Biológica, da Universidade Federal de Ouro Preto, e estão sendo usados pela Unidade de Pesquisa em Cianobactérias da Universidade Federal do Rio Grande (RS).

7. PERSPECTIVAS

Como foi visto nos resultados deste trabalho, e no trabalho de outros autores, existem fatores físicos, químicos e biológicos que afetam a produção de toxina. Então será importante estudar as cepas isoladas, alterando as condições de cultivo para avaliar as mudanças na produção de toxina, o que poderá gerar resultados que elucidariam o porquê da produção das PSTs por estas cianobactérias, e também poderia gerar ferramentas que poderiam ser usados no meio ambiente para evitar ou minimizar a produção destas toxinas, e também potencializar e direcionar a produção das toxinas quando se tratar de cepas cultivadas para produção dos padrões de PSTs.

Ficou evidenciada a necessidade de avaliar a genética das cepas, para constatar se realmente as cepas são originárias de uma única espécie, e se geneticamente tem a capacidade de produzir inúmeras variantes de PSTs, porém produzem apenas algumas, sendo então esta produção determinada pelo meio ambiente.

Testar a metodologia de purificação em outras cepas de cianobactéria produtoras de PSTs, e em florações ambientais, para avaliar se a metodologia desenvolvida é aplicável para produções de padrão de outras variantes não purificadas neste trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAEDA H, TAKATANI T, ANAMI A. Mass outbreak of paralytic shellfish poisoning due to ingestion of oysters at tamano-ura, Goto islands, nagasaki, Japan. *Journal Food Hyg Soc Japan*. 39:272–274. 1998.

ALLEN, E. A. D., & P. R. GORHAM. Culture of planktonic cyanophytes on agar, p. 185-192. In W. W. Carmichael (ed.), *The water environment: algal toxins and health*. Plenum Publishing Corp., New York, 1981.

ALLEN, M.M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4- 3p. 1968.

ALVES, J. E. D. Considerações sobre projeções populacionais e econômicas para 2050 e seus impactos sobre a pobreza e o meio ambiente. *Aparte - Inclusão Social em Debate*, Rio de Janeiro, p. 1 - 14, 01 maio 2007.
<http://www.ie.ufrj.br/aparte/pdfs/popdesenvsustentavell_01mai07.pdf>

AOAC. Official Method. In: Horwitz, W. (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD. 2000.

AOAC Official Method. Paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish: prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. Official Methods of Analysis of AOAC International. 2005.

ARAGÃO N.K.C.V, MOURA N.A, FUENTES E.V. Variação espacial e temporal de cianobactérias em um reservatório eutrófico do agreste de Pernambuco. XII Congresso Brasileiro de Limnologia; Gramado, Brasil. 2009.

ASMUS, M.L. & TAGLIANI, P.R.A. Considerações sobre o manejo ambiental. In Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo Sul do Brasil (U. Seeliger, C. Odebrecht & P. Castello, eds). Ecoscientia, Rio Grande, p. 225-229. 1998.

AZEVEDO, S. M. F. O. & BRANDÃO, C. C. S. Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano. FUNASA/MS, Brasília, Brasil, 56p. 2003.

BÁCSI, I., G. VASAS, G. SURÁNYI, M. M. HAMVAS, C. MÁTHÉ, E. TÓTH, I. GRIGORSZKY, A. GÁSPÁR, S. TÓTH & G. BORBELY. Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate- or phosphate-starved cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS Microbiol Lett* 259: 303-310. 2006.

BARBOSA, F.G. & MELO, A.S. Predictive model of survival of the Golden Mussel (*Limnoperna fortunei*) in relation to variations of salinity in the Laguna dos Patos, RS, Brazil. *Biota Neotrop.* 9(3):

<http://www.biotaneotropica.org.br/v9n3/pt/abstract?short-communication+bn02809032009>. 2009.

BARROSO H.S, FERREIRA A.C.S, SANTAELLA S.T, AZEVEDO S.M.F.O, PÁDUA V.L. Caracterização da dominância de *Cylindrospermopsis raciborskii* no açude Acarape do Meio, Fortaleza-CE, e sua toxicidade. X Reunião da Sociedade Brasileira de Ficologia; Salvador, Brasil. 2004.

BAZZA, E.L; TRAIN, S; E THOMAZ, S.M. Flutuações na estrutura da comunidade fitoplanctônica durante o período de enchimento do reservatório de Corumbá (GO). In: *VII Congresso Brasileiro de Limnologia. Florianópolis*, p. 502. 1999.

BEASLEY, V.R., COOK, W.O., DAHLEM, A.M., HOOSER, S.B., LOVELL, R.A. & VALENTINE, W.M., Intoxication in livestock and water fowl. *Clinical Toxicology - Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 5:345-361. 1989.

BEN-GIGIREY, B., VILLAR-GONZÁLEZ, A. CHEMICAL ANALYSIS. IN: BOTANA, L.M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*, second ed. CRC Press, Taylor and Francis Group LLC, pp. 177–196. 2008.

BEN-GIGIREY, B., RODRÍGUEZ-VELASCO, M.L., VILLAR-GONZÁLEZ, A., BOTANA, L.M. Influence of the sample toxic profile on the suitability of a high

performance liquid chromatography method for official paralytic shellfish toxins control. J. Chromatography A 78-87. 2007.

BENTO A.P, SEZERINO P.H, OLIVO V.E, AMARAL A.D, ORTIGARA A.R.C.
Monitoramento de cianobactérias na água bruta do manancial de abastecimento do município de Fraiburgo – SC. XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental; Recife, Brasil. 2009.

BERGER C., BA N., GUGGER M., BOUVY M., RUSCONI F., COUTE A.,
TROUSSELIER M., BERNARD C. Seasonal dynamics and toxicity of
Cylindrospermopsis raciborskii in Lake Guiers (Senegal, West Africa). FEMS
Microbiol. Ecol. 57: 355-366. 2006.

BERNARD C, HARVEY M, BRIAND J.F, BIRÉ R, KRYS S, FONTAINE J.J.
Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii*: evidence of
liver damage caused by a French *C. raciborskii*. Environmental Toxicology; 18: 176-
186. 2003.

BITTENCOURT-OLIVEIRA M.C.; OLIVEIRA M.C.; YUNES J.S. Cianobactérias
Tóxicas: O Uso de Marcadores Moleculares para Avaliar a Diversidade Genética.
Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento nº 23. Nov/Dez. 2001.

- BORMANS, M., P. W. FORD, L. FABBRO, HANCOCK. G. Onset and persistence of cyanobacterial blooms in a large impounded tropical river, Australia. *Marine and Freshwater Research* 55(1):1-15. 2004.
- BOUAÏCHA, N. Impact Sanitaire des Toxines de Cyanobactéries en Milieu d'eau Douce. *Revue Française des Laboratoire*, 336: 39-46. 2001.
- BOUVY M, FALCÃO D, MARINHO M, PAGANO M, MOURA A. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology*; 23: 13-27. 2000.
- BOUVY M., N. BA, S. KA, SANE. S, PAGANO M, ARFI. R. Phytoplankton community structure and species assemblage succession in a shallow tropical lake (Lake Guiers, Senegal). *Aquatic Microbial Ecology* 45(2):147-161. 2006.
- BOUVY, M., R. MOLICA, S. DE OLIVEIRA, M. MARINHO, B. BEKER. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology* 20(3):285-297. 1999.

- BOWLING, L. Occurrence and possible causes of a severe cyanobacterial bloom in Lake Cargelligo, New South Wales. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 45(5):737-745. 1994.
- BOWLING, L. C. & BAKER, P. D. Major cyanobacterial bloom in the Barwon-Darling River, Australia, in 1991, and underlying limnological conditions. *Mar Freshw Res* 47, 643–657. 1996.
- BRAGA, B. HESPANHOL, I. LOTUFO, J. G. Introdução à engenharia ambiental: O desafio do desenvolvimento sustentável. 2. ed. SP: Pearson Prentice Hall, 318 p. 2005.
- BRANCO C.W.C & SENNA P.A.C. The taxonomic elucidation of the Paranoá lake (Brasília, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique*; 61: 85-91. 1991.
- BRANCO, C.W.C. & SENNA, P.A.C. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. *Algological Studies* 75:85-96. 1994.
- BRETSCHER, A. P., AND D. KAISER. Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium. *J. Bacteriol.* 133:763-768. 1978.

BRIAND, J. F., C. ROBILLOT, C. QUIBLIER-LLOBERAS, J. F. HUBERT, A. COUTE AND C. BERNARD. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Research* 36(13):3183-3192. 2002.

BRIAND J.F; LEBOULANGER C; HUMBERT J.F; BERNARD C; DUFOUR P. *Cylindrospermopsis raciborskii* (cianobactéria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or globalwarming. *J. Phycol.* 40 : 231–238. 2004.

BRITTAIN S., MOHAMED Z.A., WANG J., LEHMANN V.K., CARMICHAEL W.W., RINEHART K. Isolation and characterization of microcystins from a river Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont. *Toxicon*, 38: 1759- 1771. 2000.

BURKS, R. & SCHNEEGURT, M. Imagem *Cylindrospermopsis raciborskii*. Disponível em: <www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html> Acesso em: 02 de janeiro de 2003

CAPONE, D. G.; BURNS, J. A.; MONTROYA, J. P.; SUBRAMANIAM, A.; MAHAFFEY, C.; GUNDERSON, T.; MICHAELS, A. F.; CARPENTER, E. J. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to

the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochem. Cy.*, v. 19, p. 1-17. 2005.

CARDOSO E M, LIRA GAST, BITTENCOURT-OLIVEIRA MC, MOURA A.N.
Variação nictemeral da comunidade fitoplanctônica e características limnológicas do reservatório Saco I, Serra Talhada – Pernambuco. In: Ulysses AP, Vêras ASC, Freire FJ, Lira Júnior M A (Org.). Pernambuco: caminhos da ciência, Recife: Comunigraf; pp. 79-92. 2006.

CARLSON, R.E. A trophic state index for lakes. *Limnology and Oceanography*.
Vol. 22, p 361 – 369. 1977.

CARMICHAEL, W. W., & P. R. GORHAM. An improved method for obtaining axenic clones of planktonic blue-green algae. *J. Phycol.* 10:238-240. 1974.

CARMICHAEL, W.W. & SCHWARTZ, L.D. Preventing livestock deaths from bluegreen algae poisoning. *Farmers Bulletin 2275*, Washington, DC: US Dept. of Agriculture. 1984.

CARMICHAEL W.W. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*. 270(1):78-86. 1994.

CARMICHAEL, W. W. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: the cyanoHABs. *Human and Ecological Risk Assessment*, v. 7, n. 5. 2001.

CARMICHAEL W W, & GORHAM P.R. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. In: *The Water Environment – Algal Toxins and Health*. New York: Plenum Press. 1981.

CARMICHAEL W.W., MAHMOOD N.A, HYDE E.G. Natural toxins from cyanobacteria. In: *Marine Toxins, Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*, vol ACS Symposium Series 418 (Hall S, Strichartz G, eds). Washington, DC: American Chemical Society, 87-106. 1990.

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. *J.Appl.Bact.*, 72: 445-459. 1992.

CARNEIRO R. L; SANTOS M. E. V; PACHECO A. B. F; AZEVEDO S. M. F. O. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *J Plankton Res* 31 : (5) : 481–488. 2009.

CARPENTER, E. J. Physiology and ecology of marine planktonic *Oscillatoria* (*Trichodesmium*). *Mar. Biol. Letts*, v. 4, p. 69-85. 1983.

CARVALHO, A. A.; AGUIAR, C.; SANTOS, H.; OLIVEIRA, L., MARQUES, A. & MACIEL, R. Podcasts in Higher Education: Students and Teachers Perspectives. 9th WCCE – IFIP World Conference on Computers in Education. 2009.

- CASAI, C. *Gymnodinium catenatum* toxins from mussels (*Mytilus alloprovincialis*). Environ. Technol. 12: 33-40. 1991.
- CASTELLO, J.P. La ecología de los consumidores del estuário de la Lagoa dos Patos, Brasil. In Fish community ecology in estuaries and coastal lagoons: towards an ecosystem integration (A. Yañez-Arancibia, ed.). Universidade Autônoma Nacional do México, México, p. 386-406. 1985.
- CASTENHOLZ, R. W. Culturing methods for cyanobacteria. Methods Enzymol. 167:68-93. 1988.
- CASTRO D, VERA D, LAGOS N, GARCIA C, VASQUEZ M. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. Toxicon; 44(5): 483-489. 2004.
- CDC. *Epidemiologic Notes and Reports* Paralytic Shellfish Poisoning -- Massachusetts and Alaska, MMWR 40 (10):157-161, March 15, 1991 and MMWR 40(14):242, April 12, 1991 (Errata Notice).
URL:<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/.htm>.1 1990.

CHAVES P.F, ROCHA S.B, DUTRA ATM, YUNES J.S. Ocorrência de cianobactérias produtoras de toxinas no Rio dos Sinos (RS) entre os anos de 2005 e 2008. *Oecologia Brasiliensis*; 13(2): 319-328. 2009.

CHELLAPPA, N. T. AND M. A. M. COSTA. Dominant and co-existing species of Cyanobacteria from a eutrophied reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. *Acta Oecologica* 24(suppl. 1):S3-S10. 2003.

CHELLAPA NT, BORBA JM, ROCHA O. Phytoplankton community and physical-chemical characteristics of water in the public reservoir of Cruzeta, RN, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 2008; 68(3): 477-494. 2008.

CHOI, J.S.; CHO, J.; JIN, L.G.; JIN, H.J. & HONG, Y.K. Procedures for the Axenic Isolation of Conchocelis and Monospores from the Red Seaweed *Porphyra yezoensis*. *Journal of Applied Phycology* 14: 115-121. 2002.

CHONUDOMKUL, D., W. YONGMANITCHAL, G. THEERAGOOL, M. KAWACHI, F. KASAL, K. KAYA AND M. WATANABE. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis*

raciborskii (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. FEMS Microbiology Ecology 48(3):345-355. 2004.

CHORUS I & BARTRAM J. editors. Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E&FN Spon. 1999.

CHRISTOFFERSEN K. Effect of microcystin on growth of single species and on mixed natural populations of heterotrophic nanoflagellates. Natural Toxins, 4: 215-220. 1996.

CHU, F.S, HSU, K.H, HUANG, X, BARRETT, R, ALLISON, C. Screening of paralytic shellfish poisoning toxins in naturally occurring samples with three different direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays. J. Agric. Food Chem. 44, 4043–4047. 1996.

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

CODD G.A, LINDSAY J, YOUNG F.M, MORRISON L.F METCALF J.S. Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. In: Huisman J et al, editors, Harmful Cyanobacteria. Springer; p.1-24. 2005.

COLVARA, W., YUNES, J. S., LEÃO, J. S., BIF, M., KOLB, G. A. Increased levels of saxitoxins in cells of *Cylindrospermopsis* in Southern Brazil between 2003 and 2009. 8th International Conference On Toxic Cyanobacteria, Book of Abstracts, 106. Istanbul, Turkey. 2010

COSTA, S.M. & AZEVEDO, S.M.F.O. Implantação de um Banco de Culturas de Cianofíceas Tóxicas. Iheringia - Série Botânica, 45: 69-74. 1994.

COSTA I.A.S, AZEVEDO S.M.F.O, SENNA P.A.C, BERNARDO, R.R, COSTA S.M, CHELLAPPA N.T. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. Brazilian Journal of Biology 66(1b): 211-219. 2006.

COSTA P.R, BAUGH K.A, WRIGHT B, RALONDE R, NANCE S.L, TATARENKOVA N, ETHERIDGE S.M, LEFEBVRE K.A. Comparative determination of paralytic shellfish toxins (PSTs) using five different toxin detection methods in shellfish species collected in the Aleutian Islands, Alaska. Toxicon 54 313–320. 2009.

COUTE', A & BOUVY, M. A new species of the genus *Cylindrospermopsis*, *C. acuminato-crispa* spec. nova (Cyanophyceae, Nostocales) from Ingazeira reservoir, Northeast Brazil. Algal. Stud. 113, 57–72. 2004.

COX P.A, BANACK S.A, MURCH S.J, RASMUSSEN U, TIEN G, BIDIGARE RR, METCALF JS, MORRISON LF, CODD GA, BERGMAN B. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. Proc Natl Acad Sci U S A 102 5074–8. 2005.

CUNHA N T. Metodologias para a Concentração e Detecção de Toxinas Paralizantes em amostras Ambientais. 95 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) - Universidade Federal do Rio Grande, *Orientador*: João Sarkis Yunes. 2004.

DEGRASSE, S.L, DEGRASSE J.A, REUTER, K. Solid core column technology applied to HPLC-FD of paralytic shellfish toxins. Short communication, *Toxicon* 57, 179–182. 2011.

DE TEZANOS-PINTO, P., ALLENDE, L. & O'FARRELL, I. Influence of free-floating plants on the structure of a natural phytoplankton assemblage: an experimental approach. *Journal of Plankton Research*, v.28, p.1-10. 2006.

DIAS E, PEREIRA P, FRANCA S. Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp. LMECYA31 (cyanobacteria). *Journal of Phycology*; 38(4): 705-712. 2002.

DIAS S.N. Ecologia do fitoplâncton no reservatório Arcoverde: estudo nictemeral e sazonal. Programa de Pós- Graduação em Botânica – Dissertação de Mestrado; Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2009.

DIENER, M., K. ERLER, B. CHRISTIAN & B. LUCKAS. Application of a new witterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. *J Sep Sci* 30: 1821-1826. 2007.

DITTMANN E., ERHARD M., KAEBERNICK M., SCHELER C., NEILAN B.A., VON DOHREN H., BORNER T. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin- lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology*, 147: 3113-3119. 2001.

DOBBERFUHL, D.R. *Cylindrospermopsis raciborskii* in three central Florida lakes: Population dynamics, controls, and management implications. *Lake and Reservoir Management* 19: 341-348. 2003.

DOODS, W. K., WELCH, E. B. Establishing nutrient criteria in streams. *Journal of the North American Benthological Society*. Vol. 19, nº 1, p. 186 – 196, 2000.

DOMINGOS, P. Dominância de cianobactérias produtoras de microcistinas na lagoa de Jacarepaguá (RJ). Tese de doutorado. CCS. Programa de Pósgraduação em Biotecnologia Vegetal. 2001.

DÖRR, F.A, KOVACEVIC B, MAKSIC Z B PINTO E, VOLMER D. A. Intriguing differences in the gas-phase dissociation behavior of protonated and deprotonated

gonyautoxin epimers. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* Nov; 22. Epub 2011 Aug 16. 2011.

DUFOUR P. G SARAZIN, C QUIBLIER, S SANE, C LEBOULANGER. Cascading nutrient limitation of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in a Sahelian lake (North Senegal). *Aquatic Microbial Ecology*, v. 44, p. 219-230. 2006.

DVOŘÁK, P. & HAŠLER. Occurrence and morphological variability of *Cylindrospermopsis raciborskii* (WOLOSZ.) Seenayya Et Subba Raju (Cyanophyta, Nostocales) near Olomouc in 2006. *Fottea*, v. 7, n. 1, p. 39-42. 2007.

DYBLE, JULIANNE; PAERL, HANS W.; NEILAN, BRETT A. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA-IGS* nucleotide sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 5, p. 2567-2571. 2002.

DYBLE, J., P. A. TESTER & R. W. LITAKER. Effects of light intensity on cylindrospermopsin production in the cyanobacterial HAB species *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Afr J Mar Sci* 28: 309-312. 2006.

EC Regulation No. 1664/2006. *Off. J. Eur. Commun.* L320, 2006, 13–45. 2006.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – saxitoxin group. *EFSA J.* 1019, 1–76. 2009.

- ESTEVEES, F. A. Fundamentos de limnologia. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 602 p. 1998.
- ETHERIDGE S. M; ROESTER C. S. Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for *Alexandrium fundyense* isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy. *Dep-sea Research II* 52 : 2491-2500. 2005.
- ETHERIDGE, S., DEEDS, J., HALL, S., WHITE, K., FLEWELLING, L., ABBOTT, J., LANDSBERG, J., CONRAD, S., BODAGER, D., JACKOW, G. Detection methods and their limitations: PSP toxins in the southern puffer fish *Sphoeroides nephelus* responsible for human poisoning events in Florida 2004. *Afr. J. Mar. Sci.* 28 (2), 383–387. 2006.
- ETHERIDGE, S.M. Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives. *Toxicon* 56, 108–122. 2010.
- FABBRO, L. D. AND L. J. DUIVENVOORDEN. Profile of a bloom of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju in the Fitzroy River in tropical central Queensland. *Marine and Freshwater Research* 47:685-694. 1996.

FALCONER I.R, BARTRAM J, CHORUS I, KUIPER-GOODMAN T, UTKILEN H, BURCH M, COOD G.A. Safe levels and safe practices. In: Chorus I, Bartram J, editors. Toxic Cyanobacteria in Water. London: E&FN Spon. 1999.

FALCONER I.R. Algal toxins and humans health. In: Hrubec, J. editor, Quality and treatment of drinking water II - The Handbook of Environmental Chemistry 5 part C. Springer-Verlag; p. 53-82. 1998.

FALCONER I.R. Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: cylindrospermopsins and microcystins. Boca Raton: CRC Press. 2005.

FASTNER, J., R. HEINZE, A. R. HUMPAGE, U. MISCHKE, G. K. EAGLESHAM, & I. CHORUS. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42:313–321. 2003.

FASTNER, J., J. RUCKER, A. STUCKEN, K. PREUBEL, B. NIXDORF, I. CHORUS, A. KOHLER, AND WIEDNER. C. Occurrence of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in Northeast Germany. *Environ. Toxicol.* 22:26–32. 2007.

FERGUSON, K.M. & SAINT, C.P. Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Environmental Toxicology* 18, 120-125. 2003.

FERNANDES V.O. Ecossistemas aquáticos continentais do Espírito Santo: “berço” e florações de cianobactérias potencialmente tóxicas? IX Congresso Brasileiro de Limnologia; Juiz de Fora, Brasil. 2003.

FERNANDES, E.H.L., DYER, K.R. & MÖLLER, O.O. Spatial gradients in the flow of southern Patos Lagoon. *J. Coast. Res.* 21(4):759-769. 2004.

FERRÃO-FILHO A.S, COSTA S.M, RIBEIRO M.G.L, AZEVEDO S.M.F.O. Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environmental Toxicology*; 23: 161-168. 2008.

FERREIRA A.C.S, PAULINO W.D, SUCUPIRA P.A.P, BECKER H, GOMES R.B, FRISCHKORN H, NETO A.G.S, MENDONÇA M.J.N, SANTOS F.R.A. *Cylindrospermopsis raciborskii* no açude Castro: florações e mortandades de peixes. XII Congresso Brasileiro de Ficologia; Brasília, Brasil. 2008.

FIGUEREDO C.C, GIANI A. Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologica*; 39: 264–272. 2009.

- FIGUEIREDO, D. R.; AZEITEIRO, U. M.; ESTEVES, S. M.; GONÇALVES, F. J. M.; PEREIRA, M. J. Microcystin-producing blooms a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 151–163. 2004.
- FIGUEROA M.F, NEILAN B.A, COPP J.N, RODRIGUES J.L.M, TSAI S.M, LEE H, TREVORS J.T. Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. *Water Research* 39: 5017–5026. 2005.
- FRANÇA J.C, BARBOSA J.E.L, NETO A.G.S, PIRES A.M.A, DINIZ C.R. Toxicidade de cianobactérias em reservatório de abastecimento no trópico Semi-Árido. XII Congresso Brasileiro de Limnologia; Gramado, Brasil. 2009.
- FRANCO, J.M. & P. FERNÁNDEZ-VILLA. Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase high performance liquid chromatography with postcolumn reaction and fluorimetric detection. *Chromatographia* 35: 613-620. 1993.
- FREITAS, J.C.; OGATA, T. & VEIT, C.H. Occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish toxins in *Phallusia nigra* (Tunicata, Ascidiacea) from the Brazilian coast. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 2(1):28-38. 1996.
- FRITSCH, F. E., AND F. RICH. Contributions to our knowledge of the freshwater algae of Africa. 7. Freshwater algae (exclusive to Diatoms) from Griqualand West. *Trans. R. Soc. S. Afr.* 18:1–92. 1929.

- GEDARIA A. I; LUCKAS B; REINHARDT K; AZANZA R. V. Growth response and toxin concentration of cultured *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* to varying salinity and temperature conditions. *Toxicon* 50 : 518-529. 2007.
- GEMELGO, M.C.P., SANT'ANNA, C.L., TUCCI, A. & BARBOSA, H.R. Population dynamics of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju, a cyanobacteria toxic species, in water supply reservoirs in São Paulo, Brazil. *Hoehnea* 35:297-307. 2008.
- GORHAM, P.R, MCLACHLAV, J.R, HAMMER, V.T, KIM, W.K. Isolation and Culture of Toxic Strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréd. *Verh. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, 15 : 796 – 804. 1964.
- GOTO, H.; IGARASHI, T.; SEKIGUCHI, R.; TANNO, K.; SATAKE, M.; OSHIMA, Y.; YASUMOTO, T. A. Japanese project for production and distribution of shellfish toxins as calibrants for HPLC analysis. In *Harmful Algae*; Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T., Eds.; Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO: Xunta de Galicia, Spain; pp. 216–219. 1998.
- GOUVÊA SP, VIEIRA A.A.H, LOMBARDI A.T. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. *Chemosphere*; 60: 1332–1339. 2005.

GRELLMANN C. Aspectos da morfologia e da ecologia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszinska) Seenayya et Subba Raju e da produção de cianotoxinas na lagoa do Peri, Florianópolis, SC, Brasil. Programam de Pós-Graduação em Biologia Vegetal – Tese e mestrado; Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

HAIDER S., NAITHANI V., VISWANATHAN P.N., KAKKAR P. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. (Review). *Chemosphere*, 52: 1-21. 2003.

HALL S; STRICHARTZ G; MOCZYDLOWSKI E; RAVIDRAN A; REICHARDT P.B. The saxitoxins: sources, chemistry and pharmacology. *In*: Hall S; Stricharz G. (Eds.). *Marine toxins: origin, structure and molecular pharmacology. Washington: American Chemical Society Symposium Series*, 418 : 29 – 65. 1990.

HAYES, J. M. Geochemical evidence bearing on the origin of aerobiosis, a speculative interpretation. *In* J. William Schopf (ed.) *The Earth's earliest biosphere: its origin and evolution*, Princeton University Press, pp 291-301, 1983.

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

HAWKINS P.R, CHANDRASENA N.R, JONES G.J, HUMPAGE A.R, FALCONER

I.R. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon*, 35, 341-346. 1997.

HEANEY, S. I., AND JAWORSKI, G. H. M. A simple separation technique for

purifying micro-algae. *Br. Phycol. J.* 12:171-174. 1977.

HITZFELD B., HÖGER S., DIETRICH D. Cyanobacterial Toxins: Removal during

drinking water treatment, and risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 108: 113-122. 2000.

HODGKIN, A.L. & HUXLEY, A.F. A quantitative description of membrane current and

application to conduction and excitation in nerve. *Journal Physiology*, 117: 500-544.

Apud: Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26: 13-25. 1952.

HONG, Y., A. STEINMAN, B. BIDDANDA, R. REDISKE & G. FAHNENSTIEL.

Occurrence of the toxin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Mona and Muskegon Lakes, Michigan. *Journal of Great Lakes*

Research 32:645-652. 2006.

HSU C.P, MARCHAND A, SHIMIZU Y, SIMS G.G. Paralytical Shellfish toxins in the sea scallop. *Placopecten magellanicus* in the Bay of Fundy. Journal Fish Res Board Can. 36 32:36. 1979.

HUSZAR V.I.M, SILVA I.H.S, MARINHO M, DOMINGOS P, SANT'ANA C.L. Cyanoprocaryotes assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hidrobiologia*; 424: 67-77. 2000.

CHONUDDOMKUL, D., YONGMANITCHAI, W. & THEERAGOOL, G. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan.- FEMS Microbiol Ecol 48 (3): 345-355. 2004.

INDRASENA, W.M. & GILL, T.A. Storage stability of paralytic shellfish poisoning toxins. Food Chemistry, 71: 71-77. 2000.

INDRASENA, W.M., GILL, T.A. Fluorometric detection of paralytic shellfish poisoning toxins. Anal. Biochem. 264 (2), 230–236. 1998.

JARDIM B.F.M, FERRAZ H.D.A, CHEDID N.M.P, JARDIM F.A. Cyanophyceae na água do Rio das Velhas, MG. XII Congresso Brasileiro de Limnologia; Gramado, Brasil. 2009.

JATI, S, RODRIGUES L.C, TRAIN S, BOVO-SCOMPARIN V.M. Cyanobacteria planctônicas de cinco ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná (MS) Brasil. Simpósio latino-americano sobre algas nocivas e XI Congresso Brasileiro de Ficologia; Itajaí, Brasil. 2006.

JEEJI-BAI, N., HEGEWALD, E. & SOEDER, C.J. Taxonomic studies on the genus *Anabaenopsis* (Wolosz.) Miller. In *Taxonomy of algae* (T.V. Desikachary & V.N. Rajarao, eds.) University of Madras, p.115-145. 1980.

JELLETT, J.F., ROBERTS, R.L., LAYCOCK, M.V., QUILLIAM, M.A., BARRETT, R.E. Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST Alert(TM), a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC(R) mouse bioassay. *Toxicon* 40, 1407–1425. 2002.

JOHNSON, R.C.; ZHOU, Y.; STATLER, K.; THOMAS, J.; COX, F.; HALL, S.; BARR, J.R. Quantification of Saxitoxin and Neosaxitoxin in Human Urine Utilizing Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol*, 33, 8–14. 2009.

JONES, W.J.; SAUTER, S. Distribution and abundance of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Indiana lakes and reservoir. Indiana University. Bloomington, IN, 54 p. 2005.

- KAEBERNICK M., NEILAN B.A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*, 35: 1-9. 2001.
- KAEBERNICK M., NEILAN B.A., BORNER T., DITTMAN E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3387-3392. 2000.
- KELLMANN, R., T. K. MIHALI, Y. J. JEON, R. PICKFORD, F. POMATI & B. A. NEILAN. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a putative saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 74: 4044 - 4053. 2008.
- KIKUCHI, T.; SATO, M.; KAGA, M.; SATO, K.; SATO, S.; OGATA, T. & KODAMA, M. Secondary contamination of scallops by ingestion of PSP toxins in the feces of adjacent highly toxic scallops. In: Yasumoto, T. Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.) *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 413-415. 1996.
- KISS, T., VEHOVSZKY, A., HIRIPI, L., KOVÁCS, A. & VÖRÖS, L. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 131(2): 167–176. 2002.

KJERFVE, B. Comparative oceanography of coastal Lagoons. In Estuarine variability (D.A. Wolf, ed.). Academic Press, Orlando, p. 63-81. 1986.

KOMÁREK, J., KOMÁRKOVÁ, J. 2003. Phenotype diversity of the cyanoprokaryotic genus *Cylindrospermopsis* (Nostocales); review Czech Phycol. 3, 1–30. 2002.

KOMÁREK, J. & HAUER, T. CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. 20.04.2007. Available online at <<http://www.cyanodb.cz>>. 2004.

KOMÁRKOVÁ, J. “The tropical genus *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophytes, Cyanobacteria)”. In: Congresso Latino Americano, pp. 327-340, São Paulo. 1998.

KUGRENS, P.; CLAY, B.L.; AGUIAR, R. Ultrastructure of *Lobocharacium coloradoense*, gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Characiosiphonaceae), an unusual coenocyte from Colorado. J. Phycol. 36: p.421-432. 2000.

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

LAGOS, N. Principales toxinas de origen fitoplanctónico: identificación y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) In: Sar, E.

A.; B, Reguera & ME, Ferrario. Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. UNESCO. p 55-76. 2002.

LAMPARELLI, M. C. Grau de Trofia em Corpos D'Água do Estado de São Paulo: Avaliação dos Métodos de Monitoramento. 238 p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LAWRENCE, J.F., MENARD, C. Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation. J Assoc Off Anal Chem 74, 1006-1012. 1991a.

LAWRENCE, J.F., MENARD, C., CHARBONNEAU, C.F., HALL, S. A study of ten toxins associated with paralytic shellfish poison using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. J Assoc Off Anal Chem 74, 404- 409. 1991b.

Lawrence, J.F., Wong, B., Menard, C., 1996. Determination of decarbamoyl saxitoxin and its analogues in shellfish by prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. J AOAC Int 79, 1111-1115.

LAWRENCE, J.F. & B. NIEDZWIADK. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. J. AOAC Int. 84: 1099-1108. 2001.

LAWRENCE, J.F., NIEDZWIADK, B., MENARD, C. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study. *J. AOAC Int.* 88, 1714–1732. 2005.

LAWRENCE, J. F., MÉNERD, C. E CLEROUX, C. Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish. *Journal of Association Official Analytical Chemists International*, 78(2): 514-520. 1995.

LAWTON, L.A. & COOD, G.A. Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins and their Significance in UK and European Waters. *J.Inst.Wat.Environ.Management.* 5:460-465. 1991.

LAYCOCK, M.V.; THIBAUT, P.; AYER, S.W.; WALTER, J.A. Isolation and purification procedures for the preparation of paralytic shellfish poisoning toxin standards. *Nat. Toxins*, 2, 175–183. 1994.

LEHANE, L. Paralytic Shellfish Poisoning: A review. National Office of Animal and Plant Health, Australia, Canberra. 2000.

LI R.H, CARMICHAEL W.W, BRITAIN S, EAGLESHAM G.K, SHAW G.R, LIU Y.D, WATANABE M.M. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and

deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*; 37: 1121-1126. 2001.

LLEWELLYN L.E, DODD M.J, ROBERTSON A, ERICSON G, KONING C, AND NEGRI A.P. Post-mortem analysis of samples from a human victim of a fatal poisoning caused by the xanthid crab, *Zosimus aeneus*. *Toxicon*. 40: 1463–1469. 2002.

LOCKE, S.J., THIBAUT, P. Improvement in the detection limits for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish tissues using capillary electrophoresis electrospray mass-spectrometry and discontinuous buffer systems. *Anal. Chem.* 66, 3436–3446. 1994.

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

LUGOMELA, C.; LYIMO, T. J.; BRYCESON, I.; SEMESI, A. K. *Trichodesmium* in coastal waters of Tanzania: diversity, seasonality, nitrogen and carbon fixation. *Hydrobiologia*, v. 477, p. 1-13. 2002.

[MAGALHÃES](#) ; AGUIAR, R. ; MAGALHAES, M. A. Isolamento de cianobactérias Potencialmente Tóxicas em Pontos de Captação de Água para Consumo Humano no Município de Viçosa, MG. Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 30, Punta del Este 26-30 nov. 2006.

MANN, P. S. *Introductory Statistics* 5th ed. John Wiley & Sons. Michigan. 736 pp. 2003.

MARTIN-LUNA, B., E. SEVILLA, J. A. HERNANDEZ, M. T. BES, M. F. FILLAT & M. L. PELEATO. Fur from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Phytochemistry* 67: 876-881. 2006.

MATTHIENSEN A, BEATTIE KA, YUNES JS, KAYA K, CODD G.A. [D-Leu1] Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry* 55:383-7. 2000.

MATTHIENSEN, A., BARBOSA, T.C.P. Fitoplâncton potencialmente nocivo em corpos d'água costeiros utilizados para o consumo humano: dados preliminares da Lagoa do Peri, Florianópolis, SC, Brasil. In: IX Congresso Brasileiro de Limnologia, Juiz de Fora, MG. 2003.

MAYER, J., M. T. DOKULIL, M. SALBRECHTER, M. BERGER, T. POSCH, G. PFISTER, A. K. T. KIRSCHNER, B. VELIMIROV, A. STEITZ AND T. ULBRICHT. Seasonal successions and trophic relations between phytoplankton, zooplankton, ciliate and bacteria in a hypertrophic shallow lake in Vienna, Austria. *Hydrobiologia* 342-343(0):165-174. 1997.

MCGREGOR, G. B. AND L. D. FABBRO. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii*(Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. *Lakes and Reservoirs: Research and Management* 5(3):195-205. 2000.

MEDEIROS R.S. Efeito da temperatura na composição das variantes de toxinas paralíticas marinhas e no crescimento em uma cepa brasileira de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). Trabalho de Conclusão de curso apresentado à Universidade Federal do Rio Grande como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Oceanólogo. 2011.

MEFFERT, V. M.E., & T.P.CHANG. The isolation of planktonic blue green algae (Oscillatoria-species). *Arch. Hydrobiol.* 82:231-239. 1978.

MENDES J.S, BARBOSA J.E.L, WATANABLE T. Dinâmica da composição e biomassa fitoplanctônica durante a fase de enchimento da barragem de Acauã, Itatuba – PB. IX Congresso Brasileiro de Limnologia; Juiz de Fora, Brasil. 2003.

METTING, F.B. JR. Algae and Cyanobacteria, cap.21 *in* Methods of Soil Analysis, Part 2 –Microbiological and Biochemical Properties. SSSA Book Series:5 ed. Science Society of America In. 1994.

MICHAUD, S.; LEVASSEUR, M.; DOUCETTE, G. & CANTIN, G. Particle size fractionation of paralytic shellfish toxins (PSTs): seasonal distribution and bacterial production in the St. Lawrence Estuary, Canada. *Toxicon* 40: 1451-1462. 2002.

MIHALI1, T. K, KELLMANN R, & NEILAN B. A. Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon sp.* NH-5. *BMC Biochemistry*, 10:8 doi:10.1186/1471-2091-10-8. 2009.

MOHAMED, Z. A. First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. *FEMS Microbiol Ecol* 59: 749-761. 2007.

- MOISANDER, P.H., I.E. MCCLINTON, AND H.W. AND PAERL. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microbial Ecology* 43: 432-442. 2002.
- MOLICA R.J.R, ONODERA H, GARCÍA C, RIVAS M, ANDRINOLO D, NASCIMENTO S.M, MEGURO H, OSHIMA Y, AZEVEDO S.M.F.O LAGOS N. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia* 41: 606-611. 2002.
- MOLICA R.J.R, OLIVEIRA E.J.A, CARVALHO P.V.V.C, COSTA A.N.S.F, CUNHA M.C.C, MELO G.L, AZEVEDO S.M.F.O. Occurrence of saxitoxins and anatoxina(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 2005; 4: 743-753. 2005.
- MÖLLER, O.O., LORENZZENTI, J.A., STECH, J.L. & MATA, M.M. The Patos Lagoon summertime circulation and dynamics. *Cont. Shelf Res.* 16(3):335-351. 1996.
- MÖLLER, O.O., CASTING, P., SALOMON, J.C. & LAZURE, P. The influence of local and non local forcing effects on the subtidal circulation of Patos Lagoon. *Estuaries.* 24(2):297-311. 2001.

NAGASHIMA, Y. J. MARUYAMA, T. NOGUCHI, K. HASHIMOTO. Nippon Suisan Gakkaishi 53 819. 1987.

NAMIKOSHI M, MURAKAMI T, WATANABE M.F, ODA T, YAMADA J, TSUJIMURA S, NAGAI H, OISHI S. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. Toxicon; 533-538. 2003.

NAMIKOSHI, M., MURAKAMI, T., FUJIWARA, T., NAGAI, H., NIKI, T., HARIGAYA, E., WATANABE, M. F., ODA, T., YAMADA, J. & TSUJIMURA, S. Biosynthesis and transformation of anatoxin-a in the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja and structure of three new homologues. Chem. Res. Toxicol. 17:1692–6. 2004.

Negri A.P, Jones G.J, Hindmarsh M. 1995. Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. Toxicon 33(10): 1321-1329.

NEILAN, B. A. SAKER, M. L. FASTNER, J.A. & BURNS, B . P. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Molecular Ecology* 12, p. 133-140. 2003.

NISHIMURA, P. Y., MOSCHINI-CARLOS, V., POMPÊO, M. L. M., GIANESELLA, S. M. F. & SALDANHA-CORRÊA, F. M. P. Phytoplankton primary productivity in Rio Grande and Taquacetuba branches (Billings Reservoir, Sao Paulo, Brazil). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* , v.30, n.1, p. 50-52. 2008.

NORRIS R.L, EAGLESHAM G.K, PIERENS G, SHAW G.R, SMITH M.J, CHISWELL R.K, SEAWRIGHT A.A, MOORE M.R. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*; 14: p. 163-165. 1999.

NSSP. Approved national shellfish sanitation program laboratory tests: microbiological and biotoxin analytical methods. Guide for the Control of Mollusc Shellfish <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/ProductSpecificInformation/Seafood/FederalStatePrograms/NationalShellfishSanitationProgram/ucm059224.htm>> (Sec. IV, Chapter II.10). 2007.

ODEBRECHT, C.; AZEVEDO, S.M.F.O.; GARCIA, V.M.T.; HUSZAR, V.L.M.; MAGALHÃES, V.F.; MANEZES, M.; PROENÇA, L.A.O.; RÖRIG, L.R.;

TENENBAUM, D.R.; VILLAC, M.C. & YUNES, J.S. Floraciones de microalgas tóxicas en Brasil: estado del arte y proyectos en curso. In: Sar, E.A.; Ferrario, M.E.; Reguera (Eds.). Floraciones Algales en el Cono Sur Americano. B. Instituto Español de Oceanografía, p. 219-233. 2002.

OHTANI I, MOORE R.E, RUNNEGAR M.T.C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. Journal of American Chemical Society; 114: p. 7941-7942. 1992.

OLIVEIRA, J. M. B. Remoção de *Cylindrospermopsis raciborskii* por meio de sedimentação e flotação: avaliação em escala de bancada. 141 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília. 2005.

OLIVEIRA H.S.B, & MOURA A.N. Dinâmica e estrutura de populações de cianobactérias em função das variáveis abióticas em um reservatório eutrófico do agreste do Estado de Pernambuco. XII Congresso Brasileiro de Limnologia; Gramado, Brasil. 2009.

OSHIMA, Y.; YASUMOTO, T.; KODAMA, M.; OGATA, T.; FUKUYO, Y.; MATUURA, F. Features of paralytic shellfish poison occurring in Tohoku district. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 48, p. 525–530. 1982.

- OSHIMA Y. Post column Derivatization Liquid Chromatographic Method for Paralytic Shellfish Toxins. *J AOAC Inter* 78: p. 528-532. 1995.
- OSHIMA, Y. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. In *Harmful Marine Algal Blooms*; Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C., Eds.; Lavoisier: Paris, France, p. 475–480. 1995 b.
- PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 93 : 107-563. 1997.
- PALMER, C.M. Report on the algae in relation to water quality of Paranoa Lake, Brasilia: Relatório de consultoria. Pan American Health Organization/WHO, Brasília. 1969.
- PANOSSO, R, IVANEIDE A. S. COSTA I, ROCHA N. S, ATTAYDE J.L, CUNHA S.R.S & GOMES F.C.F. Cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios do estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela tilápia do nilo (*oreochromis niloticus*), *Oecol. Bras.*, 11 (3): 433-449. 2007.
- PERRY. J. J., AND STALEY, J.T. *Microbiology. Dynamics & Diversity.* Saunders College Publishing. United States of America. 127p. 1997.

PERSICH, G. R. Estudos sobre a fisiologia, genética e toxicidade do dinoflagelado *Alexandrium tamarense*(Lebour) Balech do sul do Brasil, Rio Grande-RS, Universidade do Rio Grande, tese. 2001.

PLEASANCE, S., AYER, S.W., LAYCOCK, M.V., THIBAUT, P. Ionspray mass spectrometry of marine toxins, III. Analysis of paralytic shellfish poisoning toxins by flow-injection analysis, liquid chromatography/mass spectrometry and capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6, 14–24. 1992.

POMATI, F., M. C. MOFFITT, R. CAVALIERE & B. A. NEILAN. Evidence for differences in the metabolism of saxitoxin and C1+2 toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj* 1674: 60-67. 2004.

POMATI F, NEILAN BA, SUZUKI T, MANAROLLA G, ROSSETTI C. Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). *Journal of Phycology*; 39: 535-542. 2003.

PONTES, M.C.F. Contribuição de nitrogênio biologicamente fixado por cianobactérias de vida livre em cultura de arroz irrigado. Tese de Doutorado da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP. 161p. 1988.

PROENÇA, L.A.; LAGOS, N.; RÖRIG, L.R.; SILVA, M. & S. GUIMARAES.

Occurrence of paralytic shellfish poisoning - PSP in Southern Brazilian Waters. *Ciência e Cultura*. 1999.

PROENÇA L.A.; SCHMITT, F.; COSTA, T. & RÖRIG L.R. Just a diarrhea? Evidences of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina - Brazil. *Ciência e Cultura*. 50:458-462. 1998.

PROENÇA, L.A.O. PREFÁCIL. IN: SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUJARO, L.F.; CARVALHO, M.C.; SOUZA, R.C.R. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônica de águas continentais brasileiras. Rio de Janeiro: Interciência. 2006.

QUAYLE, D. B. Paralytic shellfish poisoning in British Columbia. Bull. 168, Fish. Res. Bd. Canada, 68pp. 1969.

QUILLIAM, M.A. 2003. The Role of Chromatography in the Hunt for Red Tide Toxins. *J. Chromatogr. A*, 1000, 527–548.

RAMBERG, L. Phytoplankton succession in the Sanyati Basin, Lake Kariba. *Hydrobiologia* 153(3):193-202. 1987.

RASMUSSEN, U. & SVENNING, M.M. Fingerprinting of Cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1). P. 265-272. 1998.

REBOUÇAS, A. DA C. O paradoxo brasileiro. *Cadernos Diplô: Le Monde Diplomatique*, São Paulo, n. 3, p.38-41, 2003.

RIBEIRO, W. C.. *Geografia Política da Água*. 1ª São Paulo: Annablume, 162 p. 2008.

RIBEIRO L.B, MELO S, WERNER V.R, ALMEIDA F.F. Cianobactérias de ambientes naturais e artificiais de Manaus (Amazonas-Brasil). XII Congresso Brasileiro de Limnologia; Gramado, Brasil. 2009.

RIPPKA, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.B.; Herdman, M. E Stanier, R.Y. Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61. 1979.

RIPPKA, R. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167:3-27. 1988.

- RODRIGUE, D.C.; ETZEL, R.A.; HALL, S.; DE PORRAS, E.; VELASQUEZ, O.H.; TAUXE, R.V.; KILBOURNE, E.M.; BLAKE, P.A. Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42, 267–271. 1990.
- RODRÍGUEZ, P., ALFONSA, A., BOTANA, A.M., VIEYTES, M.R., BOTANA, L.M., Comparative analysis of pre- and post-column oxidation methods for detection of paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 56, 448–457. 2010.
- ROHRLACK T., DITTMANN E., HENNING M., BÖNER T., KOHL J.G. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 737-9. 1999.
- RYAN, E. F, HAMILTON D.P, BARNES G. Recent occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Waikato lakes of New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, V37, p. 829-836. 2003.
- SAKER, M. L., B. A. NEILAN AND D. J. GRIFFITHS. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. *Journal of Phycology* 35(3):599-606. 1999.
- SAKER, M. L. AND D. J. GRIFFITHS. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis*

raciborskii(Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycologia* 39(4):349-354. 2000.

SAKER, M. L. AND B. A. NEILAN. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 67(4):1839-1845. 2001.

SAKO, Y., T. YOSHIDA, A. UCHIDA, O. ARAKAWA, T. NOGUCHI & Y. ISHIDA, Purification and characterization of a sulfotransferase specific to N-21 of saxitoxin and gonyautoxin 2+3 from the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *J Phycol* 37: 1044-1051. 2001.

SÁNCHEZ, A.; GALLARDO, O. & SILVA, S. Red tide outbreaks and management in Venezuela. Harmful Algae Management and Mitigation Conference, Subic Bay, Philippines, 10-14may1999. *Apud*: Fitzgerald, D.J.; Cunliffe, D.A. & Burch, M.D. *Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South of Australia*. *Environmental Toxicology*, 14:203-209. 1999.

SANT'ANNA, C.L., XAVIER, M.B. & SORMUS, L. Estudo qualitativo do fitoplâncton da represa de Serraria, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 48:83-102. 1988.

- SANT'ANNA, C. L. & AZEVEDO, M. T. P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71; 359-385. 2000.
- SCHÄFER, A. Fundamentos de Ecologia e Biogeografia das Águas Continentais. Porto Alegre, EDUNI-SUL. 532 p. 1985.
- SEENAYYA, G., AND N. SUBBA RAJU. On the ecology and systematic position of the alga known as *Anabaenopsis raciborskii* (Wolosz.) Elenk. and a critical evaluation of the forms described under the genus *Anabaenopsis*, p. 52–57. Taxonomy and biology of blue-green algae. University of Madras, Madras, India. 1972.
- SHALEV-MALUL, G., J. LIEMAN-HURWITZ, Y. VINER-MOZZINI, A. SUKENIK, A. GAATHON, M. LEBENDIKER & A. KAPLAN. An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*. *Environ Microbiol* 10: 988-999. 2008.
- SHEN, X., P. K. S. LAM, G. R. SHAW & W. WICKRAMASINGHE, 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 40: 1499-1501.
- SHI L., CARMICHAEL W.W., MILLER I. Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Archives of Microbiology*, 163: 7-15. 1996.

SHIMIZU, Y. Microalgal metabolites: a new perspective. *Annu Rev Microbiol* 50: 431-465. 1996.

SHIRAI, M., K. MATUMARU, A. ONOTAKE, Y. TAKAMURA, T. AIDA, AND M. NAKONO. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2569-2571. 1989.

SILVA, C. A., S. TRAIN AND L. C. RODRIGUES. Structure and dynamics of the phytoplankton community downstream and upstream Corumba reservoir, Caldas Novas, state of Goiás, Brazil. *Acta Scientiarum Universidade Estadual de Maringa* 23(2):283-290. 2001.

SILVA L.M. Ocorrência de cianobactéria no estuário e costas adjacentes à Lagoa dos Patos, Rio Grande RS: avaliação preliminar dos riscos à balneabilidade. Dissertação de mestrado. FURG- Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 144pp. 2005.

SILVESTRE, A.N., CARVALHO, P.V.V.C., MOURA, E.B.A. E OLIVEIRA, M.S. “Florações tóxicas de cianobactérias do gênero *Cylindrospermopsis* em mananciais de abastecimento público no estado de Pernambuco.” *Anais do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, Brasil, 3794-3802. 1999.

SIVONEN K, CARMICHAEL W.W, NAMIKOSHI M, RINEHART K.L, DAHLEM A.M, NIEMELA S.I. Isolation of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp strain 152. *Applied Environmental Microbiology* 56: 2650-2657. 1990.

SIVONEN, K. & JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: *Toxic Cyanobacteria in Water*, pp. 41–111. Edited by I. Chorus & J. Bartram. London: E. & F. N. Spon. 1999.

SOMMER, H., MEYER, K.F. Paralytic Shellfish Poisoning. *Archives of Pathology* 24, 560-598. 1937.

SOTERO-SANTOS R.B, CARVALHO E.G, DELLAMANO-OLIVEIRA MJ, ROCHA O. Occurrence and toxicity of an *Anabaena* bloom in a tropical reservoir (Southeast Brazil) *Harmful Algae*; 7: 590–598. 2008.

SOTO L K, MURILLO A. A, KROCK B, STUCKEN B, FUENTES V. J. J, TREFAULT N, CEMBELLA A, VÁSQUEZ M. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon* 56 1350–1361. 2010.

SULLIVAN, J., M.M. WEKELL & L. KENTALA. Application of HPLC for the Determination of PSP toxins in shellfish. *Journal. Food. Sci.* 50: 26-29. 1985.

SULLIVAN, J.J., WEKELL, M.M. The application of high performance liquid chromatography in a paralytic shellfish poisoning monitoring program. In: Kramer, D.E., Liston, J. (Eds.), *Seafood Quality Determination*, Anchorage, Alaska, USA, 10–14 November, pp. 357–371. 1986.

SULLIVAN, J., & M. WEKELL. Detection of paralytic shellfish toxins, pp. 87-106. In T. Anthony (ed.). *Handbook of Natural Toxins*, New York. 1988.

SUZUKI, T., EZURE, T., YAMAGUCHI, T., DOMEN, H., ISHIDA, M. & SCHMIDT, W. Stimulatory effect of procaine on the growth of several microalgae and cyanobacteria. *Journal. Pharm. Pharmacol.* 52:243–51. 2000.

THIBAUT, P.; PLEASANCE, S.; LAYCOCK, M.V. Analysis of Paralytic Shellfish Poisons by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr.* 542, 483–501. 1991.

THIEL, T., J. BRAMBLE, AND S. ROGERS. Optimum conditions for growth of cyanobacteria on solid media. *FEMS Microbiol. Lett.* 61:27-32. 1989.

- THOMAS, K.; BLAY, P.; BURTON, I.W.; CEMBELLA, A.D.; CRAFT, C.; CRAIN, S.; HARDSTAFF, W.R.; LAYCOCK, M.V.; LEBLANC, D.; LEBLANC, P. Certified reference materials for marine algal toxins. In *Harmful Algae*. 2004.
- TOLEDO JR., A. P.; TALARICO, M.; CHINEZ, S. J.; AGUDO, E.G. A aplicação de modelos simplificados para a avaliação de processo de eutrofização em lagos e reservatórios tropicais. 1983, Camboriú; Anais do 12º Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental. Camboriú, 34p. 1983.
- TONK, L., D. B. VAN DE WAAL, P. SLOT, J. HUISMAN, H. C. P. MATTHIJS & P. M. VISSER. Amino acid availability determines the ratio of microcystin variants in the cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *FEMS Microbiol Ecol* 65: 383-390. 2008.
- TONK, L., P. M. VISSER, G. CHRISTIANSEN, E. DITTMANN, E. SNELDER, C. WIEDNER, L. R. MUR & J. HUISMAN. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl Environ Microbiol* 71: 5177-5181. 2005.
- TORGAN, L. & GARCÍA, M. Novas ocorrências (Cyanophytas e Chlorophyta) para a ficoflora planctônica do Rio Grande do Sul, Brasil. *Hoehnia*, 16: 57-64. 1989.
- TRAVASSOS JÚNIOR, A.; MOURA, A.N.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; LIRA, G.A.T.; MENDONÇA, D.F.P. Comunidade fitoplanctônica no reservatório de

Jucazinho região agreste do Estado de Pernambuco. Cadernos FAFIRE, Recife, v. 4, n. 11, p. 13-15. 2005.

TUNDISI, J.G. & TUNDISI, T.M. Eutrofização de reservatórios e rios: perspectivas, estudos de casos, comparação de análises. Ficologia. Sociedade Brasileira de Ficologia. 35: 1-33. 1992.

TUCCI A, SANT'ANNA C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. Revista Brasileira de Botânica 26 (1): 97-112. 2003.

USLEBER, E., DONALD, M., STRAKA, M., MARTLBAUER, E. Comparison of enzyme immunoassay and mouse bioassay for determining paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. Food Addit. Contam. 14, 193–198. 1997.

UTKILEN H., G. JOLME N. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology, 61: 797-800. 1995.

VAARA, T., M. VAARA, AND S. NIEMELA. Two improved methods for obtaining axenic cultures of cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 38:1011-1014. 1979.

- VALE, P. & M.A.M. SAMPAYO. Determination of paralytic shellfish toxins in Portuguese shellfish by automated pre-column oxidation. *Toxicon* 39:561-571. 2001.
- VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, G.; RODRIGUEZ, M.H.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F. & IBARRAB, J.E. Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis*. *Journal of Microbiological Methods* 57: 115-121. 2004.
- VIANA, T.H. Estudo do conteúdo de calor e suas influências sobre variáveis limnológicas em reservatórios de abastecimento de água. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Área de Concentração Saneamento) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 134p. 2009.
- VIDAL L, & KRUK C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* (2008) 3(2): 142-151. 2008.
- VIEIRA, S. AZEVEDO J.M., AZEVEDO, S.M.F., HONDA, R.Y., CORREA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon* 45, 901– 909. 2005.

- VON SPERLING E, FERREIRA A.C.S, GOMES L.N.L. Comparative eutrophication development in two Brazilian water supply reservoirs with respect to nutrient concentrations and bacteria growth. *Desalination*. 226: 169–174. 2008.
- WATANABE, M.F.; WATANABE, M.; KATO, T.; HARADA, K-I & SUZUKI, M. Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa* (blue-green algae, cyanobacteria). *Botanical Magazine, Tokyo*, 104:49-57. 1991.
- WATANABE R, SUZUKI T, & OSHIMA Y. Preparation of Calibration Standards of N1-H Paralytic Shellfish Toxin Analogues by Large-Scale Culture of Cyanobacterium *Anabaena circinalis* (TA04). *Marine Drugs* 9, 466-477. 2011.
- WIERINGA, K. T. A new method for obtaining bacteria-free cultures of blue-green algae. *Antonie van Leeuwenhoek*34:54-56. 1968.
- WIESE M; D'AGOSTINO P. M; MIHALI T. K; MOFFITT C. M; NEILAN B. A; Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Marine Drugs* 8 : 2185-2211. 2011.
- WOLOSZYNSKA, J. Das phytoplankton einiger Javanian seen mit Berücksichtigung des sawa-planktons. *Bull. Int. Acad. Sci. Cracoviae, Ser. B.*, 6: 649-709. 1912.

- WOOD, S.A. & STIRLING, D.J. First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 37:821–828. 2003.
- YOO R.S., CARMICHAEL W.W., HOEHN R.C., HRUDEY S.E. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: a resource guide. AWWA Research Foundation and American Water Works Association. 1995.
- YUNES J.S, CUNHA N.T, BARROS L.P, PROENÇA L.A.O, MONSERRAT J.M. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazilian Freshwaters. *Comments on Toxicology* 9: 103-115. 2003.
- YUNES J.S. Programa AGUAAN- Agilização do Gerenciamento e Utilização de Águas com Algas Nocivas, *Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária Ambiental*, Porto Alegre- RS, Brasil. pp 273. 2000.
- YUNES, J.S., ROCHA, S. DE LA, GIROLDO, D., MELCHER, S.S., SANT'ANNA, C.L., SILVEIRAS, B., COMIN, R., BICHO, M.S. & VIEIRA, A.A.H. Production of saxitoxins and extracellular carbohydrates by a subtropical cyanobacteria *Raphidiopsis brookii*: first report of saxitoxin and gonyautoxin production. *Anais do Simpósio Iupac*, p. 122. 2007.

YUNES, J.S., ROCHA, S. DE LA, GIROLDO, D., MELCHER, S.S., SANT'ANNA, C.L., SILVEIRAS, B., COMIN, R., BICHO, M.S. & VIEIRA, A.A.H. Release of carbohydrates and proteins by a subtropical strain of *Raphidiopsis brookii* (cyanobacteria) able to produce saxitoxin At three nitrate concentrations. J. Phycol. 45, 585–591. 2009.

ZAGATTO P. A. Evaluation ecotoxicologique du reservoir Guarapiranga, SP, Brasil, en relation avec le problème des algues toxiques et des algicides. Tese de Doutorado, Université de Metz, France, 86p. 1995.

ZEHR, J. P.; WATERBURY, J. B.; TURNER, P. J.; MONTOYA, J. P.; OMOREGIE, E.; STEWARD, G. F.; HANSEN, A.; KARL, D. M. Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. Nature, v. 412, p. 635-638. 2001.