

RAQUEL IEDA LOPES

**Estudos taxonômicos *in vitro* e prospecção de
toxinas de cepas de cianobactérias isoladas de
reservatórios do Estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E
MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de
Plantas Avasculares e Fungos

SÃO PAULO

2011

RAQUEL IEDA LOPES

**Estudos taxonômicos *in vitro* e prospecção de
toxinas de cepas de cianobactérias isoladas de
reservatórios do Estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E
MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de
Plantas Avasculares e Fungos

ORIENTADORA: DRA. ANDRÉA TUCCI

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Lopes, Raquel Ieda

L864e Estudos taxonômicos *in vitro* e prospecção de toxinas de cianobactérias isoladas de reservatórios do estado de São Paulo / Raquel Ieda Lopes -- São Paulo, 2011.
75 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2011
Bibliografia.

1. Algas. 2. Cianotoxinas. 3. *Phormidium*. I. Título

CDU: 582.26

*“Procurai com zelo os melhores dons;
e eu vos mostrarei um caminho ainda mais excelente”*

1 Aos Coríntios 12:31

*Dedico esta dissertação
a meus pais, Marly e Damião, e a
Tchusca, Marcelina, com muito amor.*

*Por tudo que me ensinaram,
que podemos fazer melhor sempre,
e pelo imensurável apoio e carinho.*

Agradecimentos

Agradeço ao Núcleo de Pesquisa em Ficologia (para mim, eterna Seção de Ficologia), a Pós-Graduação e ao Instituto de Botânica, onde pude desenvolver este trabalho.

A Dra. Andréa Tucci, a minha Orientadora desde a Iniciação Científica, por acreditar em mim, por sempre dizer que tudo ia dar certo, nos muitos momentos que me desesperei. Muito obrigada! Por tudo que me ensinou não só sobre fitoplâncton, microalgas e cianobactérias; e pela paixão que também herdei por estes organismos tão belos! Pela presteza e primor ao corrigir essa dissertação; pelas inúmeras vezes que partilhou de seu conhecimento e sabedoria; por tantos momentos que me aconselhou; mas principalmente por sua amizade, que me permite, com liberdade, me declarar como filha - científica.

A Dra. Luciana Retz de Carvalho por me aceitar como sua aluna, pela magnífica recepção em seu laboratório, por ceder todas as condições possíveis e necessárias para a realização deste trabalho. Por tudo que me ensinou pacientemente sobre química, cromatografia, e qualidade científica. Pelo auxílio irrestrito em tudo que precisei. Por sua simpatia e seu humor, tão peculiar, que alegra toda a Seção de Ficologia!

A Dra. Célia Sant'Anna pelas oportunidades concedidas durante minha estada no Instituto. Pelo acesso a sua biblioteca, por muitas vezes dividir seu conhecimento deste universo microscópico, e sua sabedoria. Agradeço principalmente por conceder a utilização do Laboratório de Culturas de Cianobactérias durante o mestrado.

A Dra. Marisa Rangel, e seus estudantes Rafael e Caio do Centro de Toxinologia Aplicada/ Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CAT/CEPID) do Instituto Butantan pela realização dos bioensaios. Em especial a Angélica, pela inestimável amizade e colaboração nos ensaios.

A Dra. Luce Brandão e Dra.M.Claudia Young do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pelas relização dos ensaios de atividade biológica.

A Dra. Clarisse Palma da Silva do Laboratório de Biologia Molecular pela utilização da centrífuga.

As Dra. Maria Tereza de Paiva Azevedo, Dra. Luce Brandão Torres, Dra. Carla Ferragut pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida.

A Marina da Diretoria do Centro de Pesquisa em Plantas Avasculares e Fungos por toda sua simpatia, pelas palavras sempre divertidas nos corredores deste Instituto!

A Dinorah por toda atenção prestada no período que estive no alojamento.

Aos funcionários da Pós Graduação Elvis, Antônio e principalmente a Márcia, por sua gentileza, eficiência e simpatia que auxilia inesgotavelmente a vida destes pós graduandos. A Irene da Secretaria da Agricultura, pelo imenso amor e dedicação que realiza seu trabalho; por todo capricho em todas as cópias necessárias para a realização desta dissertação. A representante discente Me. Ludmila Raggi por sempre pacientemente sanar minhas dúvidas “institucionais” da Pós Graduação.

A todos que participaram dos preciosos almoços na Copa da Fico!

Aos funcionários de Apoio da Seção Neu, Neide, Elizete, Zé Domingos, Val, Rodrigo, e Renata; e as pesquisadoras Dra. Célia Leite Sant’Anna, Dra. Luciana Retz de Carvalho, Dra. Diclá Pupo Santos, Dra. Mutue Toyota Fujii, Dra. Nair Sumie Yokoya, Dra. Silvia Maria Pitta B. Guimarães e Dra. Sílvia Susanne Melcher. Muito Obrigada pelo convívio agradável ao longo destes anos! Aos meus caros amigos ficólogos “Show de bola” Camila Malone, Edna, Fê Rios, Ana Livia, Kleber Renan, Watson, e Fernando. Muito obrigada ao emprestar ombros e ouvidos; ao dividir experiências, e expectativas; por compartilhar as ansiedades deste momento impar da minha vida; por todas as inúmeras sugestões, discussões taxonômicas e cromatográficas; que tanto me auxiliaram nesta dissertação.

MUITO OBRIGADA!!! Vocês são um ESPETÁCULO.

Aqueles que trilharam junto alguns passos e me deixaram em boa companhia: Geanne, Felipão, João, Gisele, César, Ingrid, Ana Claudia, Cecilia, Mariana, Alex, Dani Silva, Luciana Cunha, Beatriz, Júlio e Dani Sudati (saudades...!). Aos que partilharam disciplinas e discursos imemoráveis Janaina Rigonato, Simone Wengrat, Murilo Borduqui, Jadson e Fernanda Lucas. Aquelas que mesmo longe estiveram na torcida: Marisa, Vivis, Rô, Jafinha e Isa. Amo vocês!!! A minha família, meu berço e porto seguro, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho. Muito obrigada pelo apoio, e incentivo de meus irmãos David e Dimitri (valeu irmão!!), e meus pais Marly e Damião, que me ensinaram o valor de tantas coisas impagáveis.

MÃE e PAI, OBRIGADA POR TUDO!

Ao meu amor Ivan, que sempre me apoiou; agradeço especialmente pela imensa compreensão em todos os momentos; pelo carinho e companheirismo. Agradeço a Deus, Pai Querido, por me mostrar a cada dia o seu AMOR em diferentes formas; por me levar aonde somente eu, não chegaria; por me dar mais do que eu mereça e por todas as bênçãos concedidas ao colocar em meus caminhos pessoas e oportunidades maravilhosas.

Foram seis anos na Ficologia...!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Levantamento Bibliográfico: Estado de São Paulo.....	5
2. OBJETIVO GERAL.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Manutenção de Culturas Uniespecíficas para Estudos Taxonômicos:.....	12
3.1.1 Estudos Taxonômicos.....	13
3.2. Cultivo e Obtenção de Biomassa para Estudos Químicos e Biológicos	15
3.2.1. Pesquisa Química de Substâncias ativas	16
3.2.2. Pesquisa Biológica de Substancias Ativas.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 Estudos Taxonômicos	19
4.2 Pesquisa Química de Substâncias Ativas	40
4.3 Pesquisa Biológica de Substâncias Ativas	44
4.4 Coleção de Cultura de Cianobactérias	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
Referencias bibliográficas.....	61
Resumo.....	71
Abstract.....	73
Anexos.....	75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto geral das cepas mantidas na Coleção de Culturas da Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia..... 10
- Figura 2.** Esquema do procedimento de repicagem das cepas de cianobactérias, utilizado durante o período de estudo (Jacinavicius 2010)..... 13
- Figura 3.** Esquema do procedimento de multiplicação das cepas para a obtenção de biomassa com os respectivos tempos de crescimento..... 16
- Figura 4.** Médias e desvio padrão do comprimento (μm) e do diâmetro celular (μm) (n=50) de *Rhabdoderma sancti-pauli* (CCIBt 3246) ao longo dos dez meses de estudo em cultura..... 21
- Figura 5.** Gráficos de caixas esquemáticas (medianas, quartis, n=50) do comprimento celular (μm) (A) e diâmetro celular (μm) (B) de *Rhabdoderma sancti-pauli* (CCIBt 3246) ao longo dos dez meses de estudo em cultura..... 22
- Figura 6.** Média e desvio padrão do comprimento (μm) e do diâmetro celular (μm) (n=50) de *Leptolyngbya angustissima* (CCIBt 3102) durante os dez meses de estudo em cultura... 25
- Figura 7.** Gráficos de caixas esquemáticas (medianas, quartis, n=50) do comprimento celular (μm) (A) e diâmetro celular (μm) (B) de *Leptolyngbya angustissima* (CCIBt 3102) ao longo dos dez meses de estudo em cultura..... 25
- Figura 8.** Média e desvio padrão do diâmetro celular (μm) (n=50) de *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3085) durante os dez meses de estudo em cultura..... 29
- Figura 9.** Gráfico de caixas esquemáticas (medianas, quartis, n=50) do diâmetro celular (μm) de *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3085) ao longo dos dez meses de estudo em cultura. 29
- Figura 10.** Média e desvio padrão do comprimento (μm) e do diâmetro celular (μm) (n=50) de das cepas de *Phormidium formosum* (CCIBt 3163) A e (CCIBt 3246) B ao longo dos dez meses de estudo em cultura..... 34
- Figura 11.** Gráficos de caixas esquemáticas (medianas, quartis, n=50) do comprimento celular (μm) (A) e diâmetro celular (μm) (B) das cepas de *Phormidium formosum* (CCIBt 3163 A e CCIBt 3246 B) ao longo dos dez meses de estudo em cultura..... 35
- Figura 12.** Média e desvio padrão do comprimento (μm) e do diâmetro da célula vegetativa (A) e do heterocito (μm) (B) de *Calothrix elenkinii* (CCIBt 3287) durante os dez meses de estudo em cultura (n=50)..... 37
- Figura 13.** Gráficos de caixas esquemáticas (medianas, quartis, n=50) do comprimento da célula vegetativa e do heterocito (μm) (A) e diâmetro da célula vegetativa e do heterocito

(μm) (B) das cepas de <i>Calothrix elenkinii</i> (CCIBt 3287) ao longo dos dez meses de estudo em cultura.....	38
Figura 14. Cromatograma em gel de sílica do extrato em ácido acético da cepa CCIBT 3163 desenvolvida na fase móvel clorofórmio/metanol/água 64:36:8 (v/v/v), derivatizada com peróxido de hidrogênio 1% e observada e documentada sob radiação UV 365 nm. As setas indicam as manchas fluorescentes que comprovam a presença de saxitoxinas.....	41
Figura 15. Cromatografia em placa de gel de sílica; fase móvel: butanol:ácido acético:água 4:1:1, v/v/v; derivatizante: ninidrina. As setas indicam as manchas cujo R_f 0,11 coincide com o do padrão de BMAA.	42
Figura 16. Bioautografia com o extrato metanólico de <i>Phormidium formosum</i> CCIBT 3163. O halo (seta) indica substância inibidora da atividade anticolinesterásica. Placa cromatográfica de gel de sílica; fase móvel composta por clorofórmio/metanol/água 64:36:8 (v/v/v).....	47
Figura 17: a-n <i>Rhabdoderma sancti-pauli</i> CCIBt 3244: a. Aspecto geral da colônia adulta; b-d. colônias adultas (contraste de fase); e. detalhe de células enfileiradas; f-h. células soltas; i-k. colônias jovens (contraste de fase); l-m. colônias jovens com células enfileiradas.	51
Figura 18: a-m <i>Leptolyngbya angustissima</i> CCIBt 3102: a. Aspecto geral dos filamentos emaranhados (contraste de fase); b. filamentos em feixes com e sem bainha; c. filamentos emaranhados; d-f. filamentos (contraste de fase); g. filamento solitário; h. tricoma solitário; i. tricomas adultos; j. detalhe do ápice do tricoma; k. fragmento de tricoma; l-m. filamentos jovens.....	52
Figura 19: a-f <i>Cyanosarcina</i> sp. CCIBt 3085: Colônias em diferentes estágios de desenvolvimento. a. aspecto geral de colônia adulta; b. colônia com pacotes de células densamente agregadas; c. colônia adulta; d. células soltas na margem de uma colônia adulta; e. colônia adulta em divisão; f. colônia amorfa.	53
Figura 20: a-k <i>Cyanosarcina</i> sp. CCIBt 3085: a-b. colônias jovens; c. colônia jovem esférica; d-k. células se dividindo em diferentes planos.....	54
Figura 21: a-n <i>Phormidium formosum</i> CCIBt 3163: a. Aspecto geral dos tricomas emaranhados; b. tricomas em feixes; c. tricomas curvos, constritos, com ápice atenuado; d-g. tricomas não constritos; h. tricoma constrito (contraste de fase); i-j. tricomas curvos, constritos, com ápice atenuado; k. hormogônio; l. aspecto macroscópico do talo em tudo de ensaio; m. hormogônio com ápice atenuado; n. hormogônio constrito.....	55
Figura 22: a-r <i>Phormidium formosum</i> CCIBt 3246: a. Aspecto geral dos tricomas emaranhados; b. tricomas emaranhados (contraste de fase); c-f. tricomas constritos, retos,	

não atenuados; g-l. tricomas constrictos, curvos, com ápice atenuado; m. tricomas não constrictos; n-o. tricomas em divisão; p. hormogônio constricto; q. aspecto macroscópico do talo em tudo de ensaio; r. hormogônio..... 56

Figura 23: a-m *Calothrix elenkinii* CCIBt 3287: a. Aspecto geral dos tricomas emaranhados; b-c. detalhe de bainha aberta nos ápices; d-f filamentos com heterocitos subcônicos; g. filamento com heterocito arredondado; h-m. filamentos com heterocitos subcônicos alongados..... 57

Figura 24: a-h *Calothrix elenkinii* CCIBt 3287: a-c. filamentos com heterocito cônico-arredondado; c-g: filamentos com heterocito alongado; h. conforme Desikachary (1959) prancha 114 figura 6. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das cepas de cianobactérias estudadas pertencentes à Coleção de Culturas do Instituto de Botânica (CCIBt): número da cepa, código antigo da cepa, tipo de talo, data e local de coleta e principal utilização do reservatório.	11
Tabela 2. Composição das soluções estoques destinadas ao preparo de meio de cultura ASM-1, conforme Gorham <i>et al.</i> (1964), com modificações (Zagatto & Aragão 1992).	12
Tabela 3. Quantidades de soluções estoques utilizadas no preparo de 1.000 mL do meio ASM-1.	12
Tabela 4. Sinais de intoxicação dos animais-teste durante os bioensaios: modo de ação; cianotoxina, tempo decorrido até a morte, gênero, sintomatologia (adaptado de Calijuri <i>et al.</i> 2006).	18
Tabela 5. Principais características de <i>Leptolyngbya angustissima</i> (CCIBt 3102) e espécies do gênero registradas em ambientes oligotróficos no Estado de São Paulo.	26
Tabela 6. Principais características de <i>Cyanosarcina</i> sp. (CCIBt 3085) e espécies relacionadas no presente trabalho.	30
Tabela 7. Principais características entre as espécies de <i>Calothrix</i> de água doce, com base intumescida (até 10 µm diâm.), relacionadas no presente trabalho.	39
Tabela 8. Pesos das biomassas liofilizadas de cada cepa, dos extratos e seus respectivos rendimentos.	40
Tabela 9. Resultados positivos de BMAA livre encontrado em cepas no presente estudo. ...	43
Tabela 10. Resultados dos bioensaios realizados em camundongos (n=3): solventes (natureza dos extratos), resultados dos bioensaios (+ : positivo, - negativo) e variação dos pesos dos animais (Peso inicial: $p_{inicial}$; peso final: p_{final} e diferença do peso inicial e final: Δp).	44
Tabela 11. Sinais de intoxicação observados nos animais-teste (n=3) que receberam extratos (em ácido acético e metanólico) da cepa <i>Phormidium formosum</i> CCIBT 3163.	45
Tabela 12. Relação das 90 Cepas de cianobactérias da Coleção de Cultura do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica estudadas quanto à toxicidade; número da cepa estudada (CCIBt); número antigo da cepa (SPC); organismo; e resultado da toxicidade.	48

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais as preocupações com o meio ambiente vêm se intensificando frente à deterioração antrópica dos recursos naturais, especialmente a água. A água doce disponível do planeta corresponde a menos que 2,5% do volume total de água da Terra; destes, apenas 0,3% são encontrados em águas superficiais, como rios e lagos. Embora o Brasil detenha aproximadamente 14% das águas doces do planeta, os problemas de gerenciamento dos recursos hídricos afetam diretamente a quantidade e qualidades dessas águas (Tundisi 2003; Bicudo *et al.* 2010).

Os reservatórios são sistemas artificiais construídos para atender às diversas demandas das atividades humanas e sustentam organismos, populações e distintas comunidades, que interagem entre si e com um conjunto complexo de características hidrológicas e climatológicas (Tundisi 2005).

Grande parte dos reservatórios da Região Metropolitana de São Paulo encontra-se em meio a avançada e desordenada ocupação urbana, que agrava os impactos e adiciona inúmeros danos a qualidade da água (Tundisi 2005). O despejo de efluentes orgânicos e industriais é um dos fatores que interfere na qualidade da água, promovendo a eutrofização artificial e o desenvolvimento de florações de microalgas e principalmente de cianobactérias (Tundisi 2003). Ainda, de acordo com Paerl & Huisman (2008), as mudanças climáticas podem potencializar a ocorrência das florações. A elevação da temperatura (acima de 25°C) favorece as cianobactérias no crescimento e duplicação celular (diferente de outras espécies do fitoplâncton, como diatomáceas e algas verdes). As florações apresentam também riscos a saúde pública, pois durante a senescência das cianobactérias que compunham a floração pode ocorrer a liberação de cianotoxinas na água (Huszar *et al.* 2000).

Cianobactérias são organismos procariontes fotossintetizantes e está inserido no Domínio Bactéria. Todas possuem clorofila *a*, carotenóides, xantofilas e ficobiliproteínas; três gêneros possuem clorofila *a* e *b* (antigas Prochlorophyta) e apenas a espécie marinha *Acaryochloris marina* Miyashita & Chihara possui clorofila *d*; sua parede celular é similar a de bactérias gram-negativas com lipopolissacarídeos, açúcares e aminoácidos (Lee 2008). A reprodução é exclusivamente assexuada e ocorre por simples divisão celular. Alguns gêneros produzem baeócitos ou exócitos, algumas cianobactérias se reproduzem pela formação de hormogônios (fragmentos de tricoma) (Melcher 2007; Graham & Wilcox 2000).

Nos ecossistemas as cianobactérias compõem diferentes comunidades, podendo ser planctônicas, perifíticas, aerofíticas, endolíticas; vivem, também, em simbiose com outros organismos como os fungos, com os quais formam os líquens e no interior de raízes de vegetais superiores. São capazes de habitar diversos ambientes e possuem ampla distribuição geográfica, desde os ambientes aquáticos (dulcícolas, salinos, salobros), solos úmidos, até as fontes termais; entretanto a maioria é de água doce (Graham & Wilcox 2000).

As cianobactérias são mencionadas como os primeiros organismos fotoautotróficos do planeta, sendo provavelmente, os responsáveis pela liberação de oxigênio na atmosfera primitiva; os registros fósseis que evidenciam o surgimento do grupo datam de 3,5 milhões de anos (Graham & Wilcox 2000; Whitton & Potts 2000). Dessa maneira, compõem um dos grupos mais diversos e abundantes, conferida por sua vasta diversidade metabólica (Fiore & Honda 2008). Sua história evolutiva lhes conferiu adaptações que garantem seu sucesso ecológico; toleram condições com pouco oxigênio, luz ou nutrientes; variações de temperatura, irradiância e salinidade (Whitton & Potts 2000).

Uma das características peculiar ao grupo são as vesículas gasosas, também chamadas de aerótopos, constituídas por um conjunto de proteínas hidrófobas, que são permeáveis a gases, mas impermeáveis a água. Os aerótopos permitem a flutuabilidade do organismo na coluna d'água, que é induzida pela irradiância: em baixos valores de irradiância, os aerótopos são formados, de maneira que o organismo flutua nas camadas mais superficiais. Dessa forma os aerótopos auxiliam tanto o acesso aos nutrientes, quanto a exposição à luz solar (Visser *et al.* 2005; Lee 2008)

Outra característica peculiar do grupo é o complexo enzimático nitrogenase responsável pela fixação de nitrogênio a partir de N_2 em condições anaeróbias. Portanto, a fixação de nitrogênio deve ocorrer separadamente da fotossíntese, uma vez que o oxigênio inativa a nitrogenase. Essa separação dos processos dentro do organismo pode ser espacial (em células diferentes) e/ou temporal (em períodos diferentes). Para as cianobactérias heterocitadas esse processo ocorre em células especiais, os heterocitos. Alguns representantes de *Lyngbya*, *Gloeotheca* e *Cyanotheca* realizam o processo numa separação temporal em condições sem luz. Outras cianobactérias filamentosas não-heterocitadas, como *Trichodesmium*, também são capazes de fixar nitrogênio, realizando-o em células denominadas diazófitos; que não parecem ser morfológicamente distintas das demais células vegetativas, como é o caso dos heterocitos. Ainda, *Plectonema boryanum* Gomont, a

cianobactéria filamentosa não heterocitada, é capaz de criar condições anóxicas para a realização do processo (Fiore & Honda 2008).

Além disso, as espécies heterocitadas de cianobactérias podem formar acinetos, que são células de resistência com parede espessada e acúmulo de nutrientes em seu interior. Em condições adversas, ficam em repouso e germinam quando as condições tornam-se novamente favoráveis, promovendo a germinação de novos filamentos (Lee 2008, Graham & Wilcox 2000).

As toxinas sintetizadas por cianobactérias são conhecidas como cianotoxinas que são classificadas segundo sua ação farmacológica em: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas (Cood *et al.* 2005, Carvalho 2006).

Devido à presença de lipopolissacarídeos (LPS), constituintes da parede celular de todas as bactérias Gram-negativas, todas as cianobactérias são tóxicas, dermatotóxicos e se ingeridos induzem neutropenia, trombocitopenia, níveis anormais de glicose, acidose e alcalose, podendo levar à morte (Carvalho 2006). Porém, cerca de 60% das espécies sintetizam também outras substâncias tóxicas, as cianotoxinas (Van Apeldoorn *et al.* 2007). Por isso, as florações ou mesmo a constante presença de cianobactérias, podem trazer danos à saúde pública, principalmente se ocorrerem em mananciais utilizados para abastecimento público ou recreação (Sant'Anna & Azevedo 2006).

Na classe das hepatotoxinas estão as microcistinas (heptapeptídeos cíclicos) e as nodularinas (pentapeptídeos). Ambas inibem as proteínas fosfatases dos hepatócitos de mamíferos, causando hemorragia intrahepática e como consequência, a morte por choque hipovolêmico (Dittman & Wiegand 2006). As microcistinas são sintetizadas pelos gêneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon* enquanto as nodularinas são produzidas somente pelo gênero *Nodularia* (Van Apeldoorn *et al.* 2007).

A classe de neurotoxinas é formada por quatro grupos distintos de alcalóides, além de um aminoácido. No primeiro, estão as saxitoxinas, alcalóides tricíclicos do tipo carbamato, que bloqueiam os canais de sódio das células nervosas dos mamíferos, causando paralisia e falência respiratória; foram isoladas de *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix* e *Lyngbya* (Carvalho 2006, Van Apeldoorn *et al.* 2007).

O segundo grupo é formado pelas anatoxinas-a, alcalóides tropânicos que se ligam irreversivelmente à receptores de acetilcolina e são encontradas em representantes de

Anabaena, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Cylindrospermum*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis* (Wiegand & Pflugmacher 2005).

A anatoxina-a(s) é um alcalóide organofosforado que bloqueia a atividade da acetilcolinesterase, causando fraqueza muscular, dispnéia e convulsões, seguida de morte. Essa toxina é sintetizada por *Anabaena* (Carvalho 2006, Van Apeldoorn *et al.* 2007).

No quarto grupo está o aminoácido neurotóxico de efeito crônico, β -metil-aminoalanina (BMAA), descoberto em *Nostoc* simbiotes de raízes de cicadáceas que acumulavam essa toxina em suas sementes. Esse aminoácido pode ser produzido pelas cianobactérias de vida livre e não somente pelas simbiotes (Cox *et al.* 2005).

As citotoxinas são alcalóides guanidínicos cíclicos denominados cilindrospermopsinas que inibem síntese protéica, causando desestruturação e necrose no fígado, além de danos em células renais, cardíacas e pulmonares. Foram isoladas de representantes de *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis*, *Umezakia* e *Anabaena* (Wiegand & Pflugmacher 2005).

O primeiro caso provavelmente relacionado à intoxicação humana por cianotoxinas no Brasil aconteceu em 1988, quando 2.000 pessoas apresentaram gastroenterites após ingerirem água do reservatório de Itaparica, na Bahia; dessas, 88 foram a óbito (Teixeira *et al.* 1993). Já em Caruaru, Pernambuco, a administração intravenosa, durante sessões de hemodiálise, de água contaminada com microcistinas, resultou na morte de 52 pacientes (Azevedo *et al.* 2002). Entretanto, o primeiro registro comprovado de toxina produzida por cianobactérias no Brasil foi descrito por Azevedo *et al.* em 1994, para o Lago das Garças, São Paulo, com a detecção de microcistina proveniente de florações de *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing.

A ameaça que as cianotoxinas representam, adquire maior vulto quando observamos que outros organismos aquáticos utilizados como alimentação dos seres humanos (peixes e bivalves) podem acumular essas substâncias em suas glândulas ou músculos (Wiegand & Pflugmacher 2005).

Por esse motivo, é imprescindível que seja feita a correta identificação de cianobactérias presentes em amostras de água, pois dela vão depender as ações das companhias de saneamento, no que se refere à transposição entre bacias e ao tratamento da água (Carvalho 2003).

O estudo taxonômico de cianobactérias vem passando por mudanças com o surgimento da biologia molecular, além das modificações oriundas dos estudos sobre o desenvolvimento em cultura, bioquímica, fisiologia, ultra-estrutura e ecologia do grupo (Hoffman *et al.* 2005).

Nesse contexto, a avaliação de cepas provenientes de populações naturais mantidas em condições controladas de cultivo permite a observação de seu desenvolvimento e assim objetivam solucionar problemas taxonômicos (Honda & Azevedo 2004).

1.1. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO PARA O ESTADO DE SÃO PAULO

Os estudos sobre o desenvolvimento *in vitro* de cianobactérias vêm sendo desenvolvidos, especialmente sob o ponto de vista taxonômico e morfológico. Quanto as pesquisas sobre cianotoxinas, muitos trabalhos partem de florações com materiais não identificados, ou ainda identificados por análises moleculares, sem informações sobre a variabilidade fenotípica e morfométrica destes organismos (Furtado 2007, Carvalho *et al.* 2008, Molica & Azevedo 2009).

A primeira tentativa, bem sucedida, de avaliar a validade taxonômica foi realizada por Bicudo (1985). O autor estudou *Borzia trilocularis* Cohn *ex* Gomont (Oscillatoriales), isolada de um lago artificial do Jardim Botânico de São Paulo, a fim de comprovar se este representava de fato um gênero ou apenas um hormogônio de outra cianobactéria. O autor avaliou características morfométricas e confirmou, através da observação da reprodução vegetativa, a validade do táxon.

Entretanto, os trabalhos referentes às cianobactérias que abordam o cultivo e desenvolvimento têm início no Brasil, apenas a partir de 1990. De forma geral, nestes trabalhos foram discutidos a importância do uso de material em cultura tanto para definir estágios de vida, como também para avaliar a variabilidade fenotípica.

Dentro deste contexto, um trabalho pioneiro foi realizado por Azevedo (1991) que analisou e cultivou material edáfico do Jardim Botânico de São Paulo. A autora identificou 24 táxons de cianobactérias, sete foram novas citações para o Brasil e dez para o Estado de São Paulo. O material coletado do solo foi mantido em cultura e possibilitou, posteriormente, o cultivo de cepas uniespecíficas para melhor observação de suas estruturas e crescimento. Dessa forma, ambos os materiais, da natureza e de cultura, foram utilizados para a identificação taxonômica dos organismos. Outros importantes trabalhos foram publicados com descrições de espécies novas para a ciência e que utilizaram a cultura para descrever o

desenvolvimento das espécies, como: *Rhabdogloea brasílica* Azevedo & Kováčik (Azevedo & Kováčik 1996), *Hormothece geitleriana* Azevedo & Sant'Anna (Azevedo & Sant'Anna 1994), *Coelosphaerium evidenter-marginatum* Azevedo & Sant'Anna (Azevedo & Sant'Anna 1999), *Eucapsis densa* Komárek & Hindák (Azevedo *et al.* 2003), *Sphaerocavum brasiliense* Azevedo & Sant'Anna (Azevedo & Sant'Anna 2003). E a proposição de novas combinações taxonômicas como *Geitlerinema amphibium* (C.Agardh ex Gomont) Anagnostidis (Bittecourt-Oliveira *et al.* 2009).

Honda e Azevedo (2004) isolaram 27 cepas de cianobactérias provenientes de um reservatório oligotrófico do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo. O material coletado foi inserido no Herbário (SP) e o isolado na coleção de culturas de algas e cianobactérias do Instituto de Botânica. Foram identificados 12 táxons, sendo *Merismopedia africana* Komárek & Cronberg e *Dzentsia* sp. citados pela primeira vez no Brasil. Toda a identificação do material foi baseada então no material fixado da natureza e no isolado vivo mantido em cultura. Os autores concluíram que o cultivo mostrou ser uma ferramenta importante, pois permitiu visualizar características de desenvolvimento e motilidade que não puderam ser registrados nas amostras fixadas. Ainda, comentaram que este tipo de estudo permite avaliar a microbiota potencial do ambiente, uma vez que muitos organismos presentes na natureza em baixas densidades são omitidos, por não serem observados em populações. No entanto, estes se desenvolvem em cultura e assim podem ser observados e registrados para a flora estudada.

Honda (2005), ao estudar o desenvolvimento *in vitro* de três espécies de *Microcystis* isoladas de corpos d'água do Estado de São Paulo, avaliou características morfométricas diacríticas de diferentes populações naturais e em cultura sob diferentes condições de irradiância e temperatura. De modo geral, não houve diferença nos caracteres morfológicos analisados (forma da colônia, distribuição das células, diâmetro celular, e espessura da mucilagem) entre populações naturais e cultivadas, o que possibilitou a identificação e a validação das características diacríticas utilizadas no estudo.

Vieira *et al.* (2005) documentaram a primeira floração de cianobactérias para a região Amazônica; ao avaliar a biodiversidade e toxicidade de cianobactérias das águas superficiais de um reservatório destinado ao abastecimento público e seu afluente, antes e após o tratamento nos lagos Água Preta e Bolonha localizados em Belém, no Pará. A toxicidade foi testada através de bioensaios em camundongos e revelou a presença de hepatotoxinas em 43% das 39 amostras de cianobactérias isoladas, sendo 38% atribuídas às amostras de *Microcystis*

viridis (A.Braun) Lemmermann e 12% à *Radiocystis fernandoi* Komárek & Komárková-Legnerová. Esta cepa de *Radiocystis fernandoi* foi posteriormente estudada quanto à síntese de metabólitos tóxicos. Os extratos da cepa foram considerados hepatotóxicos para camundongos e a toxicidade atribuída a microcistina-LR (Lombardo *et al.* 2006).

Melcher (2007) estudou as relações morfológicas e filogenéticas de cianobactérias heterocitadas cultivadas: *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*. Este trabalho objetivou descrever e comparar dez linhagens brasileiras além de investigar a potencial produção de toxinas destes organismos. Todas as linhagens apresentaram ampla variação morfológica. Apenas o caráter razão comprimento/diâmetro da célula apical foi destacado como adequado para distinguir os gêneros. A toxicidade foi testada através de bioensaio em camundongos, sendo que as linhagens de *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* apresentaram resultados positivos para neurotoxinas, e *Aphanizomenon* não apresentou toxicidade.

Honda (2009) pesquisou o desenvolvimento *in vitro* de *Anabaena* (Nostocales). Isolou e analisou 23 cepas de cianobactérias pertencentes a distintos corpos d'água dos Estados de São Paulo e Ceará. O cultivo foi testado com meios de cultura modificados a partir dos meios AA/4, ASM-1, BGN, sendo que ASM-1 não foi favorável ao desenvolvimento dos organismos. Cinco morfoespécies foram identificadas e as características diacríticas ressaltadas foram: a espira é importante para diferenciação de *A. crassa* (Lemmermann) Komark.-Legn. & Cronberg, *A. circinalis* Rabenhorst ex Bornet & Flahault e *A. cf. fallax* (Lemmermann) Komark.-Legn. & Cronberg; o comprimento do acineto para *A. aphanizomenoides* Forti e *A. planctonica* Bruunthaler; e por fim, a bainha foi suficiente para separar *A. crassa* das outras.

Quanto à síntese de cianotoxinas, a grande maioria dos gêneros citados como potencialmente tóxicos são registrados em reservatórios de abastecimento. Dentre trabalhos que abordam este assunto destacam-se: Sant'Anna *et al.* (2007), ao estudarem as cianobactérias dos reservatórios de abastecimento da Bacia do Alto Tietê, Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), concluíram que 35% dos táxons encontrados pertenciam aos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix*, *Microcystis* e *Raphidiopsis*, que são potencialmente produtores de cianotoxinas. Carvalho *et al.* (2007), ao avaliarem a presença de microcistinas dissolvidas na água dos reservatórios Billings e Guarapiranga (RMSP), detectaram microcistinas em todas as amostras do reservatório Billings, além de identificarem 19 cianobactérias, das quais nove eram relatadas como potenciais produtoras de cianotoxinas.

Furtado *et al.* (2009) isolaram 10 linhagens de cianobactérias provenientes de lagoa de estabilização em Cajati, SP, distribuídos nos gêneros *Synechococcus*, *Merismopedia*, *Limnothrix*, *Leptolyngbya* e *Nostoc*. Foram realizados estudos morfológicos e análises moleculares com base na seqüência do gene RNAr16S. Entretanto, em seus resultados, os táxons não foram identificados em nível específico. Também foi realizado teste ELISA para microcistinas nas amostras ambientais e nos materiais isolados. Em oito amostras foram encontrados valores superiores aos permissíveis ($1,0 \mu\text{g. L}^{-1}$) pela legislação brasileira e pela Organização Mundial da Saúde (OMS); sendo duas de amostras ambientais, e seis de cianobactérias isoladas.

A revisão de espécies de cianobactérias brasileiras produtoras de toxinas realizada por Sant'Anna *et al.* (2008) relacionou a ocorrência dos táxons, a classe da toxina e seus métodos de detecção. Algumas condições ambientais foram relacionadas às 32 espécies citadas. As autoras mencionaram que florações tóxicas de *Microcystis* ocorreram nas regiões tropicais e subtropicais do país, enquanto florações tóxicas de *Anabaena* foram restritas principalmente às regiões subtropicais. As autoras concluíram que, de forma geral, as cianobactérias cocóides produzem microcistinas, salvo algumas exceções, e as filamentosas sintetizam estas e outras cianotoxinas.

2. OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo taxonômico *in vitro* de seis cepas uniespecíficas, isoladas de populações naturais e mantidas em condições controladas de cultivo; além de investigar o potencial dessas cepas quanto à síntese de cianotoxinas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e acompanhar as características morfométricas de cepas uniespecíficas de cianobactérias.
- Investigar a presença de cianotoxinas (microcistinas, saxitoxinas, e β -metilaminoalanina) química e biologicamente nas cepas estudadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo taxonômico e químico de cianobactérias foi desenvolvido a partir de cepas selecionadas da Coleção de Cultura de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia (figura 1). Esta coleção faz parte da Coleção de Culturas do Instituto de Botânica (CCIBt).

Assim sendo a Coleção de Culturas de Cianobactérias está situada no Núcleo de Pesquisa em Ficologia, no Laboratório de Culturas de Algas Marinhas e Cianobactérias Dra. Marilza Cordeiro-Marinho. Esta coleção destina-se à estudos taxonômicos, biológicos, fisiológicos, filogenéticos e bioquímicos. Atualmente possui cerca de 330 cepas, das quais, 45% estão completamente identificadas e 26% já foram estudadas quanto à toxicidade.



Figura 1. Aspecto geral das cepas mantidas na Coleção de Culturas de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia.

As cepas para o desenvolvimento do presente estudo foram selecionadas segundo os critérios: ausência de identificação de gênero e espécie; ausência de estudos anteriores sobre a toxicidade da cepa; cepas provenientes de amostras coletadas em reservatórios e, finalmente; cepas com representantes de diferentes tipos de talos: cocóide, filamentosos homocitados e filamentosos heterocitados. Assim, seis cepas atenderam aos critérios mencionados (tabela 1).

Tabela 1. Relação das cepas de cianobactérias estudadas pertencentes à Coleção de Culturas do Instituto de Botânica (CCIBt): número da cepa, código antigo da cepa, tipo de talo, data e local de coleta e principal utilização do reservatório.

Cepa	Tipo de talo	Data de coleta	Local de coleta	Utilização
CCIBt 3085	Cocóide	abril 1997	Reservatório Guarapiranga	abastecimento
CCIBt 3102	Filamento homocitado	abril 1998	Reservatório Atibainha	abastecimento
CCIBt 3163	Filamento homocitado	janeiro 2000	Lago piscicultura Ribeirão Preto	aquicultura
CCIBt 3246	Cocóide	março 2003	Reservatório Billings	abastecimento
CCIBt 3244	Filamento homocitado	setembro 2003	Lago das Garças	ornamental
CCIBt 3287	Filamento heterocitado	fevereiro 2009	Viveiro de aquicultura Intituto de Pesca	aquicultura

Isolamento de cepa: Ressalta-se que das seis cepas selecionadas para o desenvolvimento deste estudo, cinco já haviam sido isoladas e eram mantidas em cultura e a cepa CCIBt 1058 foi submetida ao procedimento de **plaqueamento** para obtenção de cultura uniespecífica. A amostra da natureza foi coletada em viveiro experimental do Núcleo de Aquicultura de Pindamonhangaba, do Instituto de Pesca, em fevereiro de 2009 (tabela 1).

O plaqueamento consiste em inocular três gotas da amostra natural viva em placas de Petri com meio de cultura ASM-1 sólido, ao qual foi adicionado o antibiótico cicloheximida (na concentração $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$), para inibir o crescimento de organismos eucariontes. Em seguida, o material foi espalhado com auxílio do triângulo de vidro esterilizado; a placa foi vedada e mantida em condições controladas e constantes de temperatura $23 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância $40\text{-}50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 14-10 h claro-escuro.

Após 10 dias foi observado o crescimento de diferentes massas de cianobactérias em microscópio óptico. As massas de interesse foram selecionadas e repicadas para tubos de ensaio com meio de cultura líquido com cicloheximida. Este procedimento foi repetido até obtenção de culturas uniespecíficas, que passam a ser mantidas, periodicamente, em meio líquido sem cicloheximida. A composição química do meio de cultivo ASM-1 está descrita na tabela 2 e 3. Para o preparo do meio sólido foram adicionados ágar 13 g.L^{-1} no meio de cultura.

Tabela 2. Composição das soluções estoques destinadas ao preparo de meio de cultura ASM-1, conforme Gorham *et al.* (1964), com modificações (Zagatto & Aragão 1992).

Solução Estoque	Componentes	Quantidade (g.L ⁻¹)
A (200 mL água destilada)	NaNO ₃	1,7
	Mg SO ₄ .7H ₂ O	0,49
	Mg Cl ₂ .6H ₂ O	0,41
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29
	KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	1,14
B (100 mL água destilada)	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1,78
	H ₃ BO ₃	2,48
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39
	FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08
	ZnCl ₂	0,335
C (100 mL água destilada)	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0014
	EDTA*	1,86

* ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês ethylenediamine tetraacetic acid).

Para o preparo do meio ASM-1 foram utilizadas as quantidades abaixo discriminadas de solução-estoque diluídas em 1.000 mL em água destilada (tabela 3).

Tabela 3. Quantidades de soluções estoques utilizadas no preparo de 1.000 mL do meio ASM-1.

Solução Estoque	Quantidade (mL.L ⁻¹)
A	20
B	2
C	0,1
D	0,4

A solução diluída deve ter o pH ajustado para o valor 7,4.

3.1. MANUTENÇÃO DE CULTURAS UNIESPECÍFICAS PARA ESTUDOS TAXONÔMICOS:

As cepas foram cultivadas e mantidas em triplicatas, ou seja, em três tubos de ensaio distintos, cada um deles contendo 15 mL de meio de cultura ASM-1 líquido, esterilizados em autoclave, por 30 minutos, à temperatura de 121°C e sob pressão de 1,5 atm (Stanier *et al.* 1971). O meio de cultivo foi trocado a cada 30 dias, em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada por exposição, por 30 minutos, à luz UV, precedida por desinfecção com álcool

70%. A **repicagem** foi realizada a cada 30 dias, com auxílio de pipetas tipo Pasteur, previamente esterilizadas, para dois tubos com meio de cultura autoclavado (figura 2).

As cepas foram mantidas na Coleção de Cultura de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, sob as seguintes condições: temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância de $40\text{--}50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 14 - 10h claro-escuro (Azevedo & Sant'Anna 2003).

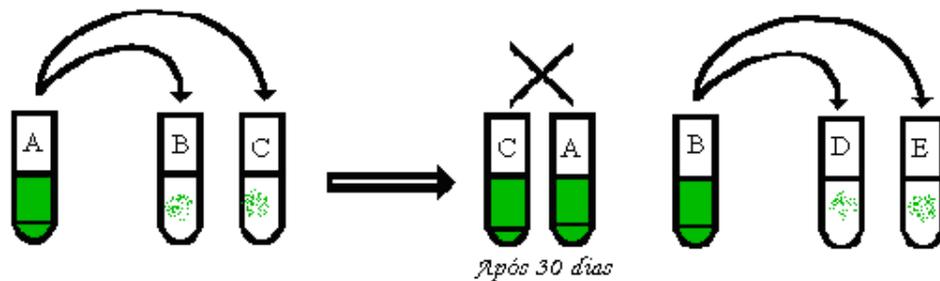


Figura 2. Esquema do procedimento de repicagem das cepas de cianobactérias, utilizado durante o período de estudo (Jacinavicius 2010).

3.1.1 ESTUDOS TAXONÔMICOS

Para o estudo taxonômico convencionou-se denominar de **amostra** a porção ou alíquota da cepa retirada no momento da repicagem e de **população** o conjunto de indivíduos dos quais foram obtidos as informações morfológicas e métricas.

A identificação em nível infragenérico foi feita com base nas características morfológicas e métricas das populações. Para a análise taxonômica foram retiradas amostras de cada uma das cepas durante dez meses. Para análise morfológica e métrica dessas populações, foram examinadas, no mínimo 50 indivíduos ($n=50$) em cinco lâminas de cada amostra, durante os 10 meses.

As amostras foram examinadas em microscopia fotônica, Microscópio Binocular Carl-Zeiss, modelo Axioskop-2, com retículo micrometrado acoplado em aumentos de 400 e 1.000 vezes e as medidas celulares foram realizadas com auxílio do programa Axio Vision 4.6, Zeiss. As medidas foram tomadas de forma aleatória entre os espécimes. Foi utilizado contraste de fase e nanquim, para evidenciar bainhas mucilaginosas.

As características morfológicas e métricas avaliadas foram: forma, comprimento e diâmetro das células; presença ou ausência de aerótopos, grânulos e bainha. Para as formas cocóides, foram observados os planos de divisão das células; quando colonial, foram observados o arranjo e a distribuição das células, na colônia. Para os talos filamentosos, foram observadas: forma e estrutura dos tricomas/filamentos; forma das células vegetativas; constrição nos septos; presença de necrídios; caliptra e presença de ramificações. Ainda, para as formas filamentosas heterocitadas foram observadas: presença, número, forma, dimensões e posições de acinetos e heterocitos no tricoma.

O sistema de classificação utilizado foi o de Hoffman *et al.* (2005) e a identificação foi realizada com base em bibliografia especializada, incluindo floras (ex. Desikachary 1959, Komárek & Anagnostidis, 1999 e 2005), artigos, revisões e teses.

Para cada táxon identificado foi apresentado classificação, descrição, ilustrações, material examinado, distribuição geográfica para o estado de São Paulo e comentários. Para a distribuição geográfica dos táxons estudados, foram utilizados trabalhos exclusivamente taxonômicos com descrições e ilustrações.

As amostras estudadas foram fixadas em formol 4%, e depositadas no acervo do Herbário Científico do Estado “Maria Eneyda P. Kauffaman Fidalgo” (SP) do Instituto de Botânica de São Paulo. Estas amostras estão relacionadas a seguir, em ordem numérica crescente de seus respectivos números de acesso ao herbário:

1. **CCIBt 3085 - SP401467:** BRASIL. SÃO PAULO: São Paulo, Reservatório Guarapiranga, IV-1997, *CETESB s.n.* (Amostra em meio líquido).
2. **CCIBt 3102 - SP401468:** BRASIL. SÃO PAULO: Nazaré Paulista, Represa Atibainha, IV-1998, *M.T.P. Azevedo s.n.* (Amostra em meio líquido).
3. **CCIBt 3163 - SP401469:** BRASIL. SÃO PAULO: Ribeirão Preto, Lago de criação de peixes, I-2000, *C.L. Sant’Anna s.n.* (Amostra em meio líquido).
4. **CCIBt 3246 - SP401470:** BRASIL. SÃO PAULO: São Paulo, Instituto de Botânica, Lago da Garças, IX-2003, *C.L. Sant’Anna s.n.* (Amostra em meio líquido).
5. **CCIBt 3244 - SP40171:** BRASIL. SÃO PAULO: São Paulo, Reservatório Billings, III-2003, *CETESB s.n.* (Amostra em meio líquido).

6. **CCIBt 3287 - SP401472:** BRASIL. SÃO PAULO: Pindamonhangaba, Instituto de Pesca, viveiro experimental de aquicultura, II-2009, *C.T.J. Mercante s.n.* (Amostra em meio líquido).

Tratamento estatístico

A análise descritiva dos resultados métricos das populações foi realizada pelo programa GRAPH PAD PRISM. Foram feitos gráficos de caixas esquemáticas que determinam a mediana e os quartis; como medidas de tendência central foi usada a média aritmética e a mediana e como medidas de dispersão os quartis (Q1, Q4) e o desvio padrão.

3.2. CULTIVO E OBTENÇÃO DE BIOMASSA PARA ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

As condições fixadas para o desenvolvimento de todas as cepas destinadas à produção de biomassa foram as mesmas utilizadas para a manutenção da Coleção de Cultura de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia.

A produção de biomassa para realização dos estudos químicos foi feita a partir de 5 mL de inóculo da cepa, transferidos para erlenmeyer contendo 50 mL de meio ASM-1 líquido esterilizado (Stanier *et al.* 1971). Após um período de crescimento (que variou de duas a três semanas) sob agitação constante (70 rpm), os 50 mL foram transferidos para erlenmeyer com 500 mL de meio, mantidos sob agitação com igual frequência rotacional por duas a três semanas. A biomassa obtida foi transferida para erlenmeyer contendo 5.000 mL de meio de cultura, que foi submetido à aeração constante, por período de duas a três semanas (figura 3). As cepas filamentosas foram cultivadas sob as mesmas condições, porém sem agitação. Assim, foram cultivados 10 L de cada cepa para obtenção de biomassa.

As culturas foram periodicamente examinadas ao microscópio para confirmar a inexistência de contaminação no meio.

A biomassa obtida foi levada para o Laboratório de Química do Núcleo de Pesquisa em Ficologia para os estudos químicos das substâncias ativas, sob a supervisão da Dra. Luciana Retz de Carvalho.

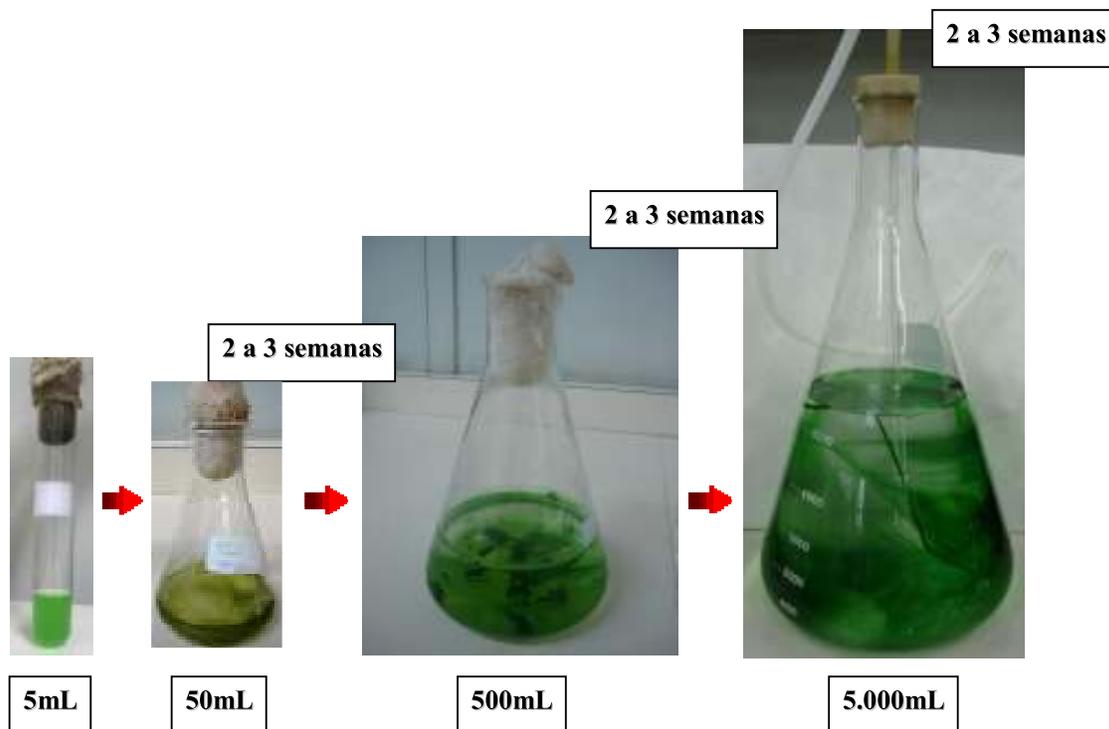


Figura 3. Esquema do procedimento de multiplicação das cepas para a obtenção de biomassa com os respectivos tempos de crescimento.

Obtenção dos extratos: Para cada cepa, a biomassa obtida em cultura foi submetida à liofilização; o material liofilizado foi dividido em duas porções sendo a primeira delas submetida à extração (4 x) com ácido acético 0,1 M por exposição a ultrassom (4 x 10 min., 50 W). Os extratos combinados foram centrifugados, liofilizados e pesados (Pyo & Shin 2002). A segunda porção foi submetida à extração com metanol 100%, também por exposição à ultrassom (4 x 10 min., 50 W), sendo os extratos metanólicos combinados, concentrados para a eliminação do solvente orgânico e o resíduo obtido, liofilizado e pesado.

3.2.1. PESQUISA QUÍMICA DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS

A pesquisa química de substâncias ativas foi realizada por Cromatografia Planar (CP). Além disso a cepa CCIBt 3163 foi testada quanto a atividade anticolinesterásica.

Pesquisa cromatográfica de microcistinas: Para essa análise, 1 mg de extrato em ácido acético, liofilizado, de cada cepa foi dissolvido em metanol/água 75:25 (v/v) e aplicado a placas de gel de Sílica (20x20 cm, 0,25 mm, Kieselgel 60GF₂₅₄, E.Merck), juntamente com o padrão. O cromatograma foi desenvolvido com a fase móvel clorofórmio/metanol/água, 64:36:8, v/v/v; (Poon *et al.* 1987; Harada *et al.* 1988, 1991, 1999), em atmosfera equilibrada

pela colocação do solvente 20 min. antes das placas. Após a corrida cromatográfica, a placa foi seca em corrente de ar, avaliada sob luz ultravioleta (λ 254 nm e 365 nm) e derivatizada com tetrametil benzidina (TMB) (Pelander *et al.* 2000).

Para essa derivatização, a placa seca foi exposta, por 20 minutos, ao gás cloro, gerado pela mistura de volumes iguais de HCl 10% e solução de permanganato de potássio 5%, em seguida, aerada por 15 segundos e nebulizada com TMB. Microcistinas são visíveis como manchas amarelas, em fundo azul.

Pesquisa de saxitoxinas: Para essa análise, 1 mg de extrato em ácido acético, liofilizado, de cada cepa foi dissolvido em água deionizada e aplicado a placas de gel de Sílica (20x20 cm, 0,25 mm, Kieselgel 60GF₂₅₄, E.Merck). O cromatograma foi desenvolvido no mesmo sistema de eluentes utilizado para a pesquisa de microcistinas. A placa foi seca em corrente de ar por uma hora, nebulizada com peróxido de hidrogênio 1%, aquecida a 100 °C por 10 min e observada sob luz ultravioleta- λ 365 nm. Saxitoxinas são visíveis como manchas fluorescentes (Buckley *et al.* 1976).

Pesquisa do aminoácido β -metilaminoalanina: Para essa análise, 1 mg de extrato em ácido acético, liofilizado, de cada cepa, foi dissolvido em água deionizada e aplicado à placa cromatográfica de gel de sílica 60 F₂₅₄, juntamente com o padrão. O cromatograma foi desenvolvido em butanol:ácido acético:água 4:1:1, v/v/v e a seguir foi secado em corrente de ar. Após a secagem, o cromatograma foi nebulizado com ninidrina e aquecido a 110 °C, por 15 minutos (Merck 1971).

3.2.2. PESQUISA BIOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS

Pesquisa de cianotoxinas “in vivo”: Os bioensaios em camundongo foram realizados segundo método preconizado pela Organização Mundial da Saúde (Harada *et al.* 1999), no Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, pela Dra. Marisa Rangel. Este teste consiste na administração da amostra por via intraperitoneal (i.p.), em camundongos machos “Swiss-Webster”, pesando de 19 a 21 g. Cada animal-teste recebe o equivalente a 20 mg de extrato liofilizado, reconstituído com 750 μ L de água destilada, sendo utilizadas triplicatas.

Os animais foram observados durante sete dias quanto aos sinais de intoxicação e às mudanças comportamentais, conforme tabela 4.

Tabela 4. Sinais de intoxicação dos animais-teste durante os bioensaios: modo de ação; cianotoxina, tempo decorrido até a morte, gênero, sintomatologia (adaptado de Calijuri *et al.* 2006).

Modo de ação	Cianotoxina	Tempo até a morte	Gênero	Sintomatologia
Hepatotoxina	Microcistinas	5 minutos a 2 horas	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix, Nostoc e Oscillatoria</i>	Diarréia, vômitos, fraqueza, palidez, e morte por hemorragia intrahepática.
	Nodularinas		<i>Nodularia</i>	
Neurotoxina	Saxitoxinas,	em geral até 20 minutos (raro até 12 horas)	<i>Oscillatoria, Anabaena, Cyndrospermopsis, Planktothrix, Lyngbya</i>	Paralisia progressiva dos músculos, respiração abdominal exagerada, convulsões, e morte por parada respiratória em poucos minutos.
	Anatoxinas		<i>Anabaena, Oscillatoria e Cyndrospermum</i>	
Citotoxina	Cilindrospermopsina	Até 7 dias	<i>Cyndrospermopsis Aphanizomenon</i>	Inibe a síntese protéica, causa necrose no fígado e rins

Pesquisa de inibidores de Acetilcolinesterase: O extrato metanólico da cepa CCIBt 3163 estudada foi submetido à cromatografia em gel de sílica, empregando-se a fase móvel CHCl₃/MeOH/H₂O 64:36:08 (v/v/v). Este ensaio foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica, com a colaboração da Dra. Maria Claudia Marx Young e Dra. Luce Maria Brandão Torres.

Após a eluição, as cromatoplasmas foram secas em corrente de ar e sobre elas foi nebulizada a enzima acetilcolinesterase (500 U), dissolvida em tampão Tris 0,05 M (pH 7,8) e estabilizada pela adição de 150 µg de albumina de soro bovino. As placas foram incubadas à 37 °C, durante 20 minutos. A seguir, as placas foram nebulizadas com solução de 1-naftil acetato em etanol e de *Fast Blue B salt* em água que, reagindo com a enzima, mudou a coloração das placas para púrpura, em 1 a 2 minutos. Se presentes, substâncias inibidoras da ação da enzima acetilcolinesterase formam manchas brancas, visíveis contra o fundo púrpura (Marston *et al.* 2002). Como padrão positivo foram utilizados 5 µL de solução-mãe do alcalóide fisostigmina, em concentração de 1 mg/mL (3,63 mM) (Kiely *et al.* 1991, modificado por Rhee *et al.* 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDOS TAXONÔMICOS

A partir da análise taxonômica das seis cepas estudadas foi possível identificar cinco táxons assim distribuídos: três subclasses, cinco ordens, cinco famílias e cinco gêneros:

I. SUBCLASSE SYNECHOCOCCOPHYCIDAE

Ordem Synechococcales

Família Synechococaceae

***Rhabdoderma sancti-pauli* CCIBt 3244**

Ordem Pseudanabaenales

Família Pseudanabaenaceae

***Leptolyngbya angustissima* CCIBt 3102**

II. SUBCLASSE OSCILLATORIOPHYCIDAE

Ordem Chroococcales

Família Chroococaceae

***Cyanosarcina* sp. CCIBt 3085**

Ordem Oscillatoriales

Família Phormidiaceae

***Phormidium formosum* CCIBt 3163 / CCIBt 3246**

III. SUBCLASSE NOSTOCHOPHYCIDAE

Ordem Nostocales

Família Rivulariaceae

***Calothrix elenkinii* CCIBt 3287**

DESCRIÇÃO TAXONÔMICA:

I. SUBCLASSE SYNECHOCOCCOPHYCIDAE

Synechococaceae

Rhabdoderma Schmidle & Lauterborn 1900.

Rhabdoderma sancti-pauli* Azevedo, Sant'Anna, Senna, Komarék & Komárková. Hoehnea 30: 286. figs. 5-7. 2003. **CCIBt 3244*

Figura 17 a-n

Colônias irregulares, formadas por numerosas células irregularmente distribuídas em envelope mucilaginoso incolor, inconspícuo, difluente, homogêneo. Células cilíndricas,

arcuadas ou sigmóides com extremidades arredondadas, 0,5-3,3 vezes mais longas que largas, 1,1-4,5 µm compr., 0,6-1,7µm diâm.; conteúdo celular verde azulado, homogêneo. Divisão celular simétrica ou assimétrica. Pseudofilamentos presentes. Reprodução por fragmentação da colônia por dissolução do envelope mucilaginoso.

Material examinado: BRASIL, SÃO PAULO: São Paulo, Reservatório Billings, III-2003. *CETESB, s.n.* (SP401471).

Distribuição geográfica no Estado de São Paulo: Lago do IAG, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (Honda & Azevedo 2004, Ferragut *et al.* 2005); como *R. sigmoidea* var. *minor* (Azevedo *et al.* 1996). Trata-se da primeira citação da espécie para o Reservatório Billings.

Comentário: O gênero *Rhabdoderma* possui em torno de 10 espécies, sendo a espécie tipo *R. lineare* Schmidle & Lauterborn. Os representantes do gênero são caracterizados por colônias irregulares; com células cilíndricas, como bastonetes com extremidades arredondadas, distribuídas num envelope mucilaginoso, fino, hialino, inconspícuo. As células se dispõem irregularmente na colônia, normalmente distantes umas das outras, podendo se arranjar em pseudofilamentos, orientadas em uma direção (enfileiradas). As espécies do gênero podem ser planctônicas, perifíticas, bentônicas ou epifíticas; que vivem em ambientes aquáticos continentais diversos; salinos, ácidos, riachos, ou lagos; em sua maioria na região temperada (Honda & Azevedo 2004). Komárek & Anagnostidis (1999) ressaltam que nestas regiões as espécies de *Rhabdoderma* ocorrem em ambientes aquáticos principalmente oligotróficos.

Rhabdoderma sancti-pauli foi recentemente descrita para a ciência (Azevedo *et al.* 1996). No estado de São Paulo sua ocorrência foi registrada em lagos com diferentes graus de trofia no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), como no Lago do IAG, um reservatório raso, oligotrófico, por Honda & Azevedo (2004), que observaram populações em material cultivado a partir de amostras naturais do mesmo lago, e por Ferragut *et al.* (2005) que registraram-na no perifíton e no plâncton; as autoras mencionam ainda, a sua ocorrência no Lago das Garças, que é um ambiente eutrófico, como *R. sigmoidea* var. *minor*.

No presente trabalho foram registradas colônias irregulares, densas, como observado por Honda & Azevedo (2004), em culturas da mesma espécie.

A variabilidade métrica registrada ao longo dos dez meses de observação (figuras 4 e 5) para as populações analisadas de *Rhabdoderma sancti-pauli* (CCIBt 3246), indica que a

cepa mantida em cultura, conserva suas medidas, especialmente o diâmetro celular, considerado constante entre os meses 4 a 10 (figura 5 B). As dimensões celulares descritas originalmente para a espécie apresentam limites máximos maiores de comprimento (2,9-5,7 μm compr.; 0,9-1,5 μm diâm. em Azevedo *et al.* 1996) que os apresentados na população deste estudo, e o maior conjunto de medidas obtidas neste estudo está em torno dos valores mínimos (2,0-2,5 μm compr.; 1,0 μm diâm.), e de diâmetro similares aos da descrição original. Avaliando o comprimento celular ao longo dos meses, a maior amplitude de variação foi observada no oitavo mês (figura 4 e 5). Assim, as condições de cultura não alteraram as medidas das células da espécie em questão, sendo então uma boa característica para separar entre as espécies do gênero.

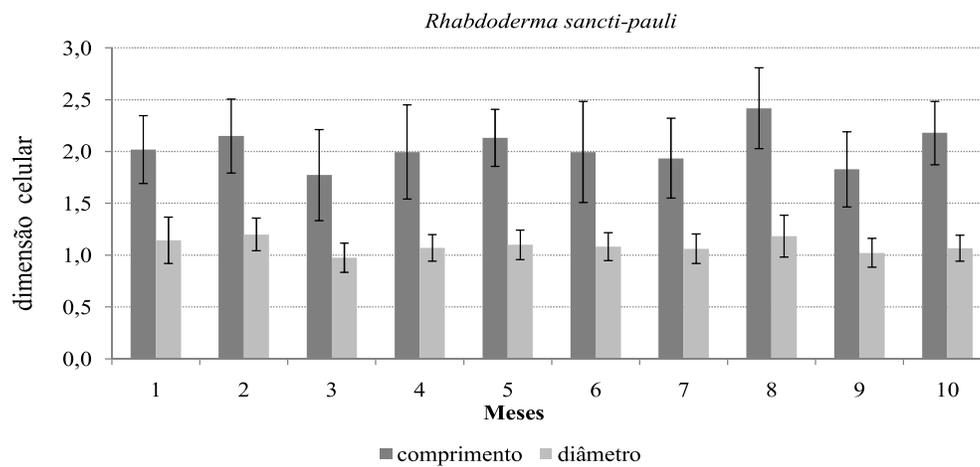


Figura 4. Médias e desvio padrão do comprimento (μm) e do diâmetro celular (μm) (n=50) de *Rhabdoderma sancti-pauli* (CCIBt 3246) ao longo dos dez meses de estudo em cultura.

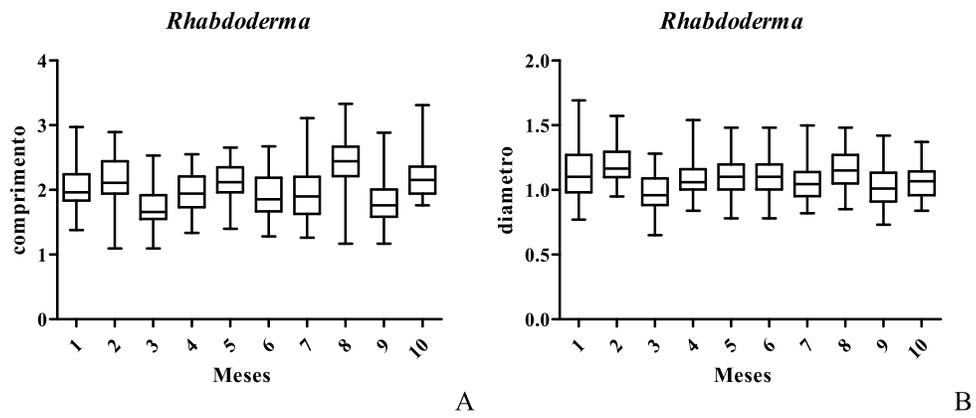


Figura 5. Gráficos de caixas esquemáticas (medianas, quartis, n=50) do comprimento celular (μm) (A) e diâmetro celular (μm) (B) de *Rhabdoderma sancti-pauli* (CCIBt 3246) ao longo dos dez meses de estudo em cultura.

Família Pseudanabaenaceae

Leptolyngbya Anagnostidis & Komárek 1988.

Leptolyngbya angustissima (West & G.S.West) Anagnostidis & Komárek, Algolog. Stud., 80: 390. 1988. **Basônimo:** *Phormidium angustissimum* West & G.S.West, J. Bot. 35: 298. 1897. **CCIBt 3102**

Figura 18 a-m

Filamentos formando biofilmes, densamente emaranhados 1,4-1,7(2,2) μm . Tricomas cilíndricos retos ou flexuosos, não atenuados, não captados, constrictos. Bainha mucilaginosa estreita, fina, firme, hialina, fortemente aderida ao tricoma. Células 1-3,5 vezes mais longas que largas, 1,5-4,3 μm compr., 1,0-1,4 μm diâm.; conteúdo celular homogêneo, verde-azulado pálido, sem grânulos; células apicais com ápices arredondados. Reprodução por fragmentação do tricoma sem a formação de células necridiais.

Material examinado: BRASIL, SÃO PAULO: Nazaré Paulista, Reservatório Atibainha, IV-1998, *M.T.P. Azevedo s.n.* (SP401468).

Distribuição geográfica no Estado de São Paulo: Lago do IAG, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (Ferragut *et al.* 2005); Pesqueiros em diferentes municípios: Embu das Artes, São Paulo e Caucaia do Alto (Rosini 2010). Trata-se da primeira citação da espécie para o Reservatório de Atibainha

Comentário: O gênero *Leptolyngbya* possui em torno de 100 espécies; é caracterizado por filamentos estreitos, longos, emaranhados; envoltos por uma bainha de mucilagem; cujas células se dividem simetricamente por fissão binária com ou sem formação de necrídeos. A reprodução ocorre por hormogônios (Sant'Anna *et al.* 2006).

As populações analisadas concordam com a descrição elaborada por Komárek & Anagnostidis (2005), embora a razão comprimento/largura das populações analisadas seja menor que os valores apresentados na literatura. A mudança de tais características métricas também pode ocorrer devido ao longo tempo de cultivo *in vitro* destes organismos, como documentado e discutido por Albertano & Kovácik (1994).

No material estudado não foi registrado a formação de grânulos nos septos, diferentemente do que foi registrado por Johansen *et al.* (2008) em material proveniente de rochas úmidas do Parque Great Smoky Mountains (EUA) e de Rosini (2010) para populações de pesqueiros na Região Metropolitana de São Paulo.

O material estudado foi isolado de amostra de água proveniente do Reservatório Atibainha, município de Nazaré Paulista, coletada em abril de 1998. Carvalho (2003) avaliou a comunidade fitoplanctônica de diferentes reservatórios do Estado de São Paulo, entre setembro de 1997 e junho de 1998, e registrou para este reservatório *Leptolyngbya* sp. Portanto, a ocorrência de espécimes do gênero já havia sido registrada no ambiente, embora não foi possível confirmar se compreende o mesmo táxon; pois não foram apresentados descrição e ilustração; embora as coletas tenham sido realizadas no mesmo ano 1998. O Reservatório Atibainha foi classificado pela autora como oligotrófico em todo o período estudado.

De acordo com Komárek & Anagnostidis (2005), *Leptolyngbya angustissima* é relatada como componente do perifíton de ambientes aquáticos continentais, amplamente distribuída nos trópicos e subtropicais; também registradas sob rochas e solos; no entanto, os autores não mencionaram as condições de trofia dos ambientes aquáticos nos quais foram registradas. No Estado de São Paulo, *L. angustissima* ocorre em ambientes oligotróficos (Reservatório Atibainha e Lago do IAG - Ferragut *et al.* 2005) e recentemente foi registrada em ambientes eutrofizados como pesqueiros por Rosini (2010).

A tabela 5 apresenta as principais características de *Leptolyngbya angustissima* e outras duas espécies do gênero registradas em ambientes oligotróficos no Estado de São Paulo.

As dimensões celulares descritas originalmente para *Leptolyngbya angustissima* possuem limites máximos 1,6-5,6 μm compr.; 0,6-1,0 μm diâm. (Komárek & Anagnostidis (2005) maiores que os apresentados para a população estudada; dentre os meses estudados, sete deles (meses de 1 a 6 e mês 9) apresentaram 50% das medidas obtidas em torno dos valores mínimos de comprimento (figura 7 A) entre 2,0-2,5 μm . Ainda, avaliando o comprimento celular, a maior amplitude de variação foi observada no sétimo e oitavo mês (figura 7), o que também refletiu nos maiores valores médios obtidos nestes meses (figura 6). A variabilidade métrica registrada ao longo dos meses de observação (figura 6) para as populações analisadas indica que a cepa mantida em cultura, conserva suas medidas tanto o comprimento quanto o diâmetro celular (figura 7 B).

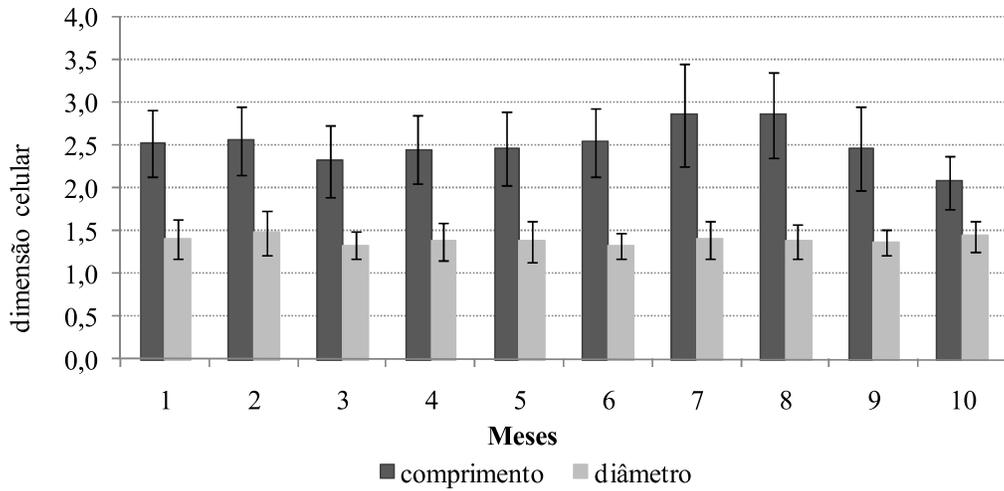


Figura 6. Média e desvio padrão do comprimento (μm) e do diâmetro celular (μm) ($n=50$) de *Leptolyngbya angustissima* (CCIBt 3102) durante os dez meses de estudo em cultura.

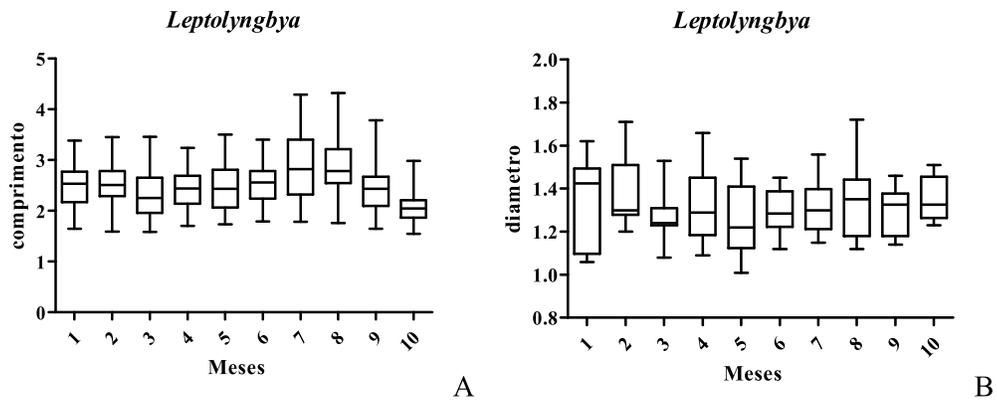


Figura 7. Gráficos de caixas esquemáticas (medianas, quartis, $n=50$) do comprimento celular (μm) (A) e diâmetro celular (μm) (B) de *Leptolyngbya angustissima* (CCIBt 3102) ao longo dos dez meses de estudo em cultura.

Tabela 5. Principais características de *Leptohyngbya angustissima* (CCIBt 3102) e demais espécies do gênero registradas em ambientes oligotróficos no Estado de São Paulo.

	<i>L. angustissima</i> (West & G.S.West) Anagnostidis & Komárek	<i>L. lagerheimii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek	<i>L. perelegans</i> (Lemmermann) Anagnostidis & Komárek
Referência	presente estudo	Branco <i>et al.</i> (1997); Ferragut <i>et al.</i> (2005)	Branco <i>et al.</i> (1997); Ferragut <i>et al.</i> (2005)
Talo	filamentos em feixes dispostos ou não desordenadamente	filamentos solitários	filamentos solitários
Tricomas	retos ou flexuosos, constrictos	flexuosos, não constrictos	curvos, não constrictos
Bainha	hialina homogênea	hialina homogênea	hialina homogênea
Ápice	não atenuado	não atenuado	não atenuado
Tamanho da célula (µm)	1,0-1,7µm diâm; 1-3,5x mais longa que larga	1,0-2,7 µm diâm; 0,5 a 3x mais longa que larga	1,4-1,5 µm diâm.; 3x mais longa que larga
Conteúdo celular	homogêneo, verde azulado pálido	homogêneo, verde claro	homogêneo, verde claro
Célula apical	cônico arredondada	cônico arredondada	cônico arredondada
Septos	sem grânulos	sem grânulos	com um grânulo de cada lado
Habitat	perifítica	epífita e perifítica	planctônica e perifítica.
Distribuição geográfica	Reservatório Atibainha	Ilha do Cardoso, Cananéia; Lago do IAG	Ilha do Cardoso, Cananéia; Lago do IAG

II. SUBCLASSE OSCILLATORIOPHYCIDAE

Chroococaceae

Cyanosarcina Kováčik 1988.

***Cyanosarcina* sp.**

CCIBt 3085

Figuras 19 a-f; 20 a-k

Colônias jovens esféricas, posteriormente irregulares formando pacotes de células densamente agregados. Células esféricas a subesféricas, 3,0-5,9 µm diâm.; após divisão celular agrupadas em colônias tridimensionais facilmente dissociáveis, conteúdo celular homogêneo, verde-azulado; células-filhas, 1,9-3,0 µm diâm. Reprodução por liberação de células ou grupo de células.

Material examinado: BRASIL: SÃO PAULO, São Paulo, Reservatório Guarapiranga, IV-1997, *CETESB s.n.* (SP401467). Trata-se da primeira citação da espécie para o Reservatório Guarapiranga.

Comentário: Em Komárek & Anagnostidis (1999) o gênero *Cyanosarcina* pertence à família Chroococaceae, caracterizada pela divisão celular em três ou mais planos; as células se dividem irregularmente, não atingem o tamanho original antes da próxima divisão, formando colônias arranjadas em pacotes tridimensionais; porém as células permanecem sempre em contato uma com a outra; sendo a espécie tipo *Cyanosarcina fontana* Kováčik, descrita de material perifítico, original de região temperada. Em Hoffman *et al.* (2005) *Cyanosarcina* assim como outras cianobactérias cocóides representantes de Chroococcales *sensu lato* passaram a subclasse Oscillatoriophycidae, por possuírem tilacóides com arranjos radiais.

O gênero possui de oito a dez espécies, que se desenvolvem no metafiton e perifiton, em ambientes subaéreos, pântanos e fontes termais (Komárek & Hauer 2011). Apenas duas espécies são citadas para a flora paulista: *Cyanosarcina* sp. foi a primeira citação do gênero para o Brasil, descrito a partir de material edáfico coletado no Jardim Botânico de São Paulo por Azevedo (1991). Neste trabalho a autora comentou a semelhança das populações analisadas com representantes de *Pseudocapsa* (colônias que formam pacotes de células densamente agregadas, sem a produção de nanócitos, baeócitos), no entanto, como após os dois primeiros planos de divisão, as colônias não apresentaram arranjo radial, a autora identificou como *Cyanosarcina* sp. Sant'Anna *et al.* (1995) citaram para o Brasil *Cyanosarcina thalassia* Anagnostidis & Pantazidou, encontrada em material epilítico, coletada na região supralitorânea em praias de Itanhaém, São Paulo.

Comparando a população estudada com as demais espécies do gênero, *Cyanosarcina* sp. assemelha-se à *Cyanosarcina* sp. observada por Azevedo (1991) e à *Cyanosarcina huebeliorum* Komárek & Anagnostidis, pois possuem dimensões celulares, cor, bainha, e forma da colônia semelhantes (tabela 6); porém estes três táxons diferem entre si pelo ambiente em que foram registrados. *Cyanosarcina* sp. registrada por Azevedo (1991) foi coletada entre 5-20 cm de profundidade no solo do Jardim Botânico de São Paulo; *Cyanosarcina huebeliorum* Komárek & Anagnostidis foi mencionada de material em cultura em uma universidade alemã, de amostras proveniente de material subaéreo, cuja localidade não foi definida (Komárek & Anagnostidis 1999); e, as populações estudadas são provenientes de amostras do reservatório Guarapiranga, um ambiente classificado como eutrófico desde a década de 70 (CETESB 2005).

Cyanosarcina sp. foi isolada de amostras de água do reservatório Guarapiranga, entretanto, nos trabalhos lá realizados (ex. Beyruth 1996, Rodrigues 2008, Sant'Anna *et al.* 2007) nenhum táxon deste gênero foi mencionado. Honda & Azevedo (2004) discutiram sobre organismos pertencentes à flora potencial. Em amostras da natureza, organismos presentes em baixas densidades (espécies raras) podem não ser registrados durante as análises taxonômicas, mas a partir do momento em que são inoculados em meio de cultura, em condições controladas, estas espécies podem vir a se desenvolver, caracterizando um conjunto de organismos chamados de microbiota potencial do ambiente. Portanto, em acordo com os autores, *Cyanosarcina* sp. poderia ser considerada então, um dos organismos da microbiota potencial para o reservatório Guarapiranga.

A variabilidade métrica registrada ao longo dos dez meses de observação (figuras 8 e 9) para as populações de *Cyanosarcina* sp. indica que a cepa mantida em cultura, conservou suas medidas. Alguns limites máximos alcançaram até 5,0 μm de diâm.; o maior conjunto de medidas foi registrada entre 3,0-4,0 μm diâm. (figura 9).

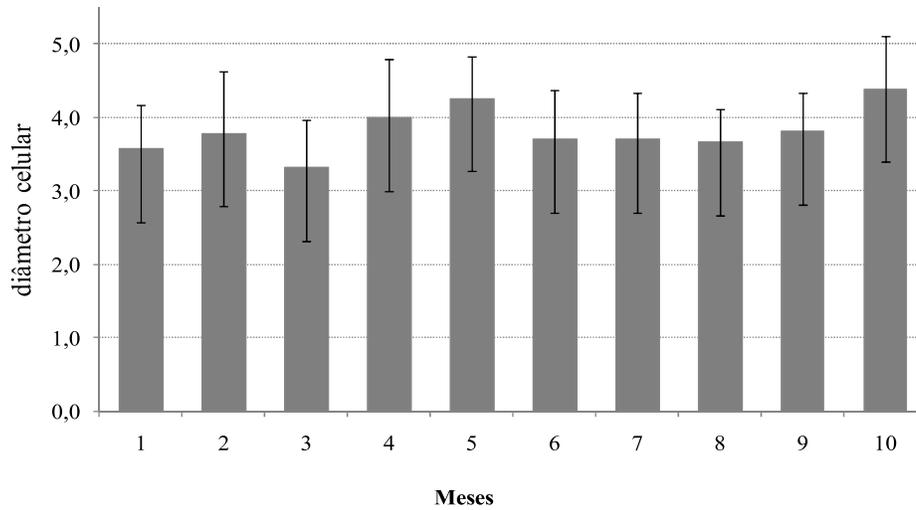


Figura 8. Média e desvio padrão do diâmetro celular (μm) ($n=50$) de *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3085) durante os dez meses de estudo em cultura.

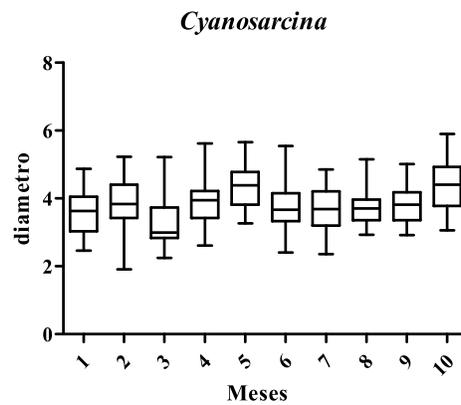


Figura 9. Gráfico de caixas esquemáticas (medianas, quartis, $n=50$) do diâmetro celular (μm) de *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3085) ao longo dos dez meses de estudo em cultura.

Tabela 6. Principais características de *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3085) e espécies relacionadas no presente trabalho.

	<i>Cyanosarcina</i> sp.	<i>C. huebeliorum</i> Komárek & Anagnostidis	<i>Cyanosarcina</i> sp.	<i>C. thalassia</i> Anagnostidis & Pantazidou
Referência	presente estudo	Komárek & Anagnostidis (1999)	Azevedo (1991)	Sant'Anna <i>et al.</i> (1995)
Colônia	formam pacotes de células agregadas irregularmente	formam pacotes de células agregadas irregularmente	tridimensionais subglobosas, gelatinosas, não polarizadas	formam pacotes de células agregadas irregularmente
Bainha	Incolor	Incolor	incolor	incolor
Forma da célula	subesféricas, irregulares após divisão	esféricas a subesféricas	subesféricas ou irregulares após divisão	esféricas a hemisféricas
Diâmetro celular (µm)	3,0-5,9	3,5-5,4	3,5-5,5	3,0-6,0
Conteúdo celular	homogêneo ou granuloso	Granuloso	homogêneo ou granuloso	-
Habitat	perifítico/plancônico água doce	incerta, cultivo <i>in vitro</i>	edáfico	epilítica, marinha bentônica,

Phormidiaceae

Phormidium Kützing ex Gomont 1892.

Phormidium formosum (Bory ex Gomont) Anagnostidis & Komárek Algolog. Stud., 40: 405. 1988. **Basônimo:** *Oscillatoria formosa* Bory ex Gomont, Ann. Sci. Nat. Bot., 16: 230. 1892.

CCIBt 3163

Figura 21 a-n

Tricomas dispostos paralelamente em feixes, cilíndricos, retos. Tricomas curvos apenas nas duas últimas células, levemente atenuado em direção ao ápice, levemente constrictos, com grânulos nos septos. Células subquadráticas, 0,5-1 vez mais longa que larga, (1,7) 2,5-5,0 (6,0) µm compr., 2,0-3,8 µm diâm. Célula apical cônico-arredondada. Conteúdo celular verde azulado, finamente granular. Motilidade intensa. Reprodução por fragmentação do tricoma sem formação de células necridiais.

Material examinado: BRASIL, SÃO PAULO: Ribeirão Preto, Lago de criação de peixes, I-2000, *C.L.Sant'Anna s.n.* (SP401469).

Phormidium formosum (Bory ex Gomont) Anagnostidis & Komárek Algolog. Stud., 40: 405. 1988. **Basônimo:** *Oscillatoria formosa* Bory ex Gomont, Ann. Sci. Nat. Bot., 16: 230. 1892.

CCIBt 3246

Figura 22 a-r

Tricomas dispostos paralelamente em feixes, cilíndricos, retos. Tricomas curvos apenas nas duas últimas células, levemente atenuado em direção ao ápice, levemente constrictos. Células subquadráticas 0,4-1 vez mais longa que larga, (1,6) 2,0-4,2 (6,0) µm compr., 2,0-4,4 (5,0) µm diâm. Célula apical cônico-arredondada. Conteúdo celular verde oliva, homogêneo. Motilidade intensa. Reprodução por fragmentação do tricoma por formações de células necridiais.

Material examinado: BRASIL, SÃO PAULO: São Paulo, Instituto de Botânica, Lago das Garças, IX-2003, *C.L.Sant'Anna s.n.* (SP401470).

Distribuição geográfica no Estado de São Paulo: como *Oscillatoria formosa* Bory ex Gomont (Sant'Anna & Azevedo 1995). Trata-se da primeira citação da espécie para o Lago das Garças.

Comentário: O gênero compreende cerca de 200 espécies com diversa distribuição geográfica. São organismos filamentosos, não ramificados, geralmente agregados, raramente solitários. Tricomas retos ou ondulados, com células cilíndricas ou em forma de barril, mais

ou menos isodiamétricas ou ligeiramente mais curtas que largas. Os tricomas podem ser constrictos ou não, sem aerotopos, e o conteúdo celular granuloso ou homogêneo. Os ápices podem ser atenuados, com ou sem caliptra (Komárek & Anagnostidis 2005).

Ambas as cepas foram identificadas como *Phormidium formosum* e para a discussão, a cepa CCIBt 3163 foi denominada como população A e a cepa CCIBt 3246 como população B.

A população A apresentou tricomas levemente ou não constrictos (figura 21 d-g), coloração verde azulado intenso, grânulos nos septos e arranjo macroscópico regular formando círculos na parede dos frascos, em contato com a superfície da água, mas não submerso. Enquanto a população B apresentou tricomas constrictos, coloração verde oliva, conteúdo celular homogêneo e arranjo macroscópico como um biofilme submerso na água. Ambas as populações apresentaram tricomas longos, levemente atenuados em direção ao ápice (figuras 21 e 22) e motilidade intensa.

Estas características aproximam morfologicamente *Phormidium chalybeum* (Mertens ex Gomont) Anagnostidis & Komárek de *Phormidium formosum*, diferindo pela constrição nos septos e dimensões celulares. *Phormidium chalybeum* possui células de 0,3-0,5 vezes mais longa que larga; com 6,0-8,5 µm diâm; enquanto as células de *P. formosum* são até 2,0 vezes mais longa que larga; com 3,8- 6,0 µm diâm. O diâmetro dos tricomas da população B sempre foi menor (figura 10A), não atingindo as medidas mínimas de *P. chalybeum* (Komárek & Anagnostidis 2005). Dessa forma as medidas das populações das duas cepas se sobrepõem de forma correspondente as medidas de *P. formosum* de acordo com a descrição mais recente de Komárek & Anagnostidis (2005) e McGregor (2007).

Phormidium formosum já foi registrado em diferentes ambientes aquáticos em várias regiões do país: Martins (2010) registrou tricomas solitários da espécie no plâncton e no metafíton de diferentes lagoas da região sul de Porto Alegre, RS; Malone (2010) registrou *P. formosum* nas lagoas salinas do Pantanal em Corumbá, MS, e cita a ocorrência da espécie em Cáceres, MT; Rosini (2010) encontrou esta espécie no plâncton de amostras provenientes de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo.

Phormidium formosum foi citado pela primeira vez para São Paulo por Sant'Anna & Azevedo (1995). As autoras mencionaram que esta espécie apresenta distribuição cosmopolita, porém não foi citado para o Lago das Garças (Sant'Anna *et al.* 1989, Tucci *et al.* 2006). Komárek & Anagnostidis (2005) mencionaram a ocorrência da espécie como

perifítica e bentônica de diferentes ecossistemas aquáticos lênticos, tais como lagos, fontes termais, águas salinas e ambientes poluídos por esgoto. No entanto, formam massas que podem se desprender do substrato e permanecerem livres na coluna d'água (como metafiton), como foi discutido por McGregor (2007).

As populações observadas neste estudo foram isoladas de ambientes aquáticos rasos e eutrofizados: pesqueiros (Mercante *et al.* 2006; Rosini 2010) e Lago das Garças (Tucci & Sant'Anna 2003).

As dimensões celulares de *Phormidium formosum* descritas originalmente são 2,0-5,6 µm compr.; 3,8-6,0 µm diâm. A população A apresentou maior número de células isodiamétricas, com tricomas mais finos (2,5-5,0 µm compr., 2,0-3,8 µm diâm.). Enquanto a população B, apresentou células mais largas que longas e tricomas mais largos (2,0-4,2 (6,0) µm compr., 2,0-4,4 (5,0) µm diâm. (figuras 10 e 11).

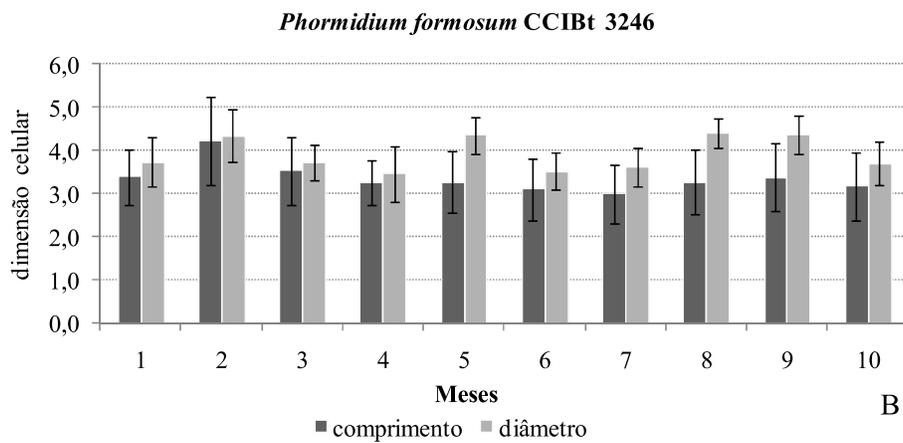
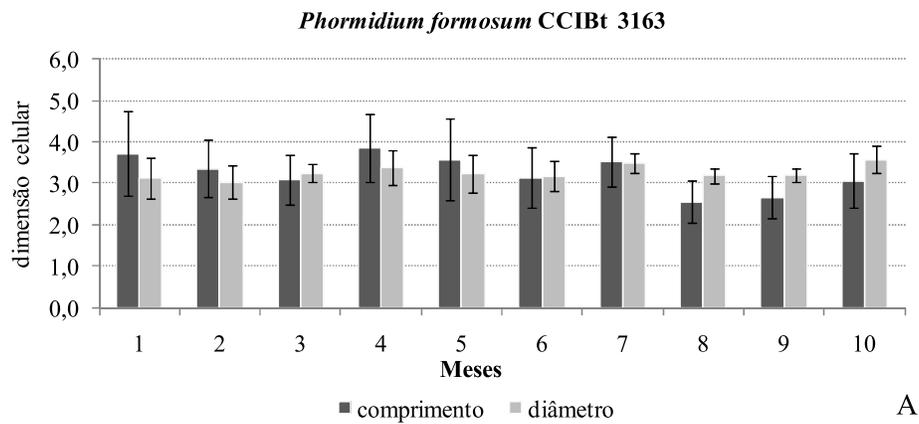


Figura 10. Média e desvio padrão do comprimento (μm) e do diâmetro celular (μm) (n=50) de das cepas de *Phormidium formosum* (CCIBt 3163) A e (CCIBt 3246) B ao longo dos dez meses de estudo em cultura.

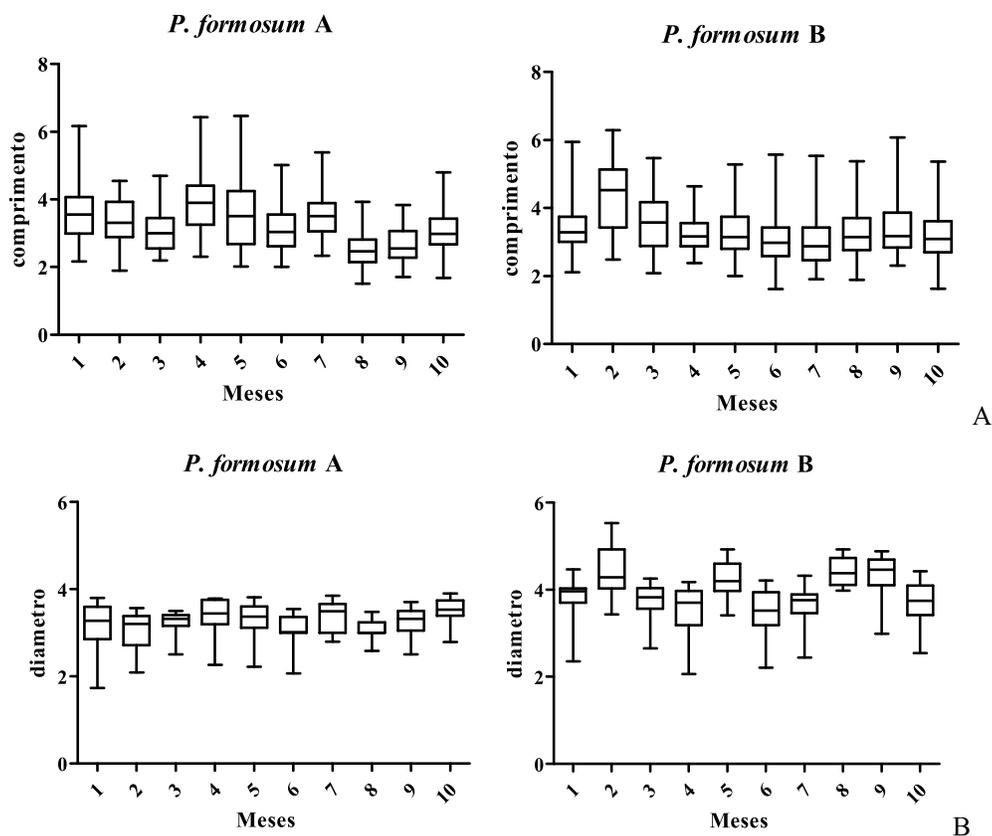


Figura 11. Gráficos de caixas esquemáticas (medianas, quartis, n=50) do comprimento celular (μm) (A) e diâmetro celular (μm) (B) das cepas de *Phormidium formosum* (CCIBt 3163 A e CCIBt 3246 B) ao longo dos dez meses de estudo em cultura.

III. SUBCLASSE NOSTOCHOPHYCIDAE

Rivulariaceae

Calothrix C.Agardh ex Bornet & Flahault 1886

Calothrix elenkinii Kossinskaja Not. Syst. Crypt. Inst. Horti Bot. Petropol., 3:11, 1924.

CCIBt 3287

Figuras 23 a-m; 24 a-h

Tricomas heteropolares freqüentemente agregados. Bainha mucilagínosa firme, homogênea, incolor, aberta no ápice, sem formação de pêlo terminal. Tricomas intumescidos na base, curvos, constrictos. Células subquadráticas, em forma de barril, 0,5-2,0 vezes mais longa que larga, na base; (2,9) 3,5-7,8 μm compr.; (3,5) 4,0-6,0 (7,5) μm diâm. Na região mediana do tricoma, células cilíndricas 0,5-1,5 (2,5) mais longa que larga, 3,0-9,0 μm compr., 2,5-6,0 μm diâm. Conteúdo celular granuloso, verde oliva. Heterocitos basais cônicos-arredondado a subcônicos, raramente hemisféricos, 0,8-2,0 (2,3) vezes mais longo que largo; (3,0) 4,0-6,0 (7,0) μm compr., (3,0) 3,8-6,0 μm diâm.

Material examinado: BRASIL, SÃO PAULO: Pindamonhangaba, Instituto de Pesca, viveiro de piscicultura experimental, II-2009, *C.T.J. Mercante s.n.* (SP401472).

Distribuição geográfica no Estado de São Paulo: primeira citação para o estado.

Comentários: O gênero *Calothrix* possui cerca de 60 espécies, é caracterizado por tricomas heteropolares, em que a porção basal, heterocitada, difere da porção apical, frequentemente atenuada, às vezes com formação de pêlo hialino. A porção basal do tricoma geralmente está associada ao substrato. A bainha está sempre presente, firme, homogênea ou lamelada, incolor ou castanha a amarelada. Os heterocitos podem ser esféricos ou hemisféricos e ocasionalmente ocorrem heterocitos intercalares cilíndricos. Apenas em algumas espécies ocorre formação de acinetos (Sant'Anna *et al.* 2006).

A espécie que mais se aproxima da população estudada é *Calothrix elenkinii* especialmente em relação às dimensões celulares, morfologia do tricoma e características da bainha: incolor, não lamelada, aberta na porção apical, sem formação de pêlo hialino (tabela 7). Assim, o material analisado concorda com a descrição apresentada em Desikachary (1959). Porém, o autor não menciona a forma dos heterocitos, mas os ilustra como hemisféricos (figura 24-h) enquanto que na população estudada os heterocitos são cônicos a subcônicos.

A maioria das espécies de *Calothrix* são perifíticas (Sant'Anna *et al.* 2006) e se desenvolvem sobre diferentes substratos naturais ou artificiais. Segundo Desikachary (1959) *C. elenkinii* ocorre sobre rochas submersas. O material estudado foi isolado de amostra de água proveniente de um viveiro de aquicultura, onde comumente ocorrem algas e cianobactérias perifíticas. A população estudada proveniente de ambiente de água doce apresenta base intumescida, com até 10 µm diâm. Outras seis espécies de *Calothrix* apresentam as mesmas características, no entanto apenas *C. elenkinii* apresenta bainha aberta no ápice. A tabela 7 apresenta as principais características dessas espécies.

Poucos são os trabalhos que citam *C. elenkinii*: na Austrália (Day *et al.* 1995); Romênia (Carauş 2002) e Espanha (Mateo *et al.* 2006). Enquanto Komároky & Padisák (1999) relataram *C. elenkinii* em lista de espécies que ocorrem nos solos do Parque Nacional KinKunság, Hungria.

A população estudada apresentou ampla variação morfológica (figuras 23 e 24) e métrica (figuras 12 e 13) ao longo do período de estudo em cultura. Principalmente no que diz

respeito às porções basais dos tricomas, a forma dos heterocitos e a constrição nos septos (figuras 23 e 24).

As dimensões celulares do comprimento das células vegetativas e dos heterocitos descritas por Desikachary (1959) para *Calothrix elenkinii* não são propriamente mencionadas. As medidas de diâmetro são, para célula vegetativa, de 6,0-9,0 μm (base do tricoma); 4,5-6,0 μm (meio do tricoma) e para o heterocito, de 4,5-7,0 μm . A variabilidade métrica do diâmetro das células vegetativas apresentou a maior parte do conjunto de medidas entre 4,0-6,0 μm (figura 13), que correspondem às medidas da espécie descrita em Desikachary (1959). As medidas médias do diâmetro dos heterocitos apresentaram limites mínimos ainda menores que a descrição original 3,8-4,8 μm (figura 12B).

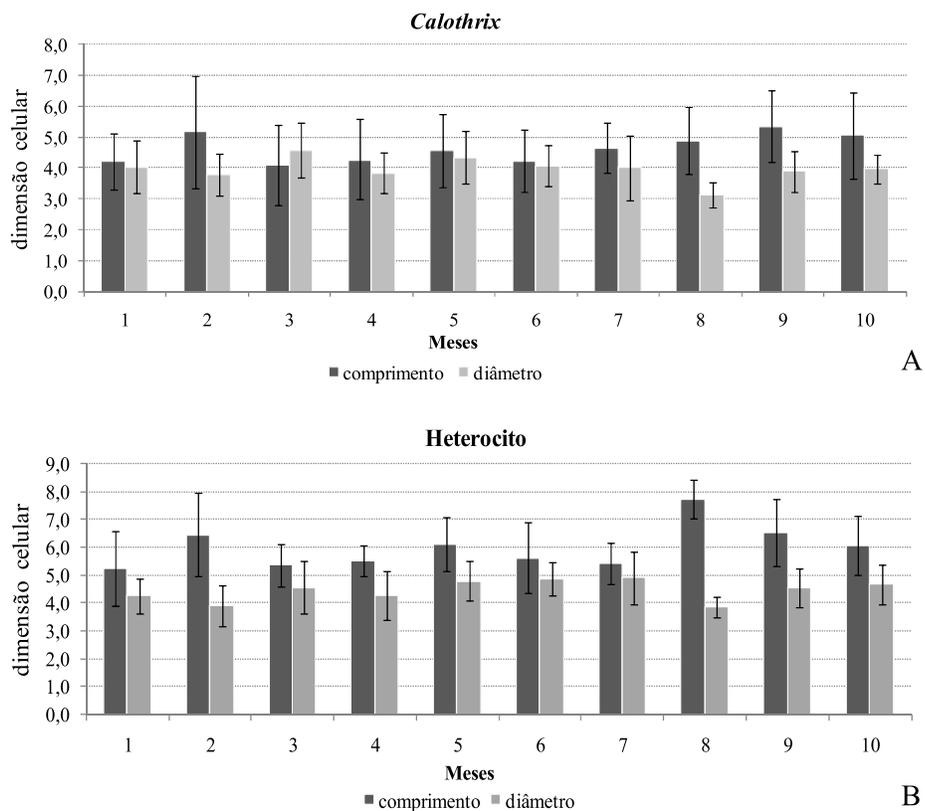


Figura 12. Média e desvio padrão do comprimento (μm) e do diâmetro da célula vegetativa (A) e do heterocito (μm) (B) de *Calothrix elenkinii* (CCIBt 3287) durante os dez meses de estudo em cultura (n=50).

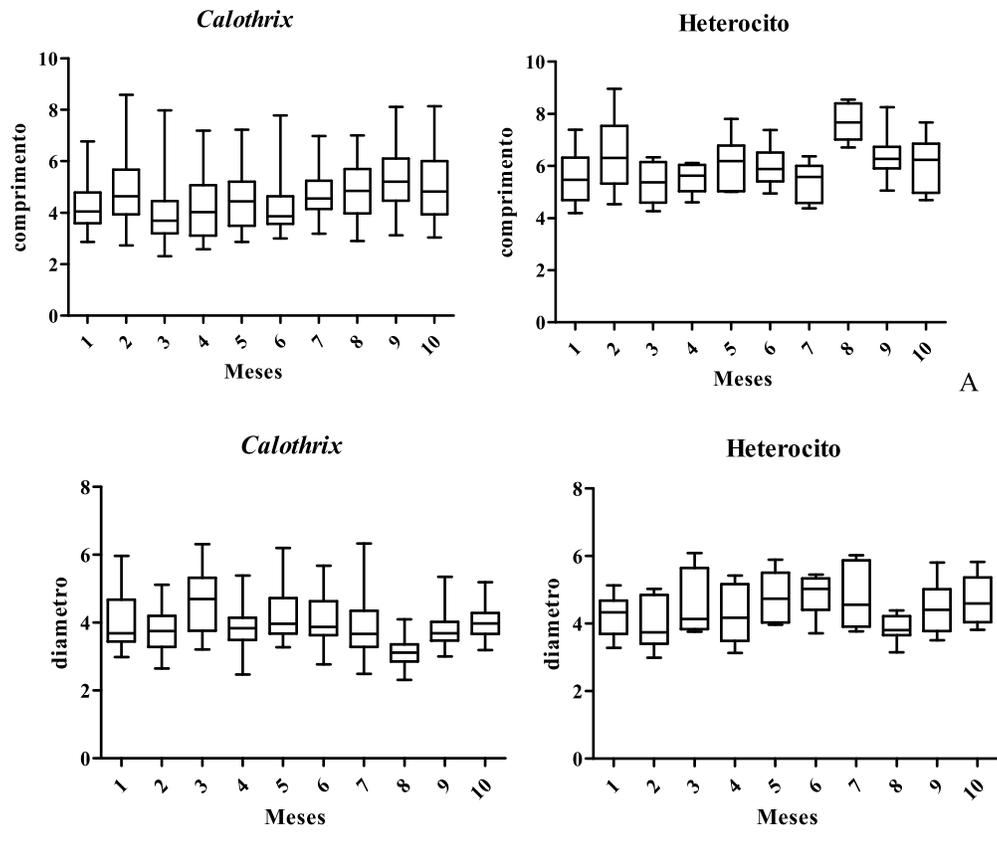


Figura 13. Gráficos de caixas esquemáticas (medianas, quartis, n=50) do comprimento da célula vegetativa e do heterocito (μm) (A) e diâmetro da célula vegetativa e do heterocito (μm) (B) das cepas de *Calothrix elenkinii* (CCIBt 3287) ao longo dos dez meses de estudo em cultura.

Tabela 7. Principais características entre as espécies de *Calothrix* de água doce, com base intumescida (até 10 µm diâm.), relacionadas no presente trabalho.

	<i>C. elenkinii</i> Kossinkaja	<i>C. braunii</i> Bornet & Flahault	<i>C. brevissima</i> G.S. West	<i>C. clavata</i> G.S. West	<i>C. gardneri</i> De Toni	<i>C. gloecola</i> Skuja	<i>C. wembaerensis</i> Hieronymus & Schmidle
Referência	Presente estudo	Desikachary (1959)	Desikachary (1959)	Desikachary (1959)	Desikachary (1959)	Desikachary (1959)	Desikachary (1959)
Talo	em tufos	em feixes	Solitário	Solitário	em tufos	Solitário	Ramificado
Construção	Presente	Presente	Ausente	Pouco	Presente	-	Presente
Atenuação	Presente	Presente	Pouco	Não	Presente	Presente	Não
Pêlo terminal	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Ausente
Bainha lamelada	não, aberta no ápice	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Forma do heterocito	cônico a subcônico	Hemisférico	Hemisférico-subesférico	Hemisférico	Hemisférico	Hemisférico, subovóide	Hemisféricos
Ocorrência	rochas submersas	campos de arroz	epifítico em outras algas	-	sobre substrato artificial úmido	mucilagem de outras algas	mucilagem de outras algas

4.2 PESQUISA QUÍMICA DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS

Para dar início à pesquisa química de substâncias ativas, o peso das biomassas liofilizadas a partir de 10 L de cada cepa cultivada, o solvente utilizado, o peso de seus extratos e os seus respectivos rendimentos estão descritos na tabela 8.

Tabela 8. Pesos das biomassas liofilizadas de cada cepa, dos extratos e seus respectivos rendimentos.

Cepa	Biomassa liofilizada (g)		Solvente	Extrato (mg)	Rendimento
<i>Cyanosarcina</i> sp. CCIBt 3085	0,3683g	*	MeoH	0,0245	-
		0,3683	Ac. Acético	0,1490	40,46%
<i>Leptolyngbya</i> <i>angustissima</i> CCIBt 3102	0,5360g	0,2607	MeoH	0,0713	27,35%
		0,1136	Ac. Acético	0,0695	61,18%
<i>Phormidium</i> <i>formosum</i> CCIBt 3163	0,7690g	0,3594	MeoH	0,0696	19,37%
		0,1740	Ac. Acético	0,0626	35,98%
<i>Rhabdoderma</i> <i>sancti pauli</i> CCIBt 3244	3,7164g	1,0056	MeoH	0,3106	30,89%
		1,0049	Ac. Acético	0,5133	51,08%
<i>Phormidium</i> <i>formosum</i> CCIBt 3246	0,7582g	0,3299	MeoH	0,0465	14,10%
		0,2503	Ac. Acético	0,1168	46,66%
<i>Calothrix</i> <i>elenkinii</i> CCIBt 3287	0,8044g	0,3282	MeoH	0,0790	24,07%
		0,2747	Ac. Acético	0,0948	34,51%

* = a biomassa utilizada para esta extração foi obtida diretamente do filtro utilizado.

Os testes cromatográficos para pesquisa da presença de cianotoxinas apresentaram resultado positivo para o extrato ácido da cepa *Phormidium formosum* CCIBt 3163. Este é o primeiro relato de produção de toxina do grupo das saxitoxinas por uma cepa de *Phormidium formosum* (figura 14).

As saxitoxinas são produzidas por representantes de gêneros *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix* e *Lyngbya* (Carvalho 2006, Van Apeldoorn *et al.* 2007). No Brasil a produção destas toxinas já foi documentada para cepas de *Planktothrix* cf. *reilingii*, *Raphidiopsis brookii*, (Sant'Anna & Azevedo 2008) para florações de *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon issatschenkoi* (*Cuspidothrix issatschenkoi*) e por distintas populações de *Cylindrospermopsis raciborskii* nas regiões Nordeste e Sul do país (Lagos *et al.* 1999, Molica *et al.* 2002).



Figura 14. Cromatograma em gel de sílica do extrato em ácido acético da cepa CCIBT 3163 desenvolvida na fase móvel clorofórmio/metanol/água 64:36:8 (v/v/v), derivatizada com peróxido de hidrogênio 1% e observada e documentada sob radiação UV 365 nm. As setas indicam as manchas fluorescentes que comprovam a presença de saxitoxinas.

Estudos anteriores realizados por Lilleheil *et al.* (1997) na cepa *Oscillatoria formosa* NIVA-CYA 92 (atualmente *Phormidium formosum*) mostraram sua letalidade, por testes via oral e intraperitonal em camundongos e que a toxina presente seria a homoanatoxina-a, que bloqueia a indução nervosa por ligar-se aos receptores da acetilcolina.

Posteriormente, Baker *et al.* (2001) constataram a toxicidade, por testes em camundongo, de floração de *Phormidium* aff. *formosum*, cujas amostras foram coletadas em reservatório de abastecimento no sul da Austrália. Embora os autores não tenham identificado a toxina como nenhuma das cianotoxinas conhecidas, nem a caracterizaram quimicamente, realizaram testes preliminares que indicaram sua baixa solubilidade em água e em solventes orgânicos.

Os testes cromatográficos para pesquisa de microcistinas e saxitoxinas apresentaram resultados negativos para os extratos de todas as demais cepas estudadas.

Para a pesquisa de β -metil-amino-alanina foi analisado apenas o BMAA livre nos extratos em ácido acético de todas as cepas cultivadas, sendo que a figura 15 mostra que as cepas CCIBt 3085, 3224, 3246 e 3287 continham traços deste aminoácido.

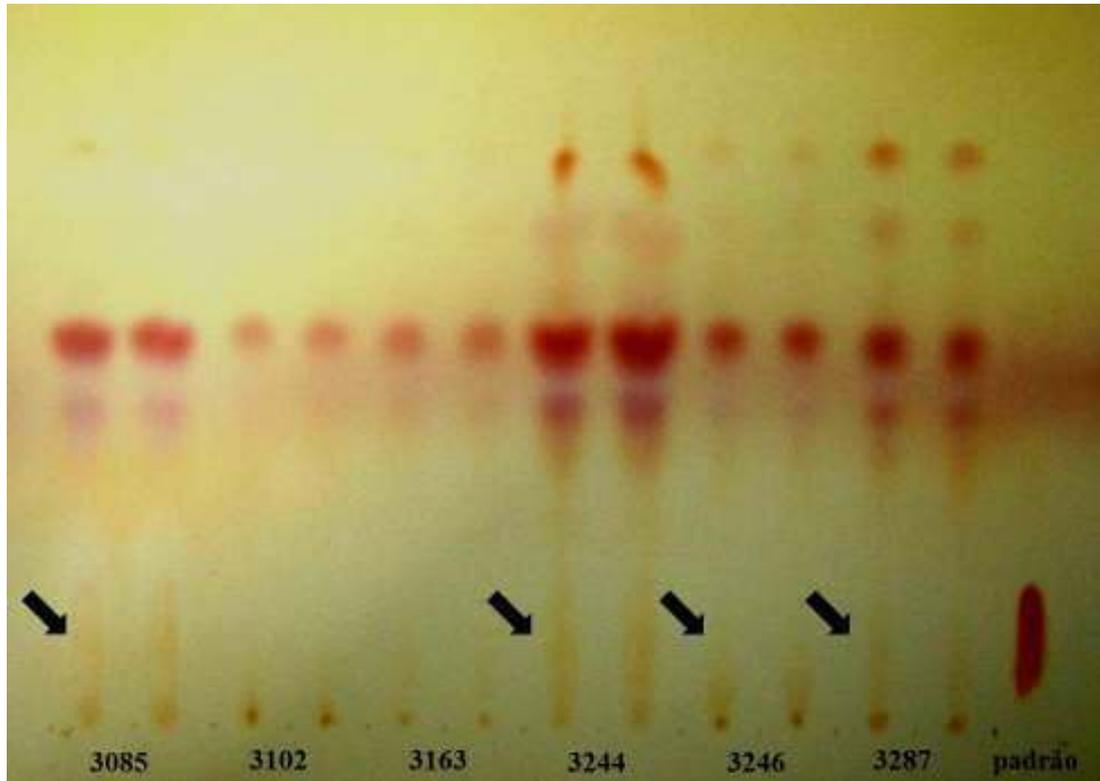


Figura 15. Cromatografia em placa de gel de sílica; fase móvel: butanol:ácido acético:água 4:1:1, v/v/v; derivatizante: ninidrina. As setas indicam as manchas cujo R_f 0,11 coincide com o do padrão de BMAA.

O teste revelou que quatro das seis cepas apresentaram resultados positivos (tabela 9) para a presença de BMAA livre. Estudos posteriores serão realizados para a pesquisa de BMAA associado às proteínas.

Tabela 9. Resultados positivos de BMAA livre encontrado em cepas no presente estudo.

Cepa	Ambiente	Habitat
<i>Cyanosarcina</i> sp. CCIBt 3085	Represa Guarapiranga	Perifítico
<i>Rhabdoderma sancti-pauli</i> CCIBt 3244	Represa Billings	Planctônico
<i>Phormidium formosum</i> CCIBt 3246	Lago das Garças	Perifítico
<i>Calothrix elenkinii</i> CCIBt 3287	Tanque de Aquicultura	Perifítico

Cox *et al.* (2005) investigaram a produção de BMAA em diversas cepas de cianobactérias: nas marinhas, nas de água doce, naquelas que vivem em simbiose, e nas de vida livre. Dentre as cianobactérias simbiontes 73% produziram BMAA; enquanto as de vida livre 95% delas também produziram. Muitas destas cepas não estavam identificadas em nível específico, porém os autores também estudaram cepas de *Phormidium* e *Calothrix*, que apresentaram resultados positivos. Não há na literatura dados relativos à produção de BMAA por cepas de *Cyanosarcina* e de *Rhabdoderma*, sendo este o primeiro relato da ocorrência deste aminoácido nestes gêneros.

4.3 PESQUISA BIOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS

Para a realização dos bioensaios, de cada extrato foram separados 60 mg para administração intra-peritoneal em camundongos, com exceção do extrato metanólico de *Cyanosarsina* sp. CCIBt3085, que não foi obtido em quantidade suficiente (tabela 10). Os resultados dos testes toxicológicos realizados com as amostras estão na tabela 11.

Tabela 10. Resultados dos bioensaios realizados em camundongos (n=3) para cianotoxinas: solventes (natureza dos extratos), resultados dos bioensaios (+ : positivo, - negativo) e variação dos pesos dos animais (Peso inicial: $p_{inicial}$; peso final: p_{final} e diferença do peso inicial e final: Δp).

Cepa	Solvente	Camundongo	Resultado	Peso		
				$p_{inicial}$ (g)	p_{final} (g)	Δp (g)
<i>Cyanosarcina</i> sp. CCIBt 3085	Ac. Acético	I	-	20,5	26,4	5,8
		II	-	21,0	26,6	5,6
		III	-	21,7	24,8	3,1
<i>Leptolyngbya</i> <i>angustissima</i> CCIBt 3102	Ac. Acético	I	-	19,9	24,1	4,2
		II	-	20,5	25,8	5,3
		III	-	20,7	25,5	4,8
	MeoH	I	-	21,4	26,8	5,4
		II	-	19,7	26,7	7,0
		III	-	21,3	26,0	4,7
<i>Phormidium</i> <i>formosum</i> CCIBt 3163	Ac. Acético	I	+	21,1	-	-
		II	+	19,9	-	-
		III	+	20,5	-	-
	MeoH	I	+	21,7	-	-
		II	+	20,7	-	-
		III	+	19,8	-	-
<i>Rhabdoderma sancti</i> <i>pauli</i> CCIBt 3244	Ac. Acético	I	-	19,3	22,9	3,6
		II	-	20,6	26,5	5,8
		III	-	19,5	25,3	5,8
	MeoH	I	-	20,0	25,2	5,2
		II	-	19,6	25,6	6,0
		III	-	19,1	22,7	3,6
<i>Phormidium</i> <i>formosum</i> CCIBt 3246	Ac. Acético	I	-	21,7	24,2	2,5
		II	-	21,5	22,0	0,5
		III	-	21,1	26,1	5,0
	MeoH	I	-	21,3	24,6	3,3
		II	-	21,5	26,8	5,3
		III	-	20,5	24,7	4,2
<i>Calothrix elenkinii</i> CCIBt 3287	Ac. Acético	I	-	21,3	26,5	5,2
		II	-	21,7	23,6	1,9
		III	-	21,2	28,5	7,3
	MeoH	I	-	21,1	25,4	4,3
		II	-	21,7	23,6	1,9
		III	-	21,2	28,5	7,3

Os sinais de intoxicação apresentados pelos animais, no período pós-administração dos extratos, foram observados e anotados tendo-se como referência os indicadores (parâmetros) escolhidos por Brito (1994). Esses sinais foram compilados na tabela 11.

Os resultados mostram que apenas os extratos de *Phormidium formosum* CCIBT 3163, por administração i.p., causaram intoxicação aguda nos animais, levando-os a óbito. Portanto a toxicidade de saxitoxina no ensaio pelo extrato ácido de *Phormidium formosum* CCIBT 3163 foi confirmada. O extrato metanólico também apresentou toxicidade, e alguns sinais de intoxicação diferenciados estão detalhados na tabela 11.

Tabela 11. Sinais de intoxicação observados nos animais-teste (n=3) que receberam extratos (em ácido acético e metanólico) da cepa *Phormidium formosum* CCIBT 3163.

Solvente	Animal-teste	Sinais observados	Tempo após aplicação
Ác. acético	I	Tremores, ofegante, convulsão	morte pós 2 min.
	II	Tremores, ofegante; convulsão	morte pós 1 min.
	III	Tremores, ofegante; convulsão	morte pós 2 min.
MeOH	I	Dificuldade de locomoção (contorção) tremores, convulsão	morte pós 6 min.
	II	Tremores, convulsão, cauda em strabe	morte pós 2 min.
	III	Dificuldade de locomoção (cambaleante); tremores, convulsão, cauda em strabe	morte pós 4 min.

Segundo Brito (1994), esses sinais indicam que ambos os extratos de *Phormidium formosum* CCIBT 3163 tiveram ação sobre o sistema nervoso central, tais como as cianotoxinas neurotóxicas, que bloqueiam a transmissão dos impulsos nervosos, levando o animal a óbito em minutos por parada respiratória (Carvalho *et al.* 2006). Entretanto, essas neurotoxinas (saxitoxinas e anatoxinas) são alcalóides bastante polares e são todos extraídos pela solução de ácido acético.

No presente trabalho, o extrato metanólico que apresentou toxicidade não provocou sinais de intoxicação semelhantes aos das microcistinas, heptapeptídeos hepatotóxicos, que levam o animal intoxicado ao óbito em intervalos que variam de 50 minutos a 2 horas, por choque hipovolêmico, causado por hemorragia intra-hepática, quadro não observado nesses bioensaios. Por outro lado, a solubilidade e a polaridade do extrato metanólico e os testes químicos preliminares com ele realizados, afastam a possibilidade de a toxina ser também uma substância pertencente ao grupo das saxitoxinas ou das anatoxinas-a, solúveis em água, sendo as primeiras facilmente degradáveis em pH não ácido.

Entre outras possibilidades, substâncias com atividade anticolinesterásica, como a anatoxina-a(s), poderiam apresentar as mesmas reações nos animais que o extrato metanólico da cepa CCIBT 3163; até o presente momento, apenas duas outras substâncias que apresentam esta atividade foram isoladas de cianobactérias; a já citada anatoxina-a(s) e a nostocarbolina. A primeira é sintetizada por *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria* spp., *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aquae* e *Cylindrospermum* spp. e inibe irreversivelmente a enzima anticolinesterase, impedindo a hidrólise da acetilcolina o que bloqueia a transmissão elétrica nos músculos esqueléticos estriados de mamíferos, e em dose suficiente, leva à paralisia, asfixia e morte (Rodríguez *et al.* 2006). No Brasil, mais especificamente no Rio Grande do Sul (Monserrat *et al.* 2001) e em Pernambuco (Molica *et al.* 2005), a anatoxina-a(s) foi detectada em florações de *Anabaena spiroides*, através de teste de inibição de acetilcolinesterase.

A nostocarbolina é um alcalóide extraído de linhagem pertencente ao gênero *Nostoc*, cuja atividade foi testada somente *in vitro*, desconhecendo-se seus efeitos em mamíferos; essa substância apresentou também ação algicida (Becher *et al.* 2009).

Considerando o grande interesse que substâncias com atividade anticolinesterásica despertam devido ao papel que desempenham no controle da Doença de Alzheimer, os extratos foram submetidos à pesquisa desta atividade antienzimática. Esta doença está associada à perda de neurônios colinérgicos; uma substância inibidora da enzima acetilcolinesterase atuaria na fenda sináptica, não degradando os neurotransmissores (Oliveira 1994). Por outro lado, dependendo da dose em que forem administrados, os anticolinesterásicos podem ser extremamente tóxicos para mamíferos, levando-os à morte por parada respiratória, em uma intoxicação aguda, como observado nos bioensaios.

O resultado do ensaio bioautográfico com a enzima anticolinesterásica está apresentado na figura 16. A mancha branca contra um fundo na cor púrpura, com $Rf = 2,5$, indica a posição de substância com efeito inibitório sobre a enzima anticolinesterase (AChE), contida no extrato metanólico da cepa *Phormidium formosum* CCIBT 3163.

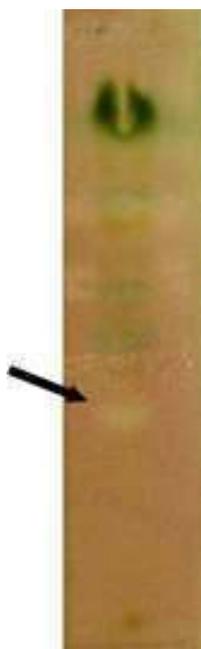


Figura 16. Bioautografia com o extrato metanólico de *Phormidium formosum* CCIBT 3163. O halo (seta) indica substância inibidora da atividade anticolinesterásica. Placa cromatográfica de gel de sílica; fase móvel composta por clorofórmio/metanol/água 64:36:8 (v/v/v).

Estudos para verificar correlações entre a toxina e a substância com atividade anticolinesterásica presentes no extrato de *Phormidium formosum* CCIBT 3163 serão realizados posteriormente.

4.4 COLEÇÃO DE CULTURA DE CIANOBACTÉRIAS

A Coleção de Culturas do Instituto de Botânica (CCIBt) possui atualmente cerca de 330 cepas de cianobactérias, destas 45% estão identificadas até espécie, 12% identificadas apenas em nível genérico e 43% possuem identificação em diferentes categorias taxonômicas. Quanto à toxicidade, 90 cepas (26%) já foram estudadas, destas 50% apresentaram toxicidade, sendo 42% de toxinas conhecidas e 8% desconhecidas. Os outros 50% não apresentaram toxicidade.

Com intuito de facilitar o reconhecimento das cepas já estudadas e relacionar o código antigo com o código novo, na tabela 12 estão listadas as 90 cepas estudadas e seus respectivos autores. Ressalta-se que apenas a partir de 2008, as cepas do banco passaram a ser investigadas também quanto à presença de BMAA.

Tabela 12. Relação das 90 Cepas de cianobactérias da Coleção de Cultura do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica estudadas quanto à toxicidade; número da cepa estudada (CCIBt); número antigo da cepa (SPC); organismo; e resultado da toxicidade.

CCIBt	Organismo	Toxicidade	Referência
**	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Negativo	Dogo & Carvalho (2005)
3050	<i>Synechococcus</i> sp.	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2009)
3053	<i>Aphanocapsa holsatica</i>	Negativo	Dogo & Carvalho (2005)
3056	<i>Synechococcus nidulans</i>	Negativo	Dogo & Carvalho (2005)
3059	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	Negativo	Dogo & Carvalho (2005)
3062	<i>Synechococcus nidulans</i>	desconhecida*	Sant'Anna <i>et al.</i> (2008)
3071	<i>Raphidiopsis brooki</i>	saxitoxina	Sant'Anna <i>et al.</i> (2008)
3072	<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	neurotoxina	Melcher (2007)
3073	<i>Nostoc</i> sp.	Negativo	Dogo & Carvalho (2005)
3076	<i>Planktothrix</i> sp.	Negativo	Gerizani & Carvalho (2007)
3077	<i>Lyngbya</i> cf. <i>hieronymusii</i>	desconhecida*	Sant'Anna <i>et al.</i> (2008)
3078	<i>Microcystis</i> sp.	Negativo	Gerizani & Carvalho (2007)
3079	<i>Planktothrix agardhii</i>	Negativo	Gerizani & Carvalho (2007)
3080	<i>Anabaena ambigua</i>	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2008)
3081	<i>Planktolyngbya</i> cf. <i>tallingii</i>	saxitoxina	Sant'Anna <i>et al.</i> (2008)
3082	<i>Pseudoanabaena galeata</i>	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2009)
3083	<i>Rhabdoderma</i> cf. <i>lineare</i>	Negativo	Gerizani & Carvalho 2007
3084	<i>Aphanothece bachmannii</i>	desconhecida*	Sant'Anna <i>et al.</i> (2008)
3088	<i>Lyngbya</i> cf. <i>robusta</i>	desconhecida*	Sant'Anna <i>et al.</i> (2008)
3093	<i>Synechococcus nidulans</i>	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2008)
3094	<i>Sphaerocavum brasiliense</i>	Negativo	Dogo & Carvalho (2005)
3097	<i>Pseudoanabaena moniliformis</i>	BMAA	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2009)
3119	<i>Merismopedia</i> sp.	Negativo	Dassi & Carvalho (2006)
3121	<i>Microcystis</i> cf. <i>protocystis</i>	Negativo	Dogo & Carvalho (2005)
3122	<i>Trichormus variabilis</i>	BMAA	Tsukada & Carvalho (2008)
3123	<i>Rhabdoderma lineare</i> var. <i>minor</i>	BMAA	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2008)
3126	<i>Microcystis aeruginosa</i>	microcistina	Dassi & Carvalho (2006)
3130	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Negativo	Tsukada & Carvalho (2008)
3134	<i>Scytonema arcangeli</i>	BMAA	Tsukada & Carvalho (2008)
3135	<i>Aphanizomenon</i> cf. <i>gracile</i>	Negativo	Melcher (2007)
**	<i>Chlorogloea</i> sp.	Negativo	Gerizani & Carvalho 2007
3136	<i>Aphanizomenon</i> sp.	Negativo	Melcher (2007)
3137	<i>Radiocystis fernandoi</i>	microcistina LR	Dogo & Carvalho (2006) Rios & Sant'Anna (2007)
3139	<i>Aphanizomenon gracile</i>	Negativo	Melcher (2007)

Continua...

CCIBt	Organismo	Toxicidade	Referência
3140	<i>Microcystis panniformis</i>	microcistina	Dogo & Carvalho (2005)
3142	<i>Planktothrix aghardii</i>	microcistina	Dogo & Carvalho (2005)
3146	<i>Microcystis protocystis</i>	microcistina	Dassi & Carvalho (2006)
3148	<i>Aphanizomenon</i> sp.	Negativo	Melcher (2007)
3149	<i>Microcystis panniformis</i>	microcistina	Dassi & Carvalho (2006)
3150	<i>Radiocystis fernandoi</i>	microcistina LR	Sant'Anna <i>et al.</i> (2008)
3151	<i>Microcystis viridis</i>	microcistina	Sant'Anna <i>et al.</i> (2008)
3153	<i>Chroococidiopsis</i> sp.	BMAA	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2008)
3154	<i>Radiocystis fernandoi</i>	Negativo	Dogo & Carvalho (2006)
3156	<i>Microcystis botrys</i>	Negativo	Gerizani & Carvalho (2007)
3159	<i>Microcystis wesenbergii</i>	microcistina	Sant'Anna <i>et al.</i> (2008)
3162	<i>Tychonema</i> sp.	desconhecida*	Sant'Anna <i>et al.</i> (2008)
3165	<i>Rhabdoderma like</i>	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2009)
3167	<i>Pseudanabaena galeata</i>	Negativo	Dogo & Carvalho (2005)
3168	<i>Rhabdoderma</i> sp.	Negativo	Conserva & Carvalho (2011)
3170	<i>Microcystis novacekii</i>	microcistina	Dassi & Carvalho (2006)
3172	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Negativo	Jacinavicius (2010)
3176	<i>Planktothrix isothrix</i>	Positivo	Dogo & Carvalho (2005)
3179	<i>Sphaerocavum brasiliense</i>	Negativo	Gerizani & Carvalho (2007)
3184	<i>Microcystis</i> sp.	BMAA	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2008)
3185	<i>Cylindropermopsis</i> sp.	Negativo	Dassi & Carvalho (2006)
3187	<i>Calothrix</i> sp.	BMAA	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2008)
3188	<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	Negativo	Melcher (2007)
3195	<i>Calothrix</i> sp.	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2008)
**	<i>Microcystis aeruginosa</i>	microcistina	Dassi & Carvalho (2006)
3200	<i>Lynghya</i> sp.	BMAA	Conserva & Carvalho (2011)
3201	<i>Aphanothece</i> sp.	Negativo	Dogo & Carvalho (2005)
3206	<i>Nostoc</i> sp.	Negativo	Gerizani & Carvalho (2007)
3209	<i>Microcystis panniformis</i>	microcistina, BMAA	Conserva & Carvalho (2011)
3211	<i>Microcystis panniformis</i>	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2009)
3213	<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	desconhecida*	Dogo (2010)
3214	<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	Positivo	Dogo & Carvalho (2005)
3222	<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	Positivo	Dogo & Carvalho (2005)
3223	<i>Geitlerinema splendidum</i>	desconhecida*, BMAA	Conserva & Carvalho (2011)
**	<i>Microcystis protocystis</i>	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2009)
**	<i>Raphidiopsis brookii</i>	neurotoxina	Melcher (2007)
3231	<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	BMAA	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2008)

Continua...

CCIBt	Organismo	Toxicidade	Referência
**	<i>Limnothrix</i> sp.	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2009)
3241	<i>Geitlerinema</i> sp.	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2009)
3248	<i>Nostoc</i> sp.	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2008)
3249	<i>Nostoc</i> sp.	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2008)
3253	Phormidiaceae	Negativo	Conserva & Carvalho (2011)
3254	<i>Arthrospira platensis</i>	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2009)
3259	<i>Nostoc</i> sp.	BMAA	Conserva & Carvalho (2011)
3264	<i>Microcystis</i> sp.	Negativo	Arjonilla-de-Mattos & Carvalho (2009)
3272	Chroococcaceae	BMAA	Conserva & Carvalho (2011)
3275	<i>Phormidium</i> sp.	BMAA	Pelaria & Carvalho (2010)
1046	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Negativo	Pelaria & Carvalho (2010)
3276	<i>Synechocystis aquatilis</i>	BMAA	Pelaria & Carvalho (2010)
3277	<i>Phormidium</i> sp.	Negativo	Pelaria & Carvalho (2010)
3278	<i>Phormidium</i> sp.	BMAA	Pelaria & Carvalho (2010)
3280	<i>Phormidium</i> sp.	BMAA	Pelaria & Carvalho (2010)
3085	<i>Cyanosarcina</i> sp.	BMAA	Presente Estudo
3102	<i>Leptolyngbya angustissima</i>	Negativo	Presente Estudo
3163	<i>Phormidium formosum</i>	Saxitoxina, desconhecida	Presente Estudo
3244	<i>Rhabdoderma sancti-pauli</i>	BMAA	Presente Estudo
3246	<i>Phormidium formosum</i>	BMAA	Presente Estudo
3287	<i>Calothrix elenkinii</i>	BMAA	Presente Estudo

* houve intoxicação com efeitos/ sintomas diferentes dos causados pelas cianotoxinas conhecidas.

** cepas que foram perdidas por morte dos organismo ou por contaminação com outros microorganismos.

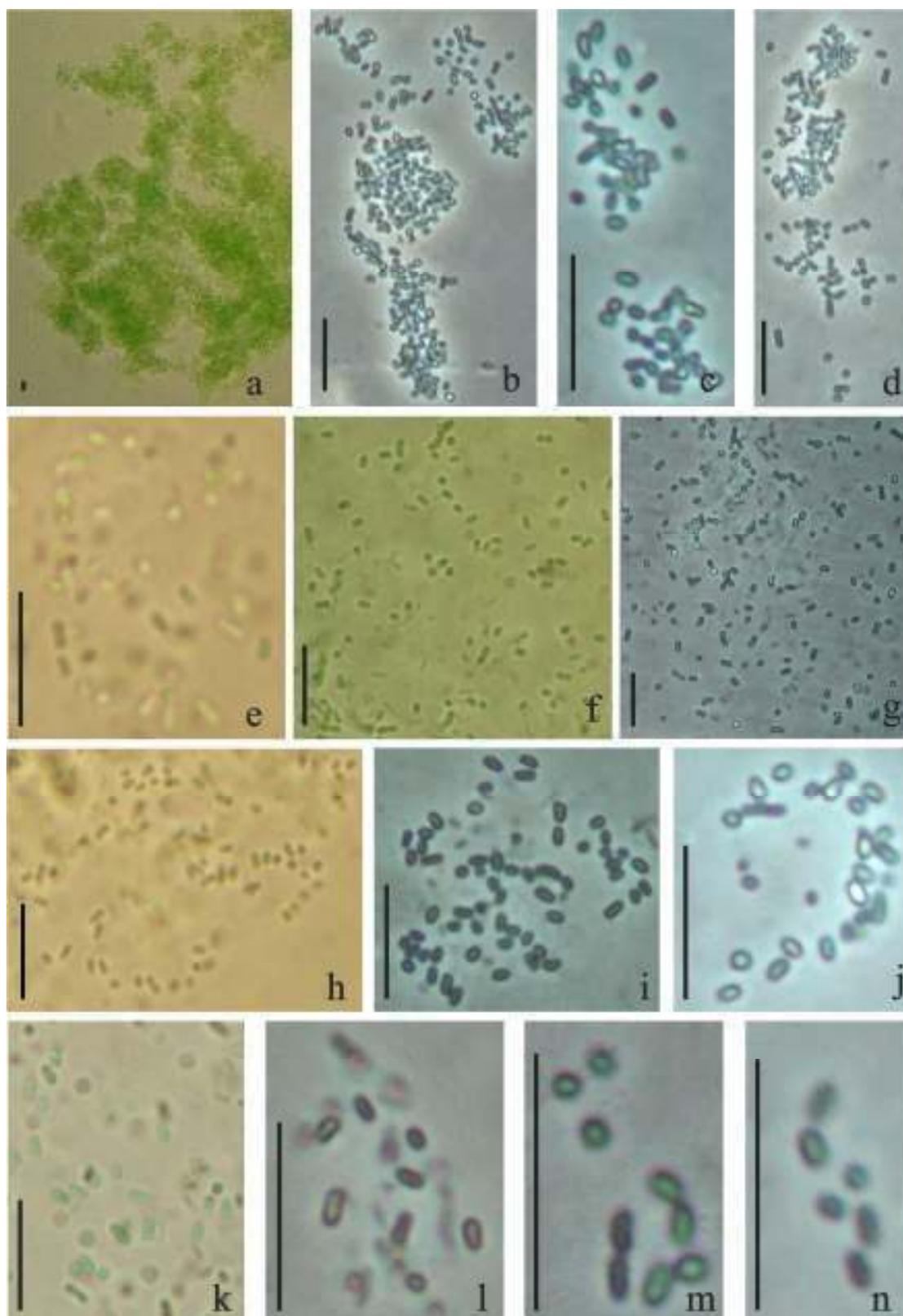


Figura 17 a-n. *Rhabdoderma sancti-pauli* CCIBt 3244. **a.** Aspecto geral da colônia adulta. **b-d.** colônias adultas (contraste de fase); **e.** detalhe células enfileiradas; **f-h.** células soltas. **i-k.** colônias jovens (contraste de fase). **l-m.** colônias jovens, células enfileiradas. **Escalas: 10 µm.**

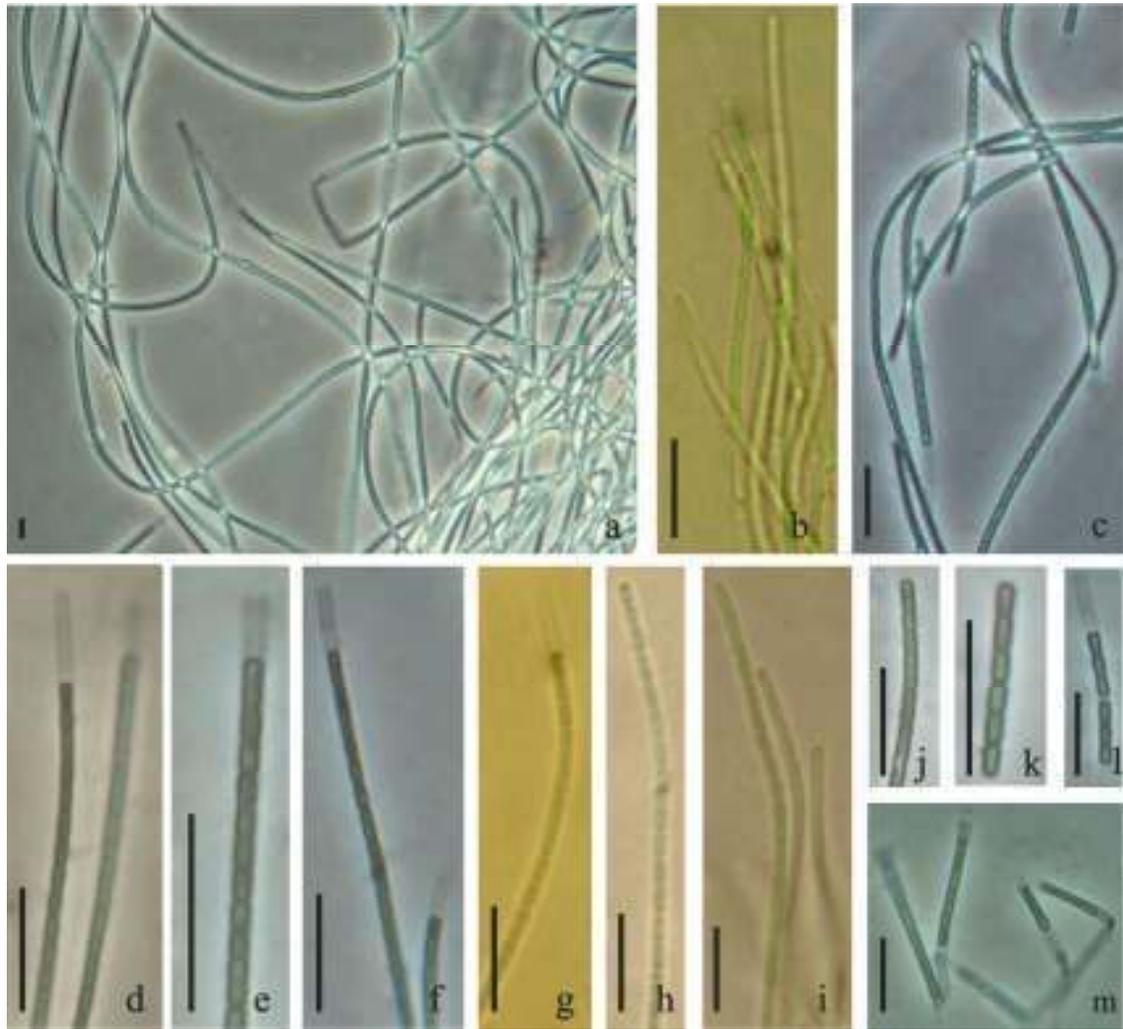


Figura 18 a-m. *Leptolyngbya angustissima* CCIBt 3102. **a.** Aspecto geral dos filamentos emaranhados (contraste de fase); **b.** filamentos em feixes com e sem bainha; **c.** filamentos emaranhados; **d-f.** filamentos (contraste de fase); **g.** filamento solitário; **h.** tricoma solitário; **i.** tricomas adultos; **j.** detalhe do ápice do tricoma; **k.** hormogônio; **l-m.** filamentos jovens. **Escalas: 10 μ m.**

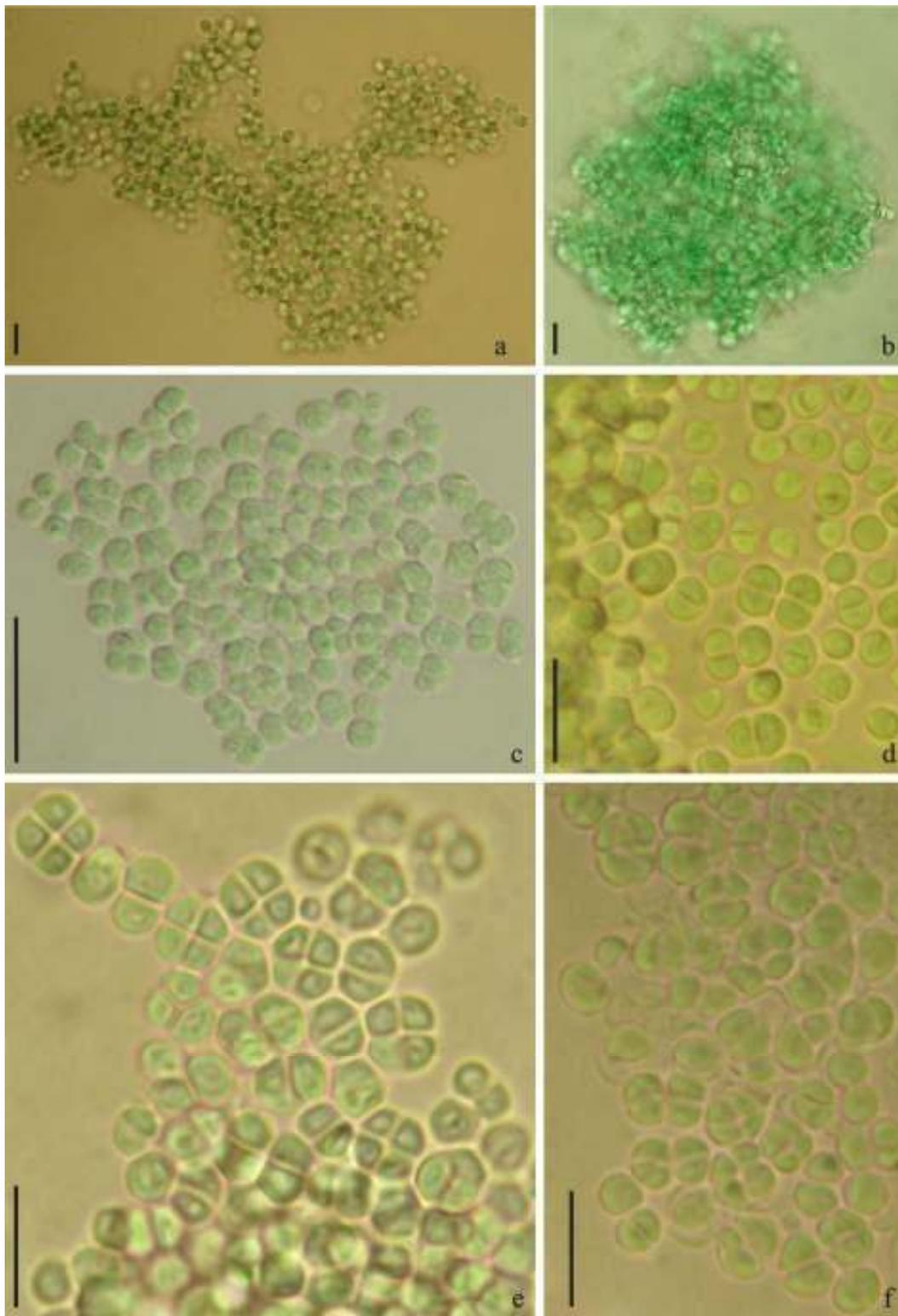


Figura 19 a-f. *Cyanosarcina* sp. CCIBt 3085. Colônias em diferentes estágios de desenvolvimento. **a.** aspecto geral de colônia adulta. **b.** colônia com pacotes de células densamente agregadas. **c.** colônia adulta. **d.** células soltas na margem de uma colônia adulta. **e.** colônia adulta em divisão. **f.** colônia amorfa. **Escala:** 10 μ m.

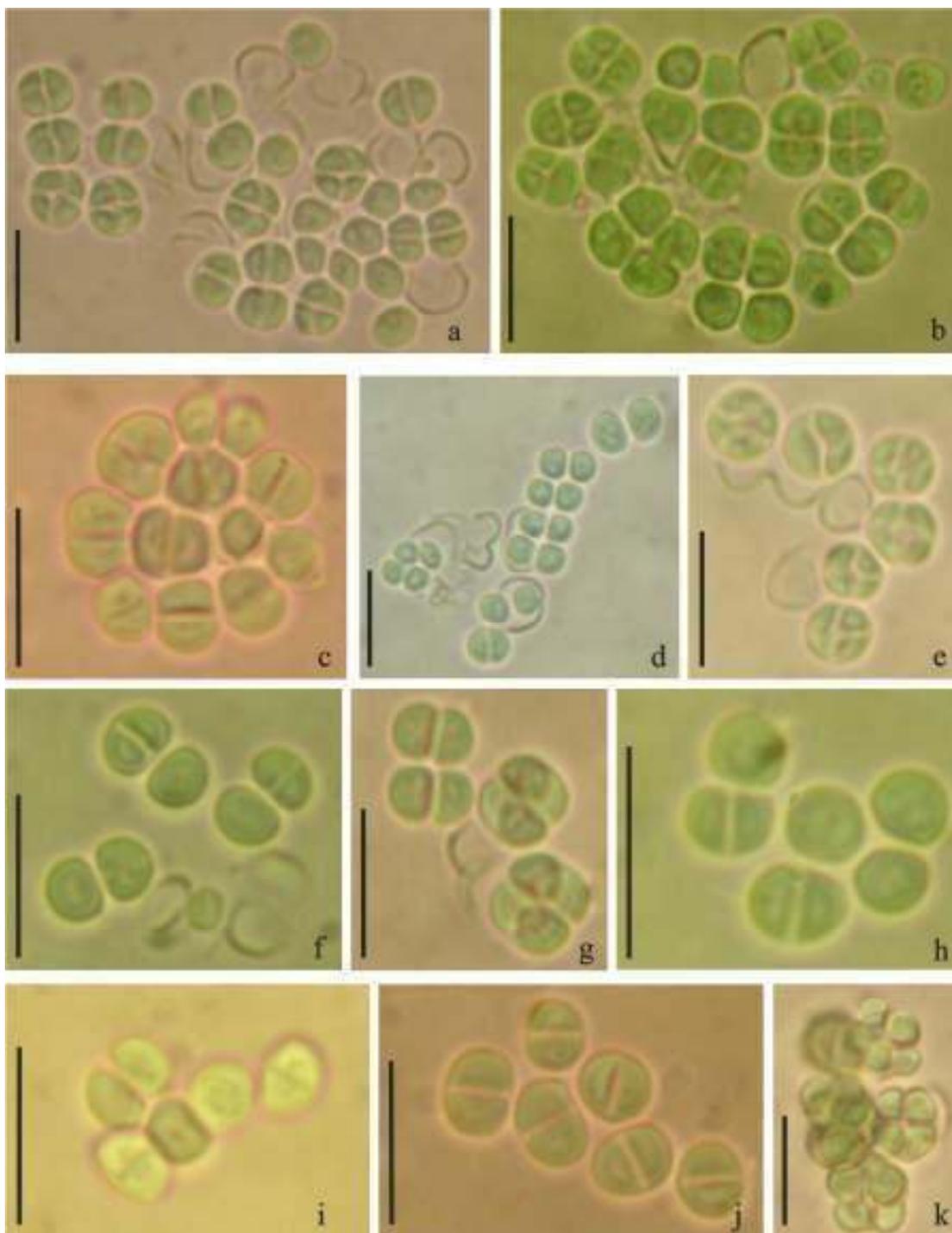


Figura 20 a-k. *Cyanosarcina* sp. CCIBt 3085. **a-b.** colônias jovens. **c.** colônia jovem esférica. **d-k.** células se dividindo em diferentes planos. **Escalas: 10 µm.**

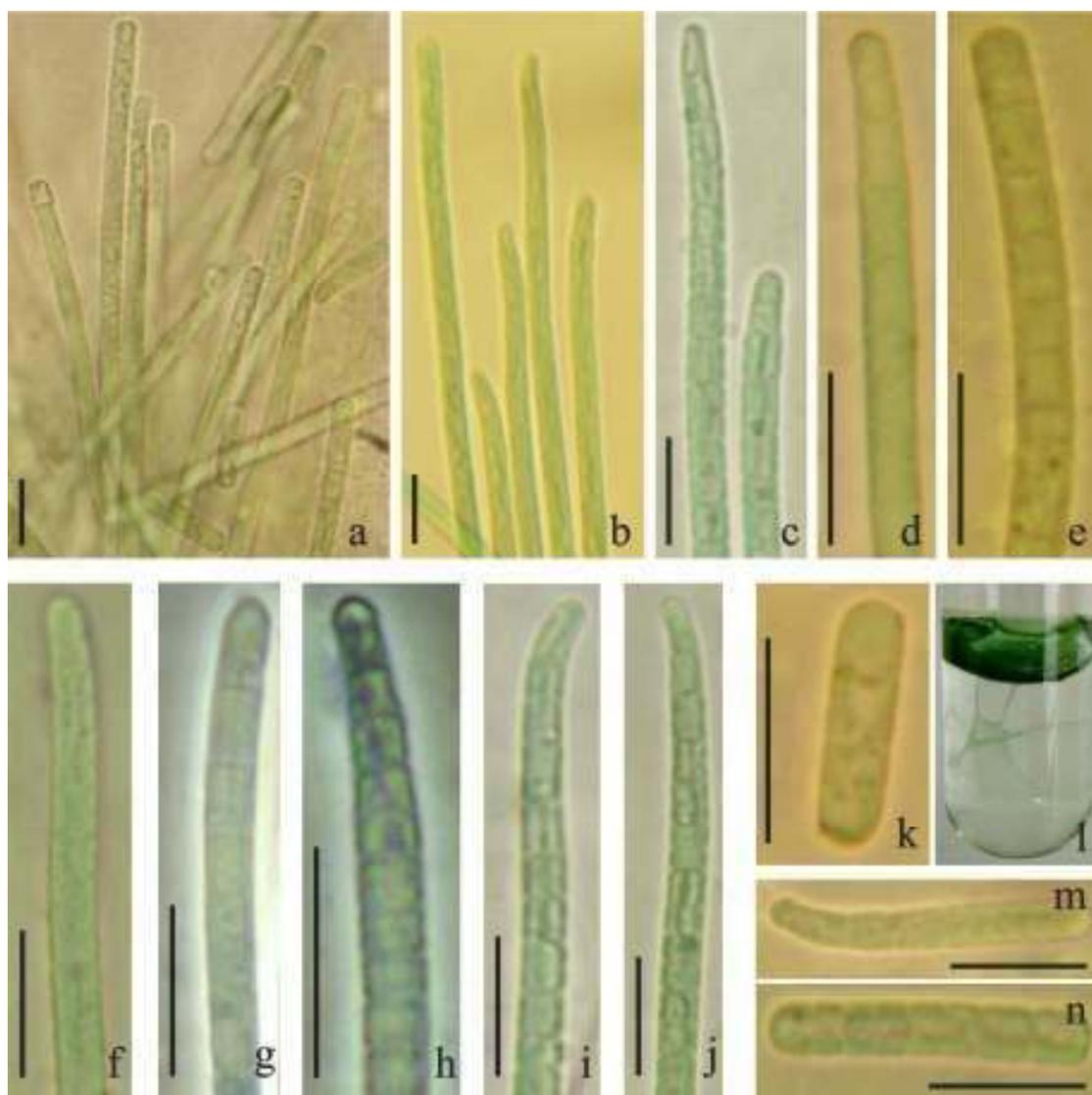


Figura 21 a-n. *Phormidium formosum* CCIBt 3163. a. Aspecto geral dos tricomas emaranhados. **b.** tricomas em feixes. **c.** tricomas curvos, constrictos, com ápice atenuado. **d-g.** tricomas não constrictos. **h.** tricoma constricto (contraste de fase). **i-j.** tricomas curvos, constrictos, com ápice atenuado. **k.** hormogônio. **l.** aspecto macroscópico do talo em tudo de ensaio. **m.** hormogônio com ápice atenuado. **n.** hormogônio constricto. **Escalas: 10 μm.**

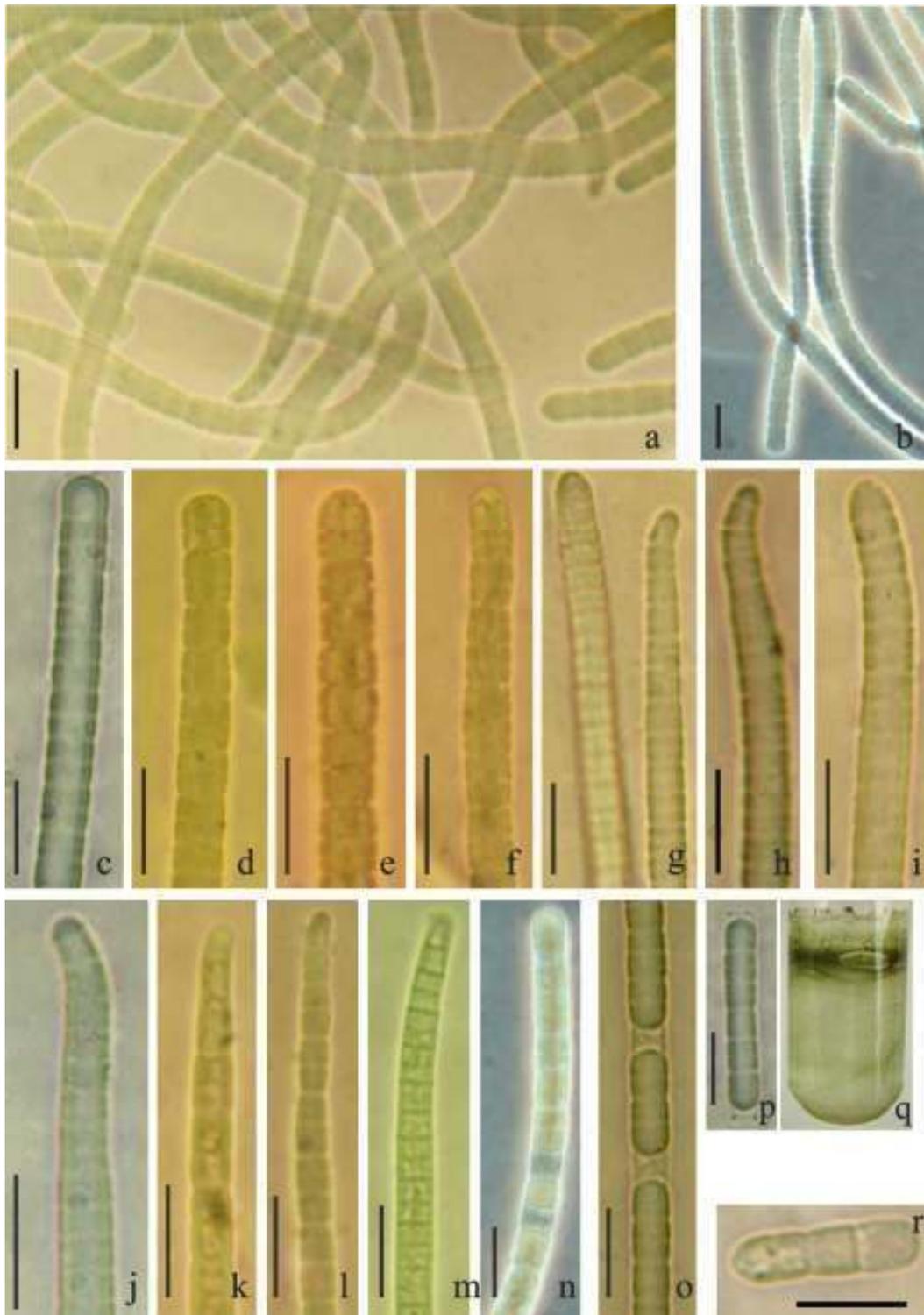


Figura 22 a-r. *Phormidium formosum* CCIBt 3246. a. Aspecto geral dos tricomas emaranhados. **b.** tricomas emaranhados (contraste de fase). **c-f.** tricomas constrictos, retos, não atenuados. **g-l.** tricomas constrictos, curvos, com ápice atenuado. **m.** tricomas não constrictos. **n-o.** tricomas em divisão. **p.** hormogônio constricto. **q.** aspecto macroscópico do talo em tudo de ensaio. **r.** hormogônio. **Escalas: 10 μ m.**

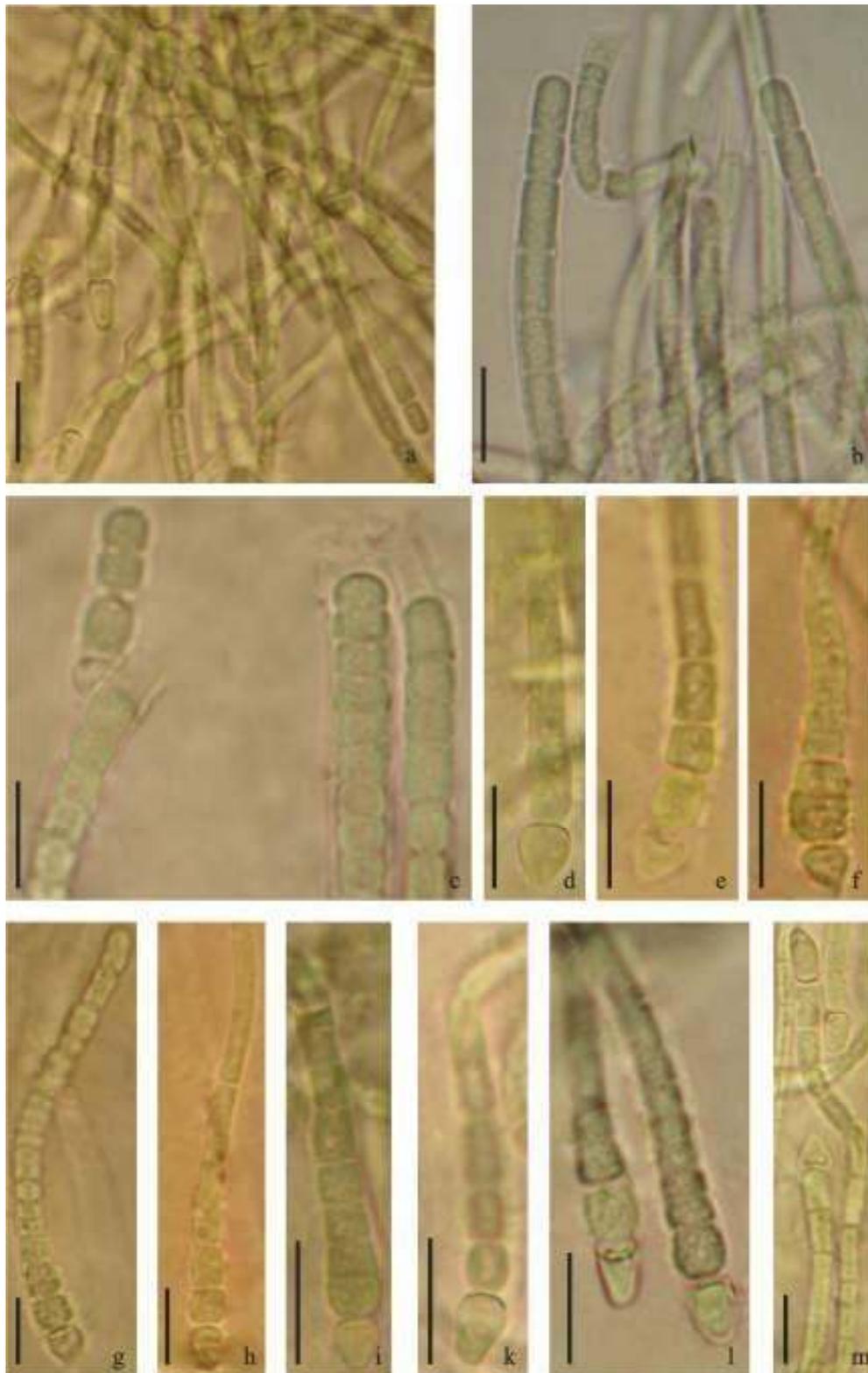


Figura 23. a-m *Calothrix elenkinii* CCIBt 3287. **a.** Aspecto geral dos tricomas emaranhados. **b-c.** detalhe de bainha aberta nos ápices. **d-f.** filamentos com heterocitos subcônicos. **g.** filamento com heterocito arredondado. **h-m.** filamentos com heterocitos subcônicos alongados. **Escalas: 10 µm.**

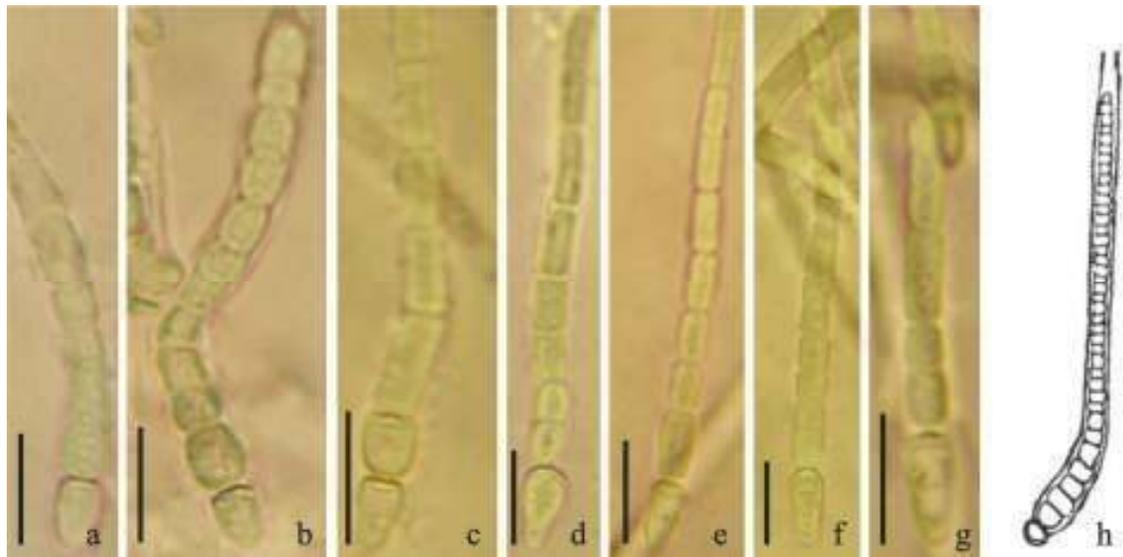


Figura 24 a-h. *Calothrix elenkinii* CCIBt 3287. **a-c.** filamentos com heterocito cônico-arredondado. **c-g.** filamentos com heterocito alongado. **h.** filamento conforme Desikachary (1959, prancha 114, figura 6). **Escalas: 10 μ m.**

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do estudo taxonômico *in vitro* e da investigação das toxinas das seis cepas selecionadas, foi possível concluir que a identificação taxonômica, com base em estudos morfológicos e métricos, de cepas mantidas em cultura, é possível de ser realizada, assim foram identificados os seguintes táxons: *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3085), *Rhabdoderma sancti-pauli* Azevedo *et al.* (CCIBt 3244), *Leptolyngbya angustissima* (West & G.S.West) Anagnostidis & Komárek (CCIBt 3102); *Phormidium formosum* (Bory *ex* Gomont) Anagnostidis & Komárek (CCIBt 3246), isolada do Lago das Garças (Instituto de Botânica, SP) e (CCIBt 3163) proveniente de um lago de piscicultura de Ribeirão Preto e, *Calothrix elenkinii* Kossinskaja (CCIBt 3287), isolada de amostra de viveiro de piscicultura em Pindamonhangaba.

As populações de *Phormidium formosum* (CCIBt 3246) e (CCIBt 3163) apresentaram diferentes resultados morfológicos (micro e macroscopicamente) e toxicológicos. Porém, as diferenças morfológicas e métricas registradas estão de acordo com a descrição da espécie na literatura disponível, o que justifica a identificação das duas cepas como da mesma espécie. No entanto, sugere-se que sejam realizados estudos moleculares para as duas cepas, confirmando a identidade das espécies.

Quanto à distribuição das espécies no Estado de São Paulo, *Calothrix elenkinii* é **primeira citação para o estado**. As amostras que deram origem às cepas estudadas são provenientes de alguns reservatórios, onde já foram realizados estudos limnológicos, ecológicos e taxonômicos de microalga e cianobactérias. No entanto, quatro táxons identificados das cepas estudadas, constituem **novas ocorrências** para os respectivos ambientes de origem: *Cyanosarcina* sp., para o reservatório **Guarapiranga**; *Rhabdoderma sancti-pauli*, para o reservatório **Billings**; *Leptolyngbya angustissima*, para o reservatório de **Atibainha** e *Phormidium formosum* para o **Lago das Garças**, Instituto de Botânica. Discute-se a possibilidade desses táxons pertencerem a microbiota potencial do ambiente.

A investigação de cianotoxinas para as cepas estudadas apresentaram respostas positivas. As cepas CCIBt 3246 e CCIBt 3163, ambas identificadas como *Phormidium formosum*, apresentaram diferentes resultados toxicológicos, os extratos de CCIBt 3163 apresentaram neutoxicidade, e os extratos de CCIBt 3246, não. O extrato ácido de CCIBt 3163 *Phormidium formosum* apresentou resultado **positivo para saxitoxina**, resultado inédito, para a espécie; e o extrato metanólico apresentou **atividade anticolinesterásica**.

As cepas de *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3085), *Rhabdoderma sancti-pauli* (CCIBt 3244), *Phormidium formosum* (CCIBt 3246) e *Calothrix elenkinii* (CCIBt 3287) apresentaram

resultados **positivos para a presença do aminoácido neurotóxico betametilaminoalanina (BMAA)** relacionado à doença de Alzheimer. A pesquisa de BMAA vem sendo realizada recentemente no mundo. Desde 2008 são realizadas pesquisas para detecção de BMAA nas cepas da Coleção de Cultura de Cianobactérias do Instituto de Botânica, neste período das 41 cepas, 19 delas apresentaram resultados positivos (incluindo os resultados obtidos no presente trabalho), ou seja, 46%. Portanto, sugere-se, que as 49 cepas anteriormente investigadas quanto à cianotoxinas, devam ser reavaliadas quanto a presença ou não de BMAA.

Quanto à manutenção das cepas na cultura, durante o estudo, foram feitas modificações/adequações no procedimento de obtenção de biomassa das cianobactérias filamentosas. O cultivo que normalmente é mantido sob agitação constante, para as cepas das cianobactérias filamentosas: *Leptolyngbya*, *Phormidium* e *Calothrix*, foi suspenso, e, portanto, mantidas em repouso, pois houve melhor resposta de crescimento (biomassa) nesta condição. Esta adaptação foi feita durante a determinação das condições experimentais que permitissem o melhor desenvolvimento das cepas. Estas cianobactérias filamentosas, *Leptolyngbya*, *Phormidium* e *Calothrix*, são comumente relatadas na literatura como pertencentes à comunidade perifíticas, na natureza, vivendo aderidas a algum substrato, o que justifica os melhores resultados ao adequar a cultura às informações ecológicas disponíveis sobre as espécies.

Ressalta-se que o cultivo que apresentou melhor rendimento, ou seja, a melhor produção de biomassa, foi o da cepa de *Rhabdoderma sancti-pauli*, produzindo 3,7 g de material liofilizado, o que corresponde cerca de 6 vezes mais do que as quantidades obtidas pelas demais cepas. Devido às pequenas dimensões das células, estas devem apresentar rápida divisão celular, o que poderia ter favorecido o desenvolvimento de sua biomassa.

Para finalizar, é importante ressaltar, que ao receber amostras para selecionar espécies para incluir em coleções de culturas, é significativa a necessidade de manter uma sub-amostra preservada em formol a fim de comparar as características da população de origem da cepa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTANO, P. & KOVÁCIK, L.** 1994. Is the genus *Leptolyngbya* (Cyanophyte) a homogeneous taxon? *Algological Studies*. 75: 37-51.
- ARJONILLA-DE-MATTOS, L.F. & CARVALHO, L.R.** 2008. Estudos biológicos e químicos de cepas de cianobactérias. Livro de resumos: XII Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica. p.28.
- ARJONILLA-DE-MATTOS, L.F. & CARVALHO, L.R.** 2009. Prospecção de substâncias bioativas em cepas selecionadas do banco de culturas de cianobactérias da Seção de Ficologia. Livro de resumos: XIII Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica. pp.22.
- AZEVEDO, M.T.P. & KOVÁCIK, L.** 1996. *Rhabdogloea brasilica* sp. nov. (Chroococcales, Synechococcaceae): morphological and morphometric variability under cross-gradient cultures. *Algological Studies* 83:83-92.
- AZEVEDO, M.T.P. & SANT'ANNA, C.L.** 1994. *Hormothece geitleriana* a new edaphic chroococcal Cyanophyceae from São Paulo State. Brazil. *Algological Studies* 75: 79-83.
- AZEVEDO, M.T.P. & SANT'ANNA, C.L.** 1999. *Coelosphaerium evidenter-marginatum*, a new planktonic species of Cyanophyceae/Cyanobacteria from São Paulo State, Southeastern Brazil. *Algological Studies* 94: 35-43.
- AZEVEDO, M.T.P. & SANT'ANNA, C.L.** 2003. *Sphaerocavum* a new genus of planktic Cyanobacteria from continental water bodies in Brazil. *Algological Studies* 109:79-92.
- AZEVEDO, M.T.P.** 1991. Edaphic blue-green algae from São Paulo Botanical Garden, Brazil. *Algological Studies* 83: 83-92.
- AZEVEDO, M.T.P., SANT'ANNA, C.L., SENNA, P.A.C., KOMARÉK, J. & KOMÁRKOVÁ, J.** 2003. Contribution to the microflora of chroococcalean cyanoprokaryotes from São Paulo State, Southeast Brazil. *Hoehnea* 30(3): 285-295.
- AZEVEDO, S.M.F.O., CARMICHAEL, W. W., JOCHIMSEN, E.M., RINEHART, K.L., LAU, S., SHAW, G.R. & EAGLESHAM, G.K.** 2002. Human intoxication by microcistins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 182: 441-446.
- AZEVEDO, S.M.F.O., EVANS, W.R., CARMICHAEL, W.W. & NAMIKOSHI, M.** 1994. First report of microcystins from a brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology* 6: 261-265.
- BAKER, P.D., STEFFENSEN, D.A., HUMPAGE, A.R., NICHOLSON, B.C., FLACONER, I.R., LANTHOIS, B., FERGUSSON, K.M. & SAINT, C.P.** 2001.

- Preliminary evidence of toxicity associated with the benthic cyanobacterium *Phormidium* in south Australia. *Environm. Toxicol.* 16(6): 506-511.
- BECHER, P.G., BAUMANN, H.I., GADEMANN K. & JÜTTNER, F.** 2009. The cyanobacterial alkaloid nostocarboline: an inhibitor of acetylcholinesterase and trypsin. *Journal of Applied Phycology* 20: 1-8.
- BEYRUTH, Z.** 1996. Comunidade fitoplanctônica da Represa de Guarapiranga: 1991-92. Aspectos ecológicos, sanitários e subsídios para reabilitação da qualidade ambiental. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- BICUDO, D.C.** 1985. *Borzia* Cohn *ex* Gomont: only a hormogone or a true genus of blue-green algae. *Algological Studies* 41:489-493.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C., MOURA, A. N., OLIVEIRA, M. C. & MASSOLA JR., N.S.** 2009. *Geitlerinema* species (Oscillatoriales, Cyanobacteria) revealed by cellular morphology, ultrastructure and dna sequencing. *Journal Phycology* 45:716-725.
- BRANCO, L.H.Z., SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P. & SORMUS, L.** 1997. Cyanophyte Flora From Cardoso Island Mangroves, Sao Paulo State, Brazil. 2. Oscillatoriales. *Algological Studies* 84: 39-52 .
- BRITO, A.S.** 1994. Manual de Ensaio Toxicológicos. Campinas: Ed. Unicamp, pp. 122.
- BUCKLEY, L.J., IKAWA, M. & SASNER, J.R.** 1976. Isolation of *Gonyaulax tamarensis* toxins from soft shell clams (*Mya arenaria*) and a thin-layer chromatographic-fluorometric method for their detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(1): 107-110.
- CALIJURI, M.C., ALVES, M.S.A. & SANTOS, A.C.A.** 2006. Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. Rima: São Carlos.
- CARAUS, I.** 2002. The algae of Romania. *Studii si Cercetari, Universitatea Bacau, Biologie* 7: 1-694.
- CARVALHO, L.R.** 2006. Cianotoxinas *In*: Sant'Anna C.L.; Azevedo M.T.P.; Agujaro, L.F.; Carvalho, M.C.; Carvalho, L.R. & Souza, R.C.R. (Orgs.). Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras. Interciência, Rio de Janeiro.
- CARVALHO, L.R., PIPOLE, F., WERNER, V.R., LAUGHINGHOUSE IV, H.D., CAMARGO, A.C.M., RANGEL, M., KONNO, K. & SANT'ANNA, C.L.** 2008. A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 39(4):761-769.
- CARVALHO, L.R., SANT'ANNA, C.L., GEMELGO, M.C.P. & AZEVEDO, M.T.P.** 2007. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar

- chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil
Revista Brasileira de Botânica 30(1):147-148.
- CARVALHO, M.C.** 2003. Comunidade fitoplanctônica como instrumento de biomonitoramento de reservatórios no Estado de São Paulo. Tese Doutorado. Faculdade de Saúde Pública, São Paulo.
- CETESB.** 2005. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. 2004 Companhia de Saneamento Ambiental, São Paulo.
- CONSERVA, A.A.G. & CARVALHO, L.R.** 2011. Prospecção de atividades toxicológicas e farmacológicas em cepas de cianobactérias da Coleção de Culturas do Instituto de Botânica. Livro de resumos: XV Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica, pp.21.
- COOD, G.A., LINDSEY, J., YOUNG, F.M., MORRISON, L.F. & METCALF, J.S.** 2005. Harmful cyanobacteria. From mass mortalities to management measures. *In*: Huisman, J., Matthijs, H.V.P and Visser, P.M. (Eds.). Harmful Cyanobacteria. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 1-23.
- COX, P.A., BANACK, S.A. & MURCH, S.J.** 2005. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
- DASSI, F. & CARVALHO, L.R.** 2006. Pesquisa de substâncias tóxicas produzidas por cianobactérias. Livro de resumos: X Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica, pp.20.
- DAY, S.A., WICKMAN, R.P., ENTWISLE, T.J. & TYLER, P.A.** 1995. Flora of Australia Supplementary Series Number 4. Publishers Australian Biological Resources Study, pp. 276.
- DESIKACHARY, T.V.** 1959. Cyanophyta. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research. pp.686.
- DITTMAN, E. & WIEGAND, C.** 2006. Cyanobacterial toxins- their occurrence, biosynthesis and impact of human affairs. Molecular Nutrition and Food Research 50:7-17.
- DOGO, C.R. & CARVALHO, L.R.** 2005. Estudo químico de cepas do banco de culturas de cianobactérias da Seção de Ficologia. Livro de resumos: IX Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica, pp.22.
- DOGO, C.R. & CARVALHO, L.R.** 2006. Estudo químico quantitativo da microcistina-LR produzida por *Radiocystis fernandoi* em diferentes condições de cultivo. Livro de resumos: X Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica, pp.22.

- DOGO, C.R.** 2010. Caracterização dos efeitos tóxicos da fração ativa da cepa CCIBt 920 *Geitlerinema amphibium* (Cyanobacteria/ Oscillatoriales) na microcirculação e em fibras musculares: análise por microscopia intravital. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- FERRAGUT, C., LOPES, M.R.M., BICUDO, D.C., BICUDO, C.E.M., & VERCELLINO, I.S.** 2005. Ficoflórula perifítica e planctônica (exceto Bacillariophyceae) de um reservatório oligotrófico raso (Lago do IAG, São Paulo). *Hoehnea* 32 (2): 137-184.
- IORE, M. F. & HONDA, R. Y.** 2008. Fixação do N₂ por cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M.V.B; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S.. (Org.). *Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Guaíba: Agrolivros 69-95.
- FURTADO, A.L.F.F. , CALIJURI, M.C., LORENZI, A.S., HONDA, R.Y., GENUÁRIO, D.G. & IORE, M.F.** 2009. Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia* 627: 195-209.
- FURTADO, A.L.F.F.** 2007. Isolamento, morfologia, análises moleculares e testes toxicológicos de cianobactérias em lagoa facultativa de sistema de estabilização (Cajati, São Paulo) Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.
- GERIZANI, G. & CARVALHO, L.R.** 2007. Pesquisa de substâncias tóxicas produzidas por cianobactérias. Livro de resumos: XI Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica, pp.19.
- GORHAM, P. R., MACLACHLAN, J., HAMMER, U.T. & KIM, W.K.** 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. *International Association on Theoretical and Applied Limnology Proceedings* 15:798-804.
- GRAHAM, L.E. & WILCOX, L. W.** 2000. *Algae*. Prentice Hall, New Jersey.
- HARADA, K.-I., KONDO, F. & LAWTON, L.** 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. I. Chorus & J. Bartram (eds.). E & FN SPON, New York, pp. 369-405.
- HARADA, K.-I., MATSUURA, K., SUZUKI, M., OKA, H., WATANABE, M.F., OISHI, S., DAHLEM, A.M., BEASLEY, V.R. & CARMICHAEL, W.W.** 1988. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 448: 275-283.

- HARADA, K.I., OGAWA, K., MATSUURA, K., NAGAI, H., MURATA, H., SUZUKI, M., ITEZONO, Y., NAKAYIAMA, N., SHIRAI, M. & NAKANO, M.** 1991. Isolation of two toxic heptapeptide from *Microcystis aeruginosa*, K-139. *Toxicon* 29: 479-485.
- HOFFMANN, L.; KOMARÉK, J. & KASTOVSKY, J.** 2005. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) state in 2004. *Algological Studies* 117:95-115.
- HONDA, R.I. & AZEVEDO, M.T.P.** 2004. Estudos taxonômicos em cultura de Cyanobacteria provenientes de um reservatório oligotrófico no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, (PEFI), São Paulo, SP. Brasil. *Hoehnea* 31:151-169.
- HONDA, R.Y.** 2005. Estudos taxonômicos e de desenvolvimento in vitro de *Microcystis* spp. (Cyanobacteria/Cyanophyceae) isoladas de corpos d'água do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- HONDA, R.Y.** 2009. Caracterização morfológica e molecular cianobactérias do gênero *Anabaena* isoladas de corpos d'água brasileiros. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- HUSZAR, V.L.M., SILVA, L.H.S., MARINHO, M.M., DOMINGOS, P. & SANT'ANNA, C.L.** 2000. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *In: The Trophic Spectrum Revisited: The Influence of Trophic State on the Assembly of Phytoplankton Communities* (C.S.Reynolds, M.Dokulil & J.Padisák, Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 67-77.
- JACINAVICIUS, F.R.R.** 2010. Efeitos da temperatura, irradiância e competição no crescimento e na produção de cianotoxinas da cepa SPC 777 *Microcystis aeruginosa*(Kutzing) Kutzing (Cyanobacteria). Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- JOHANSEN, J.R., OLSEN C.E., LOWE, R.L., FUCIKOVA, K. & CASAMATA, A.D.** 2008. *Leptolyngbya* species from selected seep walls in the great Smoky Mountains National Park. *Algological Studies* 126:21-36.
- KIELY, J.S., MOOS, W.H., PAVIA, M.R. SCHWARZ, R. D. & WOODARD, G. L.** 1991. *Anal. Biochem.* 196: 439-443.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K.** 1999. Cyanoprokaryota 1. Teil Chroococcales. *In: Süßwasserflora von Mitteleurop.* H. Ettl, G. Gärtner, H.Heynig & D. Möllenhauer (eds.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K.** 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. *In*: Sübwasserflora von Mitteleuropa. B. Büdel, G. Gärtner, L. Krientitz & M. Schagerl (eds.).Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- KOMÁREK, J. & HAUER, T.** 2011. CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. - Word-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, <http://www.cyanodb.cz>. (acesso em 20.04.2011).
- KOMÁROKY, Z.P. & PADISÁK, J.** 1999. The soil alga flora of the Kinkunsag National Park and the surrounding regions. *In*: The flora of the Kinkunsag National Park II: Cryptogams. Magyar Museum, Budapest.
- LEE, R.E.** 2008. Phycology. Cambridge University Press, 4th Edition. Cambridge, pp. 561.
- LILLEHEIL, G., ANDERSEN, R. A., SKULBERG, O. M. & ALEXANDER, J.** 1997. Effects of a homoanatoxin-a-containing extract from *Oscillatoria formosa* (Cyanophyceae/ Cyanobacteria) on neuromuscular transmission. *Toxicon*, Oxford 35(8): 1275-1289.
- LOMBARDO, M., PINTO, F.C.R., VIEIRA, J.M.S., HONDA, R.Y., PIMENTA, A.M.C., BEMQUERER, M.P., CARVALHO, L.R. & KIYOTA, S.** 2006. Isolation and structural characterization of microcystin-LR and three minor oligopeptides simultaneously produced by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria): a Brazilian toxic cyanobacterium. *Toxicon* 46: 560-566.
- MALONE, C.F.S.** 2010. Biodiversidade de algas e cianobactérias de duas lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica. São Paulo.
- MARSTON, A., KISSLING, J. & HOSTETTMANN K.** 2002. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* 13: 51-54.
- MARTINS, M.D.** 2010. Diversidade de cianobactérias nas áreas da lagoa do casamento e dos butiazais de tapes e seus ecossistemas associados (RS, Brasil). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo.
- MATEO, P., DOUTERELO, I., BERRENDERO, E. & PERONA, E.** 2006. Physiological differences between two species of cyanobacteria in relation to phosphorus limitation. *Journal of Phycology* 42: 61-66.
- MC GREGOR, G.B.** 2007. Freshwater Cyanoprokaryota of North-Eastern Australia I :Oscillatoriales. Flora of Australia Supplementary Series Number 24, Australian Biological Resources Study, Canberra.

- MELCHER, S.S.** 2007. Estudos morfológicos e moleculares de cianobactérias potencialmente tóxicas dos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Raphidiopsis* (Nostocales) Tese de Doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- MERCANTE, C.T.J., SILVA, D. & COSTA, S.V.** 2006. Avaliação da qualidade da água de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo por meio do uso de variáveis abióticas e clorofila. *In*: Esteves, K.E. & Sant'Anna C.L. (Orgs.). Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo. Rima: São Carlos.
- MERCK.** 1971. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. E. Merck, Darmstadt, Germany, pp. 118.
- MOLICA, R. & AZEVEDO, S.** 2009. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. *Oecologia Brasiliensis* 13:229-246.
- 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.** 2005. Occurrence of saxitoxins and anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4: 743-753.
- MONSERRAT, J.M., YUNES, J.S. & BIANCHINI, A.** 2001. Effects of *Anabaena Spiroides* (Cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species. *Environmental Toxicology & Chemistry* 20: 87-94.
- OLIVEIRA, F.L.** 1994. Transmissão sináptica. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 44(1): 25-33.
- PAERL, H.W. & HUISMAN, J.** 2008. Blooms like it hot. *Science* 320:57-58.
- PELANDER, A., OJANPERÄ, I., LAHTI, K., NIINIVAARA, K. & VUORI, E.** 2000. Visual detection of cyanobacterial hepatotoxins by thin-layer chromatography and application to water analysis. *Water Research* 34: 2643-2652.
- PELARIA, A.C. & CARVALHO, L.R.** 2010. Triagem de substâncias bioativas em cepas selecionadas do banco de culturas de cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia. Livro de resumos: XIV Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica, pp. 19.
- POON, G. K., PRIESTLEY, I.M., HUNT, S. M., FAWEL, J. K. & CODD, G. A.** 1987. Purification procedure for peptide toxins from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* involving high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography* 387: 551-555.

- PYO, D. & SHIN, H.** 2002. Extraction and analysis of microcystins RR and LR in cyanobacteria using a cyano cartridge. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 51: 103-109.
- RIOS, F.R. & SANT'ANNA C.L.** 2007. Efeito da irradiância no desenvolvimento e na produção de microcistina –LR por *Radiocystis fernandoi*, espécie tropical de cianobactéria. Livro de resumos: XI Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica, pp. 16.
- RODRIGUES, L.L.** 2008. Biodiversidade de cianobactérias e algas das Represas Billings (Braço Taquacetuba) e Guarapiranga, SP, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.
- RODRÍGUEZ, V., MOURA, S., PINTO, E., PEREIRA, C.M.P. & BRAGA, R.C.** 2006. Aspectos toxicológicos e químicos da anatoxina-a e seus análogos. *Química Nova* 29: 1365-1371.
- ROSINI, E.F.** 2010. Fitoplâncton de Pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo: Levantamento Florístico. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- SANT'ANNA, C. L., AZEVEDO, M.T.P. & SORMUS, L.** 1989. Fitoplancton do lago das garças Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil: Estudo taxonomico e aspectos ecologicos. *Hohnea* 16: 89-131.
- SANT'ANNA, C.L & AZEVEDO, M.T.P.** 1995. Oscillatoriaceae (Cyanophyceae) from São Paulo State, Brazil. *Nova Hedwigia* 60:19-58.
- SANT'ANNA, C.L. & AZEVEDO, M.T.P.** 2006. Morfologia e Reprodução. *In*: Sant'Anna C.L.; Azevedo M.T.P.; Agujaro, L.F.; Carvalho, M.C.; Carvalho, L.R. & Souza, R.C.R. (Orgs.). Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras. Interciência, Rio de Janeiro.
- SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO M.T.P., BRANCO, L.H.Z., ROSÁRIO, M., BRAGA, A., CORDEIRO-MARINO, M. & GUIMARAES, S.M.P.B.** 1995. Cianofíceas marinhas bentônicas das praias de Peruíbe e dos Sonhos, município de Itanhaem, SP, Brasil, III. *Revista Brasileira de Biologia* 55(3):389-407.
- SANT'ANNA, C.L., BRANCO, L.H.Z., & AZEVEDO M.T.P.** 2006. Gêneros de algas de águas continentais. *In*: Bicudo, C.E.M. & Menezes, M.(Orgs.).2 ed.Rima: São Carlos.
- SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P., WERNER, V.R.; DOGO, C.R., RIOS, F.R. & CARVALHO, L.R.** 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria on Brazil. *Algological studies* 126:251-265.

- SANT'ANNA, C.L., MELCHER, S.S., CARVALHO, M.C., GEMELGO, M.P. & AZEVEDO, M.T.P.** 2007. Planktic Cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 30(1): 1-17.
- STANIER, R.Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M. & COHEN-BAZIRE, G.** 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol reviews*, 35:171-205.
- TEIXEIRA, M.G.L.C., COSTA, M.C.N., CARVALHO, V.L.P., PEREIRA, M.S. & HAGE, E.** 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO* 27(3): 244-253.
- TSUKADA, R.K. & CARVALHO, L.R.** 2008. Estudos taxonômicos, químicos e toxicológicos de três cepas selecionadas do banco de culturas de cianobactérias da Seção de Ficologia. Livro de resumos: XII Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica, pp.44.
- TUCCI, A. & SANT'ANNA, C.L.** 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 97-112.
- TUCCI, A., SANT'ANNA, C.L. GENTIL, R.C. & AZEVEDO, M.T.P.** 2006. Fitoplâncton do Lago das Garças, São Paulo, Brasil: um reservatório urbano eutrófico. *Hoehnea* 33: 147-175.
- TUNDISI, J. G.** 2005. Gerenciamento Integrado de Bacias Hidrográficas e Reservatórios. *In*: NOGUEIRA, Marcos Gomes et al.(Org.). *Ecologia de reservatórios: Impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata*. São Carlos : FUNDIBIO, pp. 19-38.
- TUNDISI, J.G.** 2003. *Água no Século XXI: Enfrentando a Escassez*. Rima, São Carlos.
- VAN APELDOORN, M.E., VAN EGMOND, H.P., SPEIJERS, G.J.A. & BAKKER, G.J.I.** 2007. Review – Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res* 51: 1-60.
- VIEIRA, J.M.S., AZEVEDO, M.T.P., AZEVEDO, S.M.F.O., HONDA, R.Y. & CORRÊA, B.** 2005. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazônia region. *Toxicon* 45: 901-909.
- VISSER, P.M., IBELINGS, B.W., MUR, L.R. & WALSBY, A. E.** 2005. The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *In*: J. Huisman, H.C.P. Matthijs and P.M. Visser (eds.), *Harmful Cyanobacteria*, pp. 109-142.
- WHITTON, B. A. & POTTS, M.** 2000. *The Ecology of Cyanobacteria their diversity in time and space*. Kluwer academic publishers, Netherlands.

- WIEGAND, C. & PFLUGMACHER, S.** 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and applied pharmacology* 203: 201-218.
- ZAGATTO, P.A. & ARAGÃO, M.A.** 1992. Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relatório Técnico, pp. 23.

RESUMO - (Estudos taxonômicos *in vitro* e prospecção de toxinas de cepas de cianobactérias isoladas de reservatórios do Estado de São Paulo). As cianobactérias são organismos procariontes que sintetizam numerosas substâncias bioativas e são comumente encontradas em corpos de água doce, podendo formar florações. Suas toxinas podem permanecer na água, deteriorando a sua qualidade, ou ainda, podem ser bioacumuladas na cadeia trófica. Dessa maneira, com o objetivo de identificar, acompanhar a variabilidade morfológica e investigar a potencial produção de toxinas foram estudadas seis cepas de cianobactérias, provenientes de diferentes corpos d'água do Estado de São Paulo, em especial, de três reservatórios destinados ao abastecimento público: Guarapiranga, Billings e Atibainha. As cepas foram mantidas na Coleção de Cultura de Cianobactérias do Instituto de Botânica (CCIBt) em condições controladas e constantes de: temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância de $40\text{--}50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 14 - 10h claro-escuro, em meio de cultura líquido ASM-1. A cada 30 dias, durante a repicagem, foram retiradas alíquotas para a observação dos organismos. Parte deste material foi mantida viva e parte fixada com formol a 4% para posterior análise. A análise taxonômica foi realizada em microscópio óptico com retículo micrometrado e câmera fotográfica acoplados. Para a pesquisa de cianotoxinas foram cultivados 10 litros de biomassa de cada cepa. Estes foram submetidos à extração com ácido acético 0,1M e com metanol 100% para a pesquisa de microcistinas, saxitoxinas e betametilaminoalanina por cromatografia planar; além do teste para detecção de toxinas desconhecidas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). As cianobactérias foram identificadas como: *Cyanosarcina* sp. (CCIBt3085), isolada do reservatório Guarapiranga; *Rhabdoderma sancti-pauli* Azevedo *et al.* (CCIBt3244), proveniente do reservatório Billings; *Leptolyngbya angustissima* (West & G.S.West) Anagnostidis & Komárek (CCIBt3102) procedente do reservatório de Atibainha; *Phormidium formosum* (Bory *ex* Gomont) Anagnostidis & Komárek (CCIBt3246), isolada do Lago das Garças (Instituto de Botânica, SP) e (CCIBt 3163) proveniente de um lago de piscicultura de Ribeirão Preto; *Calothrix elenkinii* Kossinskaja (CCIBt3287), isolada de amostra de viveiro de piscicultura em Pindamonhangaba. As cepas CCIBt 3246 e CCIBt 3163 identificadas como *Phormidium formosum* apresentaram diferentes resultados toxicológicos, os extratos de CCIBt 3163 apresentaram neutotoxicidade, e os extratos de CCIBt 3246 não. O extrato ácido de CCIBt 3163 apresentou resultado positivo para saxitoxina e o extrato metanólico apresentou atividade anticolinesterásica. As cepas de *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3085), *Rhabdoderma sancti-pauli* (CCIBt 3244), *Phormidium formosum* (CCIBt 3246) e *Calothrix elenkinii* (CCIBt 3287) apresentaram resultados positivos para a presença do aminoácido neurotóxico

betametilaminoalanina, relacionado, recentemente, à doença de Alzheimer. Em nenhum dos extratos estudados foi detectada a presença de microcistinas ou anatoxinas. Quanto a distribuição das espécies no Estado de São Paulo *Calothrix elenkini* é primeira citação para o Estado; *Cyanosarcina* sp., *Rhabdoderma sancti-pauli*, *Leptolyngbya angustissima* e *Phormidium formosum* constituem novas ocorrências para os respectivos ambientes de origem.

Palavras-chave: betametilaminoalanina, *Calothrix*, cianotoxinas, *Cyanosarcina*, *Phormidium*, *Rhabdoderma*.

ABSTRACT - (Taxonomic studies *in vitro* and survey of toxins of strains of cyanobacteria from reservoirs in the State of São Paulo). Cyanobacteria are prokaryotic organisms that synthesize numerous bioactive substances and are commonly found in freshwater bodies and can form blooms. Their toxins can remain in the water, deteriorating its quality, or may bioaccumulate in the trophic chain. Therefore, in order to identify, monitor the morphometric variability and investigate the potential production of toxins, six strains of cyanobacteria from different water bodies of the State of São Paulo, in particular, from three reservoirs used for the public water supply, namely Guarapiranga, Billings and Atibainha, were studied. The strains were maintained in the Cyanobacteria Culture Collection of the Institute of Botany (CCIBt) under controlled and constant conditions: temperature $23 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiance of $40\text{-}50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 14 - 10h chiaro-scuro in liquid ASM-1 culture medium. Every 30 days, during subculturing, aliquot parts were taken to observe the organisms. Part of this material was kept alive and part preserved with 4% formaldehyde for further analysis. The taxonomic analysis was performed using an optical microscope with micrometer and photography camera attached. For the study of cyanotoxins, 10 liters of biomass of each strain were grown. The biomass was submitted to extraction with 0.1 M acetic acid and 100% methanol for the detection of microcystins, saxitoxins and beta-methylamino-alanine through planar chromatography, in addition to test for detecting unknown toxins according to the World Health Organization (WHO). The cyanobacteria were identified as: *Cyanosarcina* sp. (CCIBt3085), isolated from the Guarapiranga reservoir; *Rhabdoderma sancti-pauli* Azevedo *et al.* (CCIBt3244), from the Billings reservoir; *Leptolyngbya angustissima* (West & GSWest) Anagnostidis & Komárek (CCIBt3102) from the Atibainha reservoir; *Phormidium formosum* (Bory *ex* Gomont) Anagnostidis & Komárek (CCIBt3246), isolated from the Lago das Garças (Institute of Botany, SP) and (CCIBt 3163) from a fish farming pond in Ribeirão Preto; *Calothrix elenkinii* Kossinskaja (CCIBt 3287), isolated from a sample from a fishpond in Pindamonhangaba, SP. The strains CCIBt 3246 and CCIBt 3163 identified as *Phormidium formosum* showed different toxicological findings, the extracts of CCIBt 3163 showed neurotoxicity and the extracts of 3246 CCIBt did not. The acid extract of CCIBt 3163 tested positive for saxitoxin, and the methanol extract presented anticholinesterase activity. The strains of *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3085), *Rhabdoderma sancti-pauli* (CCIBt 3244), *Phormidium formosum* (CCIBt 3246) and *Calothrix elenkinii* (CCIBt 3287) tested positive for the presence of the neurotoxic amino acid beta-methylamino-alanine, recently associated with the Alzheimer's disease. In none of the studied extracts the presence of microcystins and anatoxin was detected. As for the distribution of species in the

State of São Paulo, *Calothrix elenkinii* is the first reference to the state; *Cyanosarcina* sp. *Rhabdoderma sancti-pauli*, *Leptolyngbya angustissima* and *Phormidium formosum* are new occurrences in their home environments.

Keywords: beta-methylamino-alanine, *Calothrix*, *Cyanosarcina*, cyanotoxins, *Phormidium*, *Rhabdoderma*

ANEXO



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

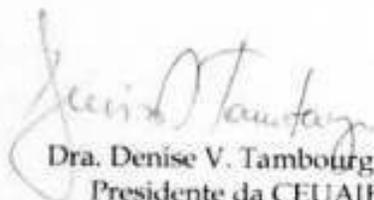
Certificamos que o Projeto intitulado “Estudos químicos e biológicos de cepas de cianobactérias” **protocolo n° 385/07**, sob a responsabilidade de Marisa Rangel e Luciana Retz de Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **10/04/2007**

We certify that the research entitled “Chemical and biological studies of cyanobacteria species”, **protocol n° 385/07**, under the responsibility of Marisa Rangel and Luciana Retz de Carvalho is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of **04/10/2007**.

A CEUAIB autorizou as mudanças solicitadas pela pesquisadora, ou seja, aditivo para a espécie de camundongos.

Vigência do Projeto	N. de animais/especie	ADITIVO
04/2007 - 01/2013 Laboratório de Imunopatologia	250 camundongos Swiss Machos	280 camundongos Swiss Machos

São Paulo, 11 de fevereiro de 2011.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB