UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Prospecção de compostos orgânicos voláteis e seus efeitos na auto-regulação fisiológica em cianobactérias

Simone Vieira da Silva

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Prospecção de compostos orgânicos voláteis e seus efeitos na auto-regulação fisiológica em cianobactérias

Simone Vieira da Silva

Versão original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Silva, Simone Vieira da
S586p Prospecção de compostos orgânicos voláteis e seus efeitos na auto-regulação fisiológica em cianobactérias / Simone Vieira da Silva. -- São Paulo, 2017.
1v. (Várias paginações)

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Pinto, Ernani

1. Toxicologia ambiental 2. Compostos orgânicos voláteis. I. T. II. Pinto, Ernani, orientador.

615.9 CDD

Simone Vieira da Silva

Prospecção de compostos orgânicos voláteis e seus efeitos na auto-regulação fisiológica em cianobactérias

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Ernani Pinto Junior
Orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

RESUMO

SILVA, S. V. **Prospecção de compostos orgânicos voláteis e seus efeitos na auto-regulação fisiológica em cianobactérias**.150p. 2017.Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Apesar dos diversos estudos sobre a presença de cianobactérias e a correlação entre fatores ambientais que influenciam ou desencadeiam florações, é ainda incipiente a informação sobre o controle fisiológico e bioquímico da produção de metabólitos secundários, cianotoxinas e compostos orgânicos voláteis (COVs) nestes organismos. Os COVs mais comumente encontrados em cianobactérias são a geosmina e o 2-metil-isoborneol, compostos que resistem ao tratamento convencional da água, causam mau cheiro e alteram seu gosto, além de bioacumular em peixes e moluscos. Estudos sobre possíveis sistemas de competição (alelopatia) entre linhagens de cianobactérias, ou entre elas e outros organismos, podem contribuir para elucidação do papel da produção de COVs por cianobactérias. Dessa forma, os objetivos deste projeto foram (i) prospectar a produção de COVs e seus efeitos na auto-regulação fisiológica em cianobactérias mantidas em laboratório; e (ii) desenvolver um método analítico, por microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS), para a determinação destes compostos. Foram realizados ensaios para avaliar os perfis de produção dos COVs em duas linhagens de *M. aeruginosa* em diferentes fases de crescimento, sob diferentes intensidades luminosas (50, 150 e 250 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}) e também ao longo do ritmo circadiano, avaliando a influência dos períodos claro e escuro. Para avaliar efeitos alelopáticos, exsudatos de uma linhagem de *M. aeruginosa* produtora de microcistinas foram testados em culturas de outra linhagem de *M. aeruginosa* não produtora de toxinas por meio de técnicas tradicionais de cultivo com monitoramento do crescimento. Na análise da produção de COVs, por GC-MS, observou-se que se destacam, majoritariamente, os compostos α-ciclocitral, β-ciclocitral e β-ionona, sendo o β-ciclocitral o mais abundante, em todas as condições testadas, para as ambas as linhagens estudadas. A linhagem não toxigênica, no entanto, apresentou produção mais elevada de todos os compostos identificados. Dentre as intensidades luminosas testadas, a intensidade de 250 µmol.fótons.$m^{-2}s^{-1}$ foi a que apresentou a maior taxa de crescimento para a linhagem LTPNA 08 e relação negativa entre o aumento da irradiância e a produção de β-ciclocitral. Foram identificadas, também, variações na produção dos compostos α-ciclocitral, β-ciclocitral e β-ionona nas linhagens ao longo do ritmo circadiano, sendo as maiores concentrações encontradas no período escuro. Observou-se morte celular e redução na produção de COVs 24 horas após adição de exsudatos pertencentes à linhagem de *M. aeruginosa* toxigênica em cultivos da linhagem não-toxigênica. Sendo assim, pode-se inferir que a produção dos COVs pode sofrer alterações qualitativas e quantitativas dependendo do estímulo ambiental presente, tanto por interações bióticas (com outros organismos e ritmo circadiano), quanto por fatores abióticos (intensidade luminosa).

Palavras-chaves: cianobactérias; metabólitos secundários; compostos orgânicos voláteis, alelopatia, *Microcystis aeruginosa.*

ABSTRACT

SILVA, S. V. **Prospection of volatile organic compounds and their effects on physiological self-regulation in cyanobacteria**. 150p. 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

There are several studies on the presence of cyanobacteria and the correlation between environmental factors that may influence or trigger blooms. However, information concerning the physiological and biochemical control of the production of secondary metabolites, toxins and volatile organic compounds (VOC) by cyanobacteria is poorly understood. Geosmin and 2-methyl-isoborneolare are commonly found VOC in cyanobacteria, they resist to conventional water treatment and can cause bad smell and taste in the final water. In addition, VOC can bioaccumulate in fish and shellfish. Studies on possible competition systems (allelopathy) either among strains of cyanobacteria or among them and other organisms such as green microalgae, may help to elucidate the role of VOC production by cyanobacteria. Thus, the main objectives of this study are: (i) prospect the production of VOCs and their effects on physiological self-regulation in cyanocrobacteria kept in the laboratory; and (ii) to develop an analytical method, by solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography with mass spectrometry detection (GC-MS), for the determination of these compounds. The assays were carried out to evaluate the production profiles of VOCs in two strains of M. aeruginosa at different growth stages under different light intensities (50, 150 and 250 µmol.fótons.m-2.s-1) and also along of the circadian rhythm, evaluating the influence of light and dark periods. To assess allelopathic effects, exudates from a microcystin-producing strain of *M. aeruginosa* were tested on cultures of another non-toxin producing *M. aeruginosa* strain by traditional growth monitoring culture techniques. In the analysis of VOC production by GC-MS, it was observed that α-cyclocyclal, β-cyclocyclal and β-ionone compounds were the most prominent, with β-cyclocitral being the most abundant in all conditions tested, for both strains studied. The non-toxigenic lineage, however, showed higher production of all the identified compounds. Among the light intensities tested, the intensity of 250 µmol.fótons.m-2s-1 was the one with the highest growth rate and positive relation between the irradiance increase and the β-cyclocitral production. Variations in the production of the α-cyclocyclal, β-cyclocyclal and β-ionone compounds were also identified in the lines along the circadian rhythm, being the highest concentrations found in the dark period. Cell death and reduction in VOC production were observed 24 hours after addition of exudates belonging to the toxigenic *M. aeruginosa* lineage in cultures of the non-toxigenic lineage. Thus, it can be inferred that the production of VOCs can undergo qualitative and quantitative changes depending on the environmental stimulus present, both by biotic interactions (with other organisms and circadian rhythm) and by abiotic factors (luminous intensity).

Keywords: Secondary metabolites, Cyanobacteria, Volatile compounds, Allelopathy, *Microcystis aeruginosa.*

À minha amada MÃE,

Pelo amor, dedicação e apoio incondicional!

EU TE AMO!

Ao meu esposo Marcelo,

por sempre me incentivar a ir em busca dos meus sonhos e por sempre estar ao meu lado.

AMO VOCÊ!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre fizeram de tudo por mim e meus irmãos. Em especial, à minha mãe, que após o falecimento do meu pai, se dedicou incansavelmente, para criar e nos dar o melhor. A senhora me enche de orgulho, e sem dúvidas, é minha maior inspiração. Obrigada por ser minha mãe e por me ensinar diariamente com seus exemplos de vida, carinho e amor a ser uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos, Domingas, José, Fran e Maria, por todo cuidado, zelo e por nunca medirem esforços para me ajudar.

Ao meu esposo, companheiro de vida e melhor amigo, obrigada por sempre me incentivar e me fazer acreditar que sonhar sempre valerá a pena. Por se dedicar a nossa família e ser o melhor esposo e pai que nosso filho poderia ter. Muito obrigada, também, por ter me dado uma nova família, sempre pronta a me ajudar.

Ao professor Ernani, pela orientação, incentivo, oportunidade de crescer profissionalmente e pessoalmente, mas principalmente pela amizade construída ao longo do tempo. Não tenho palavras para agradecer o que fez por mim.

Á Miriam (minha espanhola preferida), minha grande amiga, obrigada por estar presente em tantos momentos importantes, da aprovação do projeto de doutorado ao nascimento de Joaquim, obrigada por tudo.

Ao meu amigo Gustavo, por ser meu confidente, ombro amigo e mãos em todas as etapas de desenvolvimento do projeto.

Aos amigos Marcelo, Tom e Mayara, que mesmo à distância, se fizeram presentes, amo vocês!

Aos colegas e ex-colegas de laboratório Fabiane, Raquel, Kazumi, Carlos, Felipe, Ariane, Vânia, Bárbara, Bruna, Érika, Giovanna, Thyago, Marcelo pela convivência diária no laboratório, pela companhia nos momentos de lazer, mas principalmente pela amizade construída ao longo do tempo.

Aos meninos dos serviços de manutenção João e Reginaldo que sempre estiveram dispostos a ajudar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e pela bolsa concedida, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo auxílio financeiro.

O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.

Dalai Lama

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principais toxinas produzidas por cianobactérias..... 26

Figura 2: Compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por cianobactérias e microalgas. 28

Figura 3: (A) Dispositivo básico empregado na técnica de SPME. **(B)** Esquema interno de um dispositivo de SPME. **(C)** Ilustração da fibra que contém a fase extratora. 33

Figura 4: Vials de 20mL com 10 mL de solução estoque (SS4) contendo padrões de β- Ionona, geosmina e 2-metilisoborneol (concentração de 1000ng.mL^{-1}) para análise de cinco fibras de composições diferentes 41

Figura 5: Vials de 20mL com 10 mL de: **A)** água e Solution Stock SS4 contendo os padrões nas diluições 1000 ng.mL^{-1}, 500 ng.mL^{-1}, 250 ng.mL^{-1}, 100 ng.mL^{-1}, 50 ng.mL^{-1}, 10 ng.mL^{-1} e **B)** água, SS4 contendo padrões e NaCl nas diluições 1000 ng.mL^{-1}, 500 ng.mL^{-1}, 250 ng.mL^{-1}, 100 ng.mL^{-1}, 50 ng.mL^{-1}, 10 ng.mL^{-1} 43

Figura 6: Represa Billings, Riacho Grande, SP 44

Figura 7: Amostragem fitoplanctônica. **A**- Represa Billings, **B**- arrasto horizontal em rede de fitoplâncton, **C**- filtragem de 30 L em rede de fitoplâncton, **D** e **E**- concentrado de células algais. 45

Figura 8: Microextração em fase sólida (SPME) em combinação com a a Cromatatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS).... 47

Figura 9: Crescimento de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08 ao longo de 30 dias. 49

Figura 10: Crescimento de cianobactérias em diferentes (50, 150 e 250 µmoles de fótons.m^{-2}.s^{-1})..... 49

Figura 11: Controle e tratamento (com β- ionona) de *Microcystis aeruginosa* LTPNA 01 e *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08 51

Figura 12: A. Ritmo circadiano de duas linhagens (tóxicas e não tóxicas) de *M. aeruginosa*, **B.** mantidas no período de 48 horas com amostragens a cada três horas 53

Figura 13: (A) Controle: cultivo das linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *M. aeruginosa* LTPNA 01, em sistemas individuais (frascos de acrílico),

separados e, **(B)** Tratamento, LTPNA 01 crescendo em interação com LTPNA 08. 54

Figura 14: Esquema representativo – **(A)** culturas das linhagens LTPNA 01 e 08 mantidas por 15 dias; **(B)** obtenção de exsudatos das linhagens por centrifugação e filtração; **(C)** reconstituição dos filtrados com sais do meio ASM-1; **(D)** sete tempos amostrais iniciados com o mesmo número de células (2,0x 10^7cél/mL), separados em Tratamento (com adição de 50 mL de exsudato concentrado) e Controle (sem adição de exsudatos). 56

Figura 15: Cromatogramas obtidos por GC-MS no modo SCAN (A) e SIM (B, D, F) e espectro de massas (C, E e G) dos compostos β- Ionona, geosmina e 2-MIB..... 60

Figura 16: Comparação da resposta de diferentes fibras extratoras (DVB/CAR/PDMS -Gray; PDMS/CAR- Black; DVB/PDMS- Blue; DVB/PDMS- Pink; PA – White) a uma mesma concentração (1000ng.mL-1) da solução estoque (SS4) contendo padrões de β- Ionona, geosmina e 2-metilisoborneol: (A) sem adição de sal e (B) com adição..... 62

Figura 17: Cromatogramas obtidos por GC-MS, no modo SCAN dos compostos β- Ionona, geosmina e 2-MIB contendo padrões de β- Ionona, geosmina e 2-metilisoborneol com adição, concentrados por diferentes fibras de SPME: **A**. fibra de Polidimetilsiloxano/Carboxano- 75µm (PDMS/CAR)- (Black); **B**. fibra de Divinilbenzeno/Polidimetilsiloxano (DVB/PDMS) 65µm- (Pink); **C.** fibra de Poliacrilato- 85µm (PA) (White). **D.** fibra de Divinilbenzeno/Polidimetilsiloxano – 65µm (DVB/PDMS) (Blue); **E.** fibra de Divinilbenzeno/Carboxano/Polidimetilsiloxano- 50/30µm (DVB/CAR/PDMS) (Gray). 65

Figura 18: Comparação de extração dos compostos β- Ionona (βI), geosmina (GEO) e 2-metilisoborneol (MIB) com a fibra de DVB/CAR/PDMS (Gray) em diferentes diluições (500 ng.mL^{-1}, 250 ng.mL^{-1}, 100 ng.mL^{-1}, 50 ng.mL^{-1}, 10 ng.mL^{-1}) sem a adição de sal (MIB; GEO; βI) e com a adição de sal (MIB+ sal; GEO+ sal; βI+ sal)..... 67

Figura 19: Cromatogramas obtidos por GC-MS no modo SCAN do perfil de COVs produzidos por A. *M. aeruginosa* (LTPNA 01), B. *M. aeruginosa* (LTPNA 08), C. *Limnothrix redekei* (LTPNA 07) e D. *Cylindrospermopsis rasciborskii* (ITEP 18). Tempos de retenção: 9.06 (β- ciclocitral) e 11.44 (β- ionona)..... 69
Figura 20: Cromatogramas obtidos por GC-MS modo SCAN (A.); extração dos picos dos compostos em seus tempos de retenção: 8,625 para o composto β- ciclocitral (B.) e 11.100 para o composto β- Ionona (D.) e seus respectivos ions (C. e E.)..... 71

Figura 21: Cromatogramas obtidos por GC-MS modo SCAN (A.) e extração dos íons nos tempos de retenção 8,625 para o composto β- ciclocitral (B.) e o

espectro de massas obtido com o padrão de(C.) comparados com o espectro de massas encontrados na biblioteca NIST 72

Figura 22: Comparação entre o espectro de massas encontrado para o composto β- ionona (A.) adquiridido no modo SCAN, e o espectro de massas encontrado na biblioteca NIST (B.) 73

Figura 23: Perfil de produção dos compostos β- ionona e β- ciclocitral durante os tempos de crescimento das linhagens (A) *M. aeruginosa* LTPNA 01 e (B) *M. aeruginosa* LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3)..... 74

Figura 24: Produção de β- ciclocitral durante 30 dias de crescimento das linhagens e *M. aeruginosa* LTPNA 01 e 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3)..... 75

Figura 25: Produção de β- ionona durante 30 dias de crescimento das linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Os asteriscos representam valores de P<0,001. 76

Figura 26: Curvas de crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) cultivada sob diferentes intensidades luminosas 50, 150 e 250 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. 78

Figura 27: Curvas de crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) cultivada sob diferentes intensidades luminosas 50, 150 e 250 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. 79

Figura 28: Produção de β-ciclocitral durante os tempos de crescimento (T6, T12, T18) da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) 80

Figura 29: Produção de β- ionona durante os tempos de crescimento (T6, T12, T18) da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3)..... 81

Figura 30: Produção de β- ciclocitral durante os tempos de crescimento (T6, T12, T18) da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) 82

Figura 31: Produção de β- ionona durante os tempos de crescimento (T6, T12, T18) da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3)..... 83

Figura 32: Cromatograma obtido por GC-MS modo SCAN (A.) e extração dos íons nos tempos de retenção 7.883 para o composto α- ciclocitral; 9.032 para o composto β- ciclocitral e 11.501 para o composto β- ionona e seus respectivos espectros de massas (B, C e D). 86

Figura 33: Curvas de calibração de **(A)** β-ciclocitral e **(B)** β-ionona, construídas com padrões analíticos em análises realizadas por GC/MS. 87

Figura 34: Gráficos das concentrações dos compostos α- ciclocitral (vermelho), β- ciclocitral (preto) e β-ionona (azul) ao longo do ritmo circadiano de *Microcystis aeruginosa* LTPNA 01 sob intensidades luminosas de **A.** 50 e **B.** 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h 89

Figura 35: Produção do composto β- ciclocitral ao longo do ritmo circadiano de LTPNA 01 entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h..... 91

Figura 36: Produção do composto β- ionona ao longo do ritmo circadiano de *M.aeruginosa* LTPNA 01 entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h 92

Figura 37: Produção do composto α- ciclocitral ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* LTPNA 01 entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h 93

Figura 38: Gráficos das concentrações dos compostos α- ciclocitral (vermelho), β- ciclocitral (preto) e β-ionona (azul) ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* **LTPNA 08** sob intensidades luminosas de **A.** 50 e **B.** 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h..... 94

Figura 39: Produção do composto β- ciclocitral ao longo do ritmo circadiano de *M.aeruginosa* **LTPNA 08** entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h 95

Figura 40: Produção do composto β- ionona ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* **LTPNA 08** entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h 96

Figura 41: Produção do composto α- ciclocitral ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* **LTPNA 08** entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3).

Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h 97

Figura 42: Gráficos das concentrações dos compostos **A)** α- ciclocitral, **B)** β-ciclocitral e **C)** β-ionona ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* **LTPNA 01 e LTPNA 08** sob intensidade luminosa de **50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}**. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h..... 99

Figura 43: Gráficos das concentrações dos compostos A) β- ciclocitral, B) β-ionona e C) α- ciclocitral ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e LTPNA 08 sob intensidade luminosa de 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). β- ciclocitral: T1 e T14 (P<0,05), T2, T7, T8, T10 e T13 (P<0,001), α- ciclocitral: T2, T12 (P<0,05), T7, T8 e T15 (P<0,001) 101

Figura 44: Curvas de crescimento de **A.** *M. aeruginosa* (LTPNA 01) e **B.** *M. aeruginosa* (LTPNA 08) em condições de cultivo: Controle - sem adição de padrão eTratamento – com adição de padrão 104

Figura 45: Cromatograma representativo do perfil de COVs das linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08, na condição tratamento, obtido por GC-MS modo SCAN. 106

Figura 46: Comparação entre resposta (área) do composto β- ciclocitral nas condições controle e tratamento durante o tempo de crescimento de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Os asteriscos representam valor de P<0,001 no tempo T12 e P<0,05 no tempo T18..... 107

Figura 47: Comparação entre resposta (área) do composto β-ionona nas condições controle e tratamento durante o tempo de crescimento de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Os asteriscos representam valor de P<0,001 nos tempos T6 e T12. 108

Figura 48: Comparação entre resposta (área) do composto β- ciclocitral (A) nas condições controle (C) e tratamento (T) durante o tempo de crescimento de LTPNA 08 (A) e LTPNA 08 (B). Os asteriscos representam valor de P<0,001 nos tempos T15 e tempo T18. 108

Figura 49: Comparação entre resposta (área) do composto β-ionona nas condições controle e tratamento durante o tempo de crescimento de LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Os asteriscos representam valor de P<0,001 no tempo T16 e P<0,05 no tempo T18..... 109

Figura 50: Comparação entre resposta (área) dos compostos (A) β-ciclocitral e (B) β-ionona nas condições controle e tratamento durante o tempo de crescimento de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08. Os dados

são média mais desvio padrão (n=3). Os asteriscos representam valor de P<0,01 nos tempos T12 e T15 e P<0,001 no tempo T18..... 110

Figura 51: Formação de β-ionona e β-ciclocitral a partir do β-caroteno..... 111

Figura 52: Curva de crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) obtida a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do (A) Controle: crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 e, B- Tratamento: células de LTPNA 01 em crescimento com interação das linhagens com separação de membrana de diálise entre os frascos de cultura. Os dados são média mais desvio padrão (n=3)..... 113

Figura 53: Curva de crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) obtida a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do (A) Controle: crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 e, B- Tratamento: células de LTPNA 01 em crescimento com interação das linhagens com separação de membrana de diálise entre os frascos de cultura. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Test-T: P <0,001 para os tempos 4,6 e 8. 114

Figura 54: Perfil da produção de COVs a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 8 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do **A-** Controle: crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 e, **B-** Tratamento: células de LTPNA 01 em crescimento com interação das linhagens com separação de membrana de diálise entre os frascos de cultura. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) normalizados com a área do padrão interno. 115

Figura 55: Gráficos da produção de COVs a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do controle da LTPNA 01 comparados com os dados do tratamento da LTPNA01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) normalizados com a área do padrão interno. 117

Figura 56: Gráficos da produção de COVs a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do A- Controle: crescimento isolado das células de LTPNA 08 e, B- Tratamento: células de LTPNA 08 em crescimento com interação das linhagens com separação de membrana de diálise entre os frascos de cultura. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) normalizados com a área do padrão interno. 118

Figura 57: Gráficos da produção de COVs a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do controle da LTPNA 08 comparados com os dados do tratamento da LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) normalizados com a área do padrão interno. 120

Figura 58: Gráficos da produção de COVs a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do Tratamento da LTPNA 01 comparados com os dados do tratamento da LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) normalizados com a área do padrão interno. 121

Figura 59: Crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) ao longo de 10 dias. Controle: crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 e, Tratamento: células de LTPNA 01 com meio ASM-1 e exsudatos de LTPNA 08. 123

Figura 60: Curva de crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) ao longo de 10 dias. Controle: crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 e, Tratamento: células de LTPNA 01 com meio ASM-1 e exsudatos de LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). 123

Figura 61: Cromatograma representativo do perfil de COVs de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) observado em estudo ao longo de 10 dias. 125

Figura 62: Perfil estatístico da produção de compostos orgânicos voláteis após adição de exsudatos ao longo de 10 dias. A- crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 (não toxigênica); B- crescimento com exsudatos obtidos da linhagem toxigênica (LTPNA 08) com meio ASM-1 corrigido e células de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) das áreas normalizadas obtidas da integração dos picos cromatográficos.. 127

Figura 63: Produção de β-ciclocitral ao longo de 10 dias: A: Controle - crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 (não toxigênica); B:Tratamento- crescimento com exsudatos obtidos de linhagem toxigênica (LTPNA 08) com meio ASM-1 corrigido e células de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Test-T *=P<0,05, ** =P<0,01; *** P<0,001)..... 129

Figura 64: Produção de β-ionona ao longo de 10 dias: Controle - crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 (não toxigênica); Tratamento- crescimento com exsudatos obtidos de linhagem toxigênica (LTPNA 08) com meio ASM-1 corrigido e células de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Test-T *=P<0,05, ** =P<0,01; *** P<0,001). 131

Figura 65: Produção de Safranal ao longo de 10 dias: Controle - crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 (não toxigênica); Tratamento- crescimento com exsudatos obtidos de linhagem toxigênica (LTPNA 08) com meio ASM-1 corrigido e células de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Test-T *=P<0,05, ** =P<0,01; *** P<0,001). 131

Figura 66: Produção de α-ciclocitral ao longo de 10 dias: Controle - crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 (não toxigênica);

Tratamento- crescimento com exsudatos obtidos de linhagem toxigênica (LTPNA 08) com meio ASM-1 corrigido e células de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Test-T *=P<0,05, ** =P<0,01; *** P<0,001). 133

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Relação de cores e fibras de diferentes composições..... 41
Tabela 2: Relação de linhagens testadas quanto à produção de compostos orgânicos voláteis 46
Tabela 3: Componentes meio de cultivo ASM-1 utilizado na manutenção das culturas..... 48
Tabela 4: Dados obtidos por GC/MS de compostos orgânicos voláteis de *M. aeruginosa* 126

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17

1.1. Eutrofização, cianobactérias e produção de metabólitos secundários 23

1.2. Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) produzidos por Cianobactérias 26

1.3. Ferramentas analíticas para detecção de Compostos Orgânicos Voláteis .. 30

1.4. Vantagens e Limitações do método de SPME 33

2. OBJETIVOS 35

2.1. Geral 35

2.2. Específicos 35

3. MATERIAL E MÉTODOS 37

3.1. Métodos Analíticos 37

3.1.1 Padrões e reagentes 37

3.1.2. Fibras- SPME e Seleção do Modo de extração 37

3.1.3. Identificação de COVs 40

3.1.3.1. Perfil e Linearidade de β-Ionona, Geosmina e 2- Metilisoborneol 40

3.1.4. Perfil e Linearidade de β-Ionona, Geosmina e 2- MIB com adição de Sal NaCl (Método de *salting out*/ força iônica) 42

3.3. Seleção de organismos 45

3.4. Ensaios Biológicos 48

3.4.7. Determinação do crescimento por contagem de células 57

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 59

4.1. Métodos analíticos 59

4.2. Otimização das condições de SPME 62

4.3. Análise de compostos orgânicos voláteis em amostras brutas de água do ambiente (florações) 68

4.5. Perfil de produção de compostos orgânicos voláteis em diferentes tempos de crescimento de M. aeruginosa 70

4.6. Influência de diferentes intensidades luminosas sobre a produção de metabólitos voláteis em duas linhagens de Microcystis aeruginosa 78

4.6.1. Efeitos sobre o crescimento 78

4.6.2. Efeitos sobre a produção de COVs 80

4.7- Efeitos da intensidade luminosa (50 e 150 µmol.fótons.m-2.s-1) sobre o ritmo circadiano da produção de compostos voláteis de M. aeruginosa (LTPNA 01 e LTPNA 08) 84

4.8.1- Efeitos de β- ionona (composto comercial) sobre o crescimento de M. aeruginosa 102

4.8.1.1 Efeitos de β- ionona sobre a produção de COVs 106

5. CONCLUSÕES 134

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 136

7. ANEXOS 141

1. INTRODUÇÃO

1.1. Eutrofização, cianobactérias e produção de metabólitos secundários

Em decorrência do crescimento populacional e da ocupação desordenada das margens das bacias hidrográficas, aliados ao desenvolvimento de atividades agrícolas e industriais, ocorre a eutrofização de diversos sistemas aquáticos, inclusive mananciais usados como fonte de água no abastecimento público [1,2]. A eutrofização é um dos estados de sucessão dos ecossistemas de lagos, represas ou grandes porções de água, que ocorre ao longo dos anos [3]. Também pode ser definida como o processo que resulta no enriquecimento do ambiente aquático com nutrientes, principalmente compostos contendo nitrogênio e fósforo [1,2,4,5]. Naturalmente, seriam necessários séculos para que um ambiente oligotrófico (baixas concentrações de nutrientes) passasse a apresentar condições hipertróficas (altas condições de nutrientes). No entanto, com a intervenção humana, esse processo é acelerado e pode ser observado em poucas décadas [4,6,7]. Dessa forma, os nutrientes inorgânicos e resíduos orgânicos gerados pelo homem (principalmente na forma de efluentes domésticos, industriais, cargas difusas urbanas e agrícolas) são acumulados dentro de corpos d'água, promovendo condições ideais para o desenvolvimento cada vez maior de populações fitoplanctônicas, como florações de microalgas e de cianobactérias [8,9].

As cianobactérias, inicialmente classificadas como algas foram, posteriormente, reclassificadas como pertencentes ao domínio *Bacteria* em razão da natureza bacteriana de suas células. Esses micro-organismos são aeróbios, uni ou pluricelulares, coloniais ou filamentosos, com capacidade de adaptação em diversos ecossistemas, sendo esta, uma das características marcantes deste grupo. Desenvolvem-se principalmente em ambientes aquáticos (águas doce e salgada), além de estarem presentes em solos, rochas, e em ambientes extremos, como geleiras e fossas termais, bem como, associados simbioticamente a outros organismos (líquens, pteridófitas,

gimnospermas, briófitas e protozoários) auxiliando-os na fixação de nitrogênio [13,14]. A presença desses organismos em ambientes tão diversos deve-se às várias estratégias metabólicas que utilizam e que podem explicar seu sucesso em responder rapidamente a alterações na qualidade da água do meio onde vivem, tornando-se dominantes na comunidade fitoplanctônica [10,15,16,17,18].

Algumas cianobactérias apresentam como vantagem adaptativa o controle de flutuabilidade na coluna d'água por apresentarem estruturas denominadas aerótopos. Outras, podem ser fixadoras de nitrogênio atmosférico possuindo vantagem adaptativa sobre os organismos não fixadores constituintes do fitoplâncton [9,10]. Estas cianobactérias são caracterizadas por formarem células especializadas, denominadas heterócitos que se diferenciam quando há baixa concentração de compostos nitrogenados do meio. Os heterócitos tem a capacidade de fixar N_2 atmosférico, com a atuação da enzima nitrogenase. Adicionalmente, para todas cianobactérias, o principal pigmento de captação da luz solar é a clorofila-a. Como são organismos predominantemente fotoautotróficos, a luz é um dos principais fatores determinantes para o seu crescimento e metabolismo. Contudo podem se adaptar a altas variações de intensidade luminosa, parecendo ter vantagem sobre outros organismos do fitoplâncton, em ambientes eutrofizados [10].

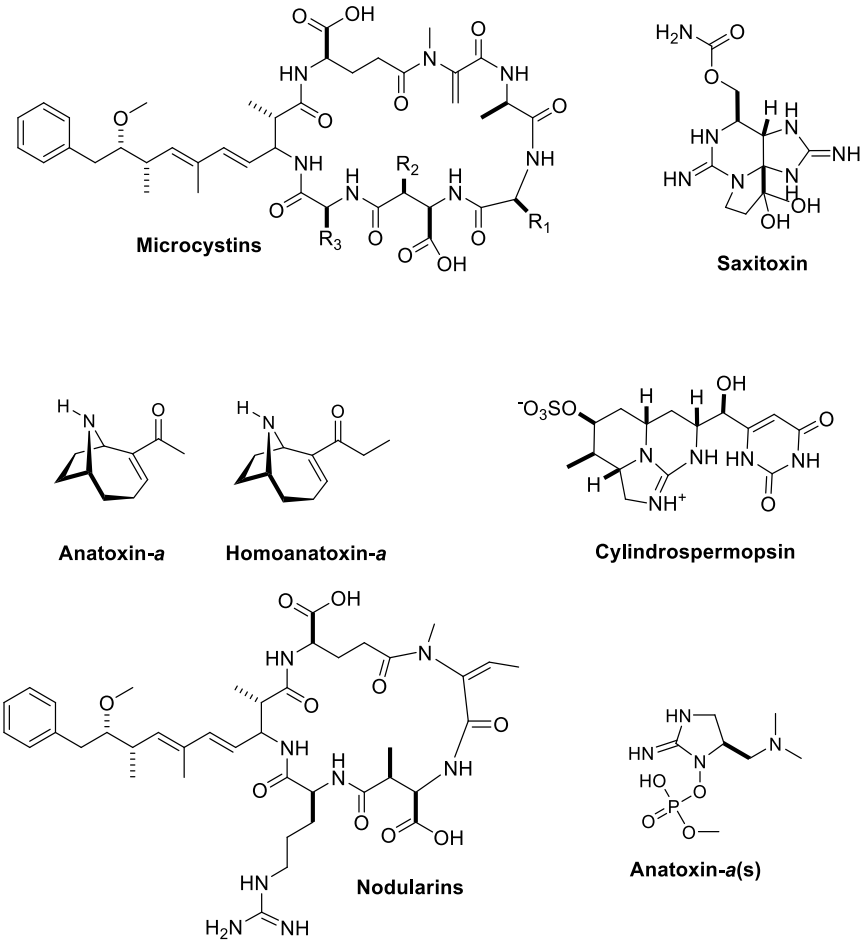
As ocorrências de florações de cianobactérias são favorecidas por fatores físicos e químicos, temperatura da água, ambientes com luminosidade, elevadas concentrações de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo e concentrações de CO_2. Este conjunto de fatores promove condições ideais para o crescimento acelerado de cianobactérias (fenômeno conhecido como floração ou *bloom*). As florações de cianobactérias geram consequências negativas sobre a eficiência e custo do tratamento da água de mananciais usados como fonte de água no abastecimento público [15,16,19,20].

As cianobactérias têm sido estudadas em diferentes áreas de pesquisa. O seu potencial uso no ramo farmacêutico, alimentício (dado seu alto valor nutritivo) e agrícola (pela influência que exercem sobre a fertilidade de solos e águas) têm sido explorados [9,21,22]. Dentro dessas várias áreas, há uma

importante vertente que consiste no estudo da capacidade desses organismos em produzir metabólitos secundários, incluindo cianotoxinas e compostos orgânicos voláteis (COVs) [23]. No entanto, o principal interesse dos estudos sobre o impacto das cianobactérias no meio ambiente está voltado ao entendimento e compreensão dos fatores ambientais que podem predizer a formação de florações, influenciar ou controlar a produção desses metabólitos secundários [16,24].

Vários gêneros de cianobactérias apresentam capacidade de produzir metabólitos secundários, os quais podem ser intracelulares e/ou extracelulares [9,25,26]. Entre esses metabólitos, estão as cianotoxinas, que permanecem dentro da célula após serem sintetizadas no citoplasma celular e algumas são liberadas na água somente após a lise ou morte celular do organismo. As cianotoxinas podem afetar a saúde humana ou animal, tanto por via oral por ingestão de água ou consumo de peixes, mexilhões ou outros alimentos contaminados (principal via de intoxicação). Há também a via inalatória por contato com aerossol em atividades de recreação no ambiente aquático [15]. As principais cianotoxinas são: anatoxinas, saxitonas e β-*N*-metilamino-*L*-alanina (BMAA); microcistinas e nodularinas, e cilindrospermopsinas; que podem ser neurotóxicas, hepatotóxicas, citotóxicas ou dermatotóxicas (Figura 01) [9,10,19,26,27].

Figura 1: Principais toxinas produzidas por cianobactérias



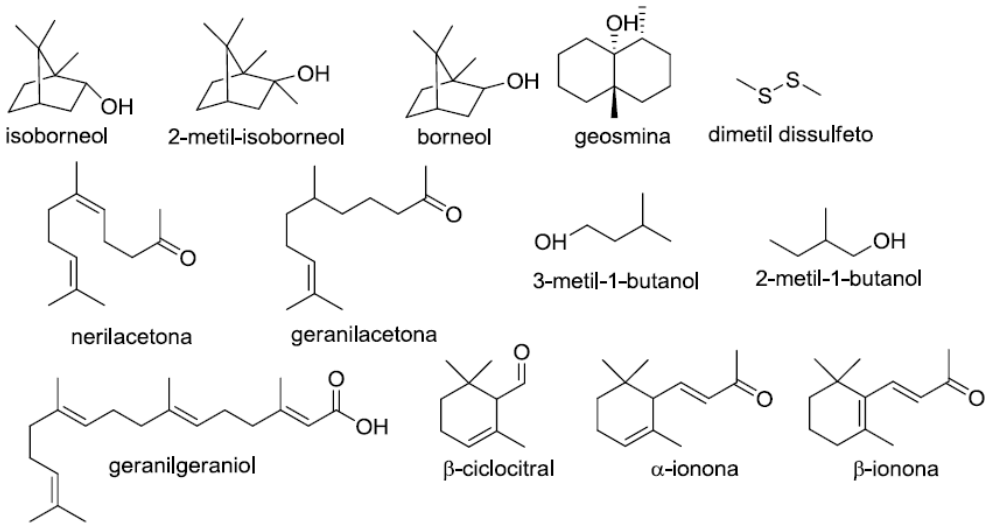
1.2. Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) produzidos por Cianobactérias

Outros metabólitos importantes produzidos por cianobactérias são os COVs. Os COVs podem ser produzidos por diferentes gêneros de cianobactérias como, por exemplo, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lynbya*, *Microcystis*, *Oscillatoria*e *Phormidium* e liberados em diferentes fases de crescimento desses organismos [10,28]. Segundo Ikawa et *al*. (2001) [29], alguns compostos identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) incluem ácidos graxos, hidrocarbonetos alifáticos, ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas, terpenóides, sulfetos e outros compostos de baixo peso molecular. Grande parte dos compostos orgânicos

voláteis produzidos por esses organismos pode servir de substrato para micro-organismos heterotróficos [30] e contribuir para o gosto e odor desagradável em águas de mananciais para abastecimento [31,32].

Os COVs mais comumente encontrados são o 2-metil-isoborneol (MIB) e o *trans*-1,10-dimetil-*trans*-9-decalol (geosmina), que são álcoois terciários com função biológica ainda não definida, embora possam ser subprodutos ou produtos intermediários do metabolismo de pigmentos [33]. Estes compostos podem ser liberados em diferentes concentrações, entretanto, detectados em concentrações de 10 $ng.L^{-1}$ [34,35,36,37]. As maiores concentrações foram observadas em células em fase de crescimento exponencial quando comparadas com células em fase estacionária de crescimento [38]. No entanto, podem variar de acordo com a linhagem de cianobactéria [39]. Alguns organismos, como é o caso da *Oscillatoria* e *Phormidium*, demonstraram relação proporcional entre o número de filamentos ou células com a concentração de MIB [40]. Outros compostos como os norcarotenóides iononas, β-ciclocitral, e geranilacetona são oriundos da degradação de carotenóides e são reportados como produtos de excreção de cianobactérias e algas. O β-ciclocitral e o dimetildissulfeto são largamente produzidos por espécies de *Microcystis* (Figura 02) [41,42,43,44].

Figura 2: Compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por cianobactérias e microalgas.



Fontes: IKAWA et al., 2001 [29] FUJISE et al., 2010 [43]

A relação entre a presença de metabólitos MIB e geosmina com a ocorrência de gosto e odor de terra e mofo na água é bem documentada na literatura [45]. Desde 1970, episódios em que de MIB e geosmina que alteram a qualidade da água, causando gosto de terra em peixes cultivados comercialmente [46] têm sido reportados nos Estados Unidos [47], Holanda [48] e Japão [49]. Problemas de alterações no gosto e odor em águas para consumo humano, foram relatados em regiões como a Ásia, Austrália, América do Norte e Europa [50]. Em pesquisas realizadas pela “American Water Works Association” (AWWA) foram mostrados que o odor e o sabor são os primeiros parâmetros para a aceitação da água distribuída à população, muito embora sejam considerados um problema sensorial e que nem sempre ocasionam risco à saúde humana [51]. No entanto, segundo Joe et al [52], apesar da toxicidade desses compostos não ter sido comprovada, a presença de sabor e odor na água potável, em geral, pode causar desconforto ao consumidor, originar efeitos psicossomáticos, como dores de cabeça, estresse ou problemas estomacais [37].

Apesar dos relatos em diversos trabalhos publicados sobre metabólitos oriundos de cianobactérias, os mecanismos que levam esses organismos a produzirem estes compostos ainda não são conhecidos. Alguns deles afetam tanto positiva quanto negativamente organismos da mesma espécie, bem como outros organismos de táxons diferentes, impactando na estrutura populacional dos ecossistemas [53]. Dentre estes metabólitos, encontram-se aqueles com atividade antiviral, antibiótica e anti-predatória [54,55]. Cianotoxinas, compostos orgânicos voláteis e outros metabólitos, parecem exercer algum efeito de comunicação química, intercelular, intra ou interespecífica (*quorumsensing*), bem como relacionadas com efeitos inibitórios ou estimulantes sobre outras populações (alelopatia).

Braun & Bachofen (2004), [56] com o objetivo de avaliar se a produção de cianotoxinas seria controlada por *quorum sensing*, tentaram estabelecer uma correlação entre a ocorrência de cianotoxinas e de acil-homoserinalactonas - AHL (moléculas sinalizadoras comuns em bactérias Gram negativas e relacionadas a *quorum sensing*) em dois ecossistemas naturais que predominavam *Planktothrix rubesces* e *Microcystis wesenbergii*. Em concentrações altas de microcistina, a concentração de AHL diminuiu. Quando a concentração de toxina diminuiu, a produção de AHL aumenta novamente, sugerindo que uma vez que a indução da produção de toxinas se inicie, a molécula sinalizadora seria degradada e sua concentração cairia. Quando se adiciona AHLs às culturas de cianobactérias, estes compostos desaparecem rapidamente, indicando que se ligam fortemente a componentes celulares ou que são degradados rapidamente por enzimas específicas. Assim sendo, os autores sugerem a possibilidade de que a liberação de AHL no ambiente dispare a síntese de toxinas e monitorar o nível de AHLs no ambiente poderia ser uma forma eficiente de controlar florações de cianobactérias tóxicas.

Já Kearns e Hunter (2000) [57], no estudo dos efeitos da interação entre a cianobactéria *Anabaena flos-aquae* e a clorofícea *Chlamydomonas reinhartii*, observaram que a adição de microcistina reduziu o crescimento da clorofícea e a concentração de anatoxina-a produzida pela cianobactéria aumentou na

presença da clorofícea. Além disso, frações extracelulares da clorofícea inibiram o acúmulo de microcistina pela cianobactéria.

Efeitos alelopáticos também foram associados aos COVs. Norcarotenóides, amplamente produzidos por cianobactérias da ordem Chroococcales, são predominantemente lipofílicos e apresentam efeitos alelopáticos em bactérias, fungos e cianobactérias [58]. Estudos demonstraram que a produção de COVs estaria associada a estímulos ambientais. No caso de estresse por luz, temperatura ou nutrientes, pode ocorrer tanto um aumento da produção quanto da sensibilidade a estes compostos por alguns grupos de organismos [59].

Em estudos toxicológicos envolvendo geosmina e MIB desenvolvidos por Dionigi et *al*. (1993) [60], demonstrou-se que nenhum dos dois compostos induz respostas mutagênicas, mesmo utilizando concentrações seis vezes maiores do que o limite de detecção de cada um dos compostos no ambiente. Entretanto, em estudos realizados por Huang et *al*. (2007) [53], os compostos liberados por culturas das cianobactérias *Anabaena*, *Microcystis* e *Oscillatoria,* contendo MIB e geosmina, entre outros compostos, possuem atividade mutagênica, existindo a necessidade de identificar mais precisamente todos os compostos por meio de análises químicas e toxicológicas. Os trabalhos de Höckelmann et *al*. (2004) [61] e Mochida (2009) [62] consideram muito baixa a toxicidade dos compostos MIB e geosmina aos seres humanos, porém, com efeitos tóxicos sobre outras espécies. No entanto, pouco se conhece sobre os possíveis efeitos dos COVs sobre a cadeia trófica, sobre a dinâmica de sua produção durante o crescimento celular ou mesmo sobre sua função para os organismos que os produzem [63].

1.3. Ferramentas analíticas para detecção de Compostos Orgânicos Voláteis

Os COVs são encontrados em concentrações muito baixas em amostras de água. Atualmente, a pré-concentração, a detecção e a análise quantitativa destes compostos requerem técnicas complexas e métodos analíticos que despendem muito tempo. Desta forma, uma excelente alternativa, dada a sua

seletividade, sensibilidade e eficiência, é o método de microextração em fase sólida (SPME) [64,65].

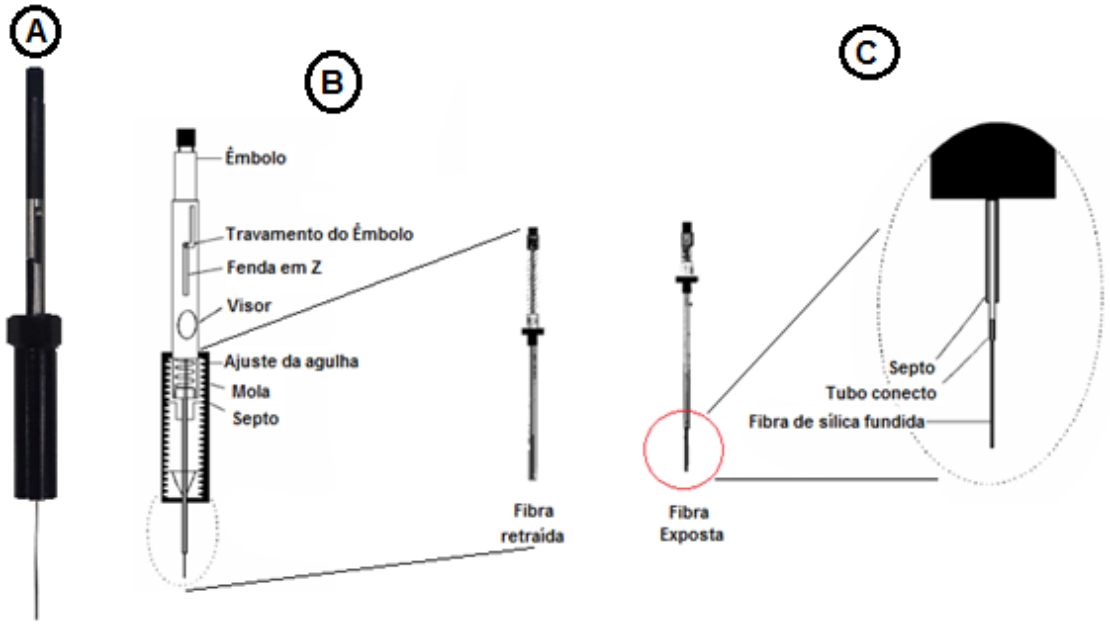
A SPME é uma microtécnica desenvolvida por Arthur e Pawliszyn em 1990 [66], que consiste em processos de extração e pré-concentração de analitos que ocorrem numa escala dimensional que não é das mais usuais, pois são empregadas concentrações muito baixas de fase extratora (solvente que pode ser um sólido ou líquido adsorvido) que extrai apenas uma pequena porção dos analitos que estão presentes na matriz, mas de maneira representativa de todo o perfil químico ali presente. Numa extração por SPME, as moléculas do analito têm que se deslocar da matriz e serem adsorvidas no polímero fixado no suporte de sílica. Para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição (ou de adsorção, para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio que a envolve. Portanto, a SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas [66,67,68]. Em SPME, dois modos de extração podem ser utilizados: a extração direta (DI-SPME) e por SPME *headspace* (HS-SPME). Na extração direta, a fibra é imersa na amostra e os analitos são transferidos da matriz para fibra com agitação constante. Já no modo por *headspace*, os analitos são transferidos (utilizando agitação e aquecimento) para a fase gasosa, antes de atingirem a fibra.

Os dispositivos SPME consistem basicamente em um pedaço de fibra de sílica fundida, com aproximadamente 13 mm de comprimento e diâmetro de até cerca de 160µm, recoberta com filmes de até 100 µm de espessura de fases poliméricas como em aglutinantes poliméricos. Essa fibra é colada na ponta de um microtubo de aço inox, adaptado a uma agulha hipodérmica (Figura 03).

Essa microtécnica em combinação com a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) é um procedimento relativamente rápido para análise de compostos presentes nas matrizes de água, possibilitando a detecção de analitos e permitindo sua identificação, quantificação e a elucidação estrutural de novas moléculas [69]. Além disso, a seletividade deste método é conseguida por uma ampla diversidade de fibras e

pelo fato de que, sendo os analitos-alvo mais voláteis que a matriz, estes volatilizam preferencialmente, podendo ser determinados sem interferentes. A sensibilidade é aumentada pelo alto poder de concentração da amostra e a eficiência é justificada pelo fato da técnica possibilitar a introdução de amostras no equipamento de GC-MS sem necessidade de pré-tratamento [64,65].

Figura 3: (A) Dispositivo básico empregado na técnica de SPME. **(B)** Esquema interno de um dispositivo de SPME. **(C)** Ilustração da fibra que contém a fase extratora.



Fonte: adaptado de Pires & Valente, 2000 [68]

1.4. Vantagens e Limitações do método de SPME

O método de SPME oferece algumas vantagens importantes, dentre elas estão:

- Rapidez e simplicidade - extração em uma única etapa, reduzindo o tempo de preparação da amostra em 70%;
- Versatilidade - apresenta seletividade de diferentes analitos disponíveis, adaptável a qualquer sistema de HPLC ou GC, fácil mecanização/automação;
- Eficiente e econômico, praticamente não utiliza solventes, além de permitir em média, mais de 50 extrações por fibra.
- Custo operacional relativamente baixo: os dispositivos comerciais para sua aplicação são consideravelmente reutilizáveis.

- A maior desvantagem de SPME, é a dependência pronunciada entre as massas extraídas e condições operacionais como temperatura e tempo de extração.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Prospectar a produção de COVs e seus efeitos na auto-regulação fisiológica em cianobactérias mantidas em laboratório; e desenvolver um método analítico, por microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS).

2.2. Específicos

- Estabelecer protocolos baseados em microextração em fase sólida (SPME) e análises por GC-MS para investigar, identificar e quantificar os COVs produzidos por cianobactérias.

- Identificar e caracterizar a produção de compostos orgânicos voláteis em linhagens isoladas, mantidas em laboratório, e de amostras ambientais.

- Avaliar o perfil de produção de COVs em monocultura e culturas mistas, em diferentes fases de crescimento, sob diferentes intensidades luminosas (50, 150 e 250 μmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}).

- Analisar o ritmo circadiano, avaliando a influência dos períodos claro e escuro sobre a produção de COVs.

- Avaliar a produção de compostos orgânicos voláteis a partir da interação entre linhagens produtoras e não produtora de toxinas.

- Avaliar se o efeito da adição dos exsudados estimula ou inibe o crescimento e a produção de COVs.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Métodos Analíticos

3.1.1 Padrões e reagentes

Foram adquiridos padrões de compostos orgânicos voláteis, β-ciclocitral, tais como β-ionona, geosmina e 2-metilisoborneol da empresa Sigma-Aldrich. Os solventes para os experimentos cromatográficos foram de grau HPLC e GC/MS, que também foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland).

3.1.2. Fibras- SPME e Seleção do Modo de extração

Os COVs foram extraídos de soluções estoque contendo padrões de β-Ionona, geosmina e 2-MIB. Para realização de análises nessa etapa do estudo, a operação foi realizada no modo de extração SPME (HS-SPME) testando dois métodos diferentes descritos por Ozaki et *al.*(2008) e Yaun et *al*. (2013) (Quadro 01). Para tal, em ambos os métodos, foram utilizados *vials* de 20 mL com 10 mL de alíquotas de cultura de cianobactérias, com 4 g de NaCl; e dispositivos para SPME (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA), contendo fibras recobertas com 50/30µm - Divinilbenzeno/Carboxano/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), para o método de Ozaki et *al.* (2008) e a fibra de 75µm-Polidimetilsiloxano/Carboxano (PDMS/CAR) e 50/30µm (DVB/CAR/PDMS) para o método de Yaun et *al*. (2013). As frações obtidas nas extrações foram analisadas por GC-MS para determinação quali e quantitativa dos compostos voláteis.

Quadro 01: Detalhamento dos parâmetros analíticos utilizados nos métodos desenvolvidos por Ozaki et al. (2008); e Yaun et al. (2013)

Autor	Métodos Cromatográficos	Especificação
Ozaki et al. (2008)	Temperatura de incubação da amostra no autoamostradorCombi PAL (CTC Analytics, Zingen, Switzerland) / Temperatura de extração	40 ºC
	Tempo de exposição das Fibras nas amostras / Tempo de extração	20 min
	Tempo de dessorção da fibra no injetor do Cromatógrafo a gás (Aglent 6890, AgilentTechonologies, Palo Alto, CA,USA) e detector Agilent 5973	10 min no modo splitless
	Coluna	HP-5MS (30m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film)
	Temperatura do injetor	250 ºC
	Condições do forno	40 ºC (1 min), de 40 ºC a 120 ºC a 10 ºC min-1, 120 a 280 ºC a 40 ºC min-1, segurando 5 min a 280 ºC
	Gás utilizado para carrear os compostos	Hélio (1 mL min-1)
	Temperatura do detector	230 ºC
	Íons monitorados no modo SIM	m/z 152 e 137 (β-ciclocitral), m/z 177 e 135 (β-ionona) e m/z 70 e 55 (3- metil-1-butanol)
Yaun et al. (2013)	Temperatura de incubação da amostra no auto-amostradorCombi PAL (CTC Analytics, Zingen, Switzerland) / Temperatura de extração	60 ºC
	Tempo de exposição das fibras nas amostras / Tempo de extração	40 min
	Tempo de dessorção da fibra no injetor do Cromatógrafo a gás (Agilent 6890, AgilentTechonologies, Palo Alto, CA, USA) e detector Agilent 5973	3 min a 230 ºC
	Coluna	DB-5MS (30m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film)
	Temperatura do forno	Início com 50 ºC por 2 min, de 5 ºC min-1 até 160 ºC e de 20 ºC min-1 até 280 ºC segurando por 8 min
	Tempo de corrida	38 min
	Fonte de íons do espectrômetro de massa e a temperatura do quadrupolo	230 ºC e 150 ºC
	Gás utilizado para carrear os compostos	Hélio (1mL min-1 / 99,9999%)
	Impacto ionização de elétrons (EI)	70 eV
	Espectro de escaneamento do MS	45 e 200
	Íons monitorados no modo SIM	m/z 95, 107,135, 150 para 2-MIB; 112, 125, 149 para geosmina

Com base em análises realizadas a partir dos métodos citados no quadro 01, foi desenvolvido um novo método baseado nos dois métodos testados. Para tal, utilizou-se dispositivos para SPME (Holder- manual ou dispositivo acoplado ao GC/MS - autoamostradorCombi PAL -CTC Analytics, Zingen, Switzerland), contendo fibras recobertas com 50/30µm - Divinilbenzeno / Carboxano / Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco Inc., Bellefonte, PA- USA). Os *vials* (10 mL de amostra de água com cianobactérias e 4g de NaCl), foram incubados durante 5 min a 60 ºC, para se obter o equilíbrio entre as células de cianobactérias, água ou meio de cultivo e a fase gasosa. Em seguida, a fibra de SPME foi inserida no vial através do septo e exposta a fase gasosa por 30 min e levada ao cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (GC-MS) para dessorção dos analitos (tempo de dessorção= 4 min), separação e detecção. As condições das análises, desde a escolha da fibra, tempo de exposição da fibra, tempo de agitação da amostra, temperatura, entre outras variáveis, foram padronizadas de acordo com as metodologias descritas por Ozaki et *al.*(2008) e Yaun et *al*. (2013).

Para essa fase, foi empregado um Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrometria de massa - GC/MS (Agilent technologies 7890A com detector seletivo de massas 5975C); uma coluna HP-5MS (30m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film; Agilent Technologies, EUA) e um injetor *split-splitless.* O injetor foi operado no modo *splitless* nas amostras de cianobactérias isoladas e no modo *split*, para amostragens ambientais e Hélio grau 5.0 foi utilizado como gás carreador (T= 26 ºC e pressão variando de 4-6 $Kgf.cm^{-2}$). A temperatura do injetor foi mantida a 250 ºC e o detector a 280 ºC. A programação de temperaturas foi a seguinte: 60 ºC por 5 min seguido de aumento de 10 ºC/min até atingir 120 ºC e então aumento de 40 ºC/min até atingir 280 ºC. O espectro de escaneamento do MS foi ajustado entre 45 e 250. Os íons foram simultaneamente monitorados no modo Scan e SIM (*m/z* 112 e 182 para geosmina, *m/z* 91 e 152 para 2- MIB, *m/z* 177 e 135 para β-ionona.

3.1.3. Identificação de COVs

A identificação dos picos foi realizada pelo tempo de retenção (através de injeções de padrões de referência comercialmente disponíveis), e espectros de massas usando-se *Automated Mass Spectrall Deconvolution and Indentifications System* (AMDIS) e o *Mass Spectral Search Program* NIST (NIST, Washington- DC, USA).

3.1.3.1. Perfil e Linearidade de β-Ionona, Geosmina e 2-Metilisoborneol

Para conhecer e traçar o perfil dos compostos β-Ionona, geosmina e 2-metilisoborneol, bem como, a linearidade dos mesmos, foi necessário o preparo de quatro soluções estoque, sendo: a primeira *Stock Solution* de β-Ionona (SS1) com concentração de 500 $mg.L^{-1}$; a segunda *Stock Solution* de β- Ionona (SS2) com concentração de 10 mg/ L; a terceira *Stock Solution* geosmina e 2-metilisoborneol (SS3) com concentração de 10 mg/ L; a quarta *Stock Solution* de β- Ionona, geosmina e 2-metilisoborneol (SS4) com concentração final de 500 $ng.mL^{-1}$ de β-Ionona e 50 ng/mL de geosmina e 2-MIB.

Os vials utilizados para a análise de HS- SPME, foram de 20 mL com 10 mL da SS4 contendo os padrões de β- Ionona, geosmina e 2-metilisoborneol. Para a realização das análises, foram utilizadas cinco fibras de diferentes composições: fibra de Polidimetilsiloxano/Carboxano- 75µm (PDMS/CAR)-(Black); fibra de Divinilbenzeno/Polidimetilsiloxano – 65µm (DVB/PDMS) (Blue); fibra de Divinilbenzeno/Carboxano/Polidimetilsiloxano- 50/30µm (DVB/CAR/PDMS) (Gray); fibra de Divinilbenzeno/Polidimetilsiloxano (DVB/PDMS) 65µm- (Pink); fibra de Poliacrilato- 85µm (PA) (White) (Tabela 01). Com o objetivo de obter melhores resultados, aumentar a eficiência das análises, todas as fibras foram testadas apenas na amostra de maior concentração (1000 $ng.mL^{-1}$), visto que, se as fibras não concentrassem nessa diluição, as mesmas seriam eliminadas do estudo (Figura 04).

Figura 4: Vials de 20mL com 10 mL de solução estoque (SS4) contendo padrões de β- Ionona, geosmina e 2-metilisoborneol (concentração de 1000ng.mL^{-1}) para análise de cinco fibras de composições diferentes

Tabela 1: Relação de cores e fibras de diferentes composições

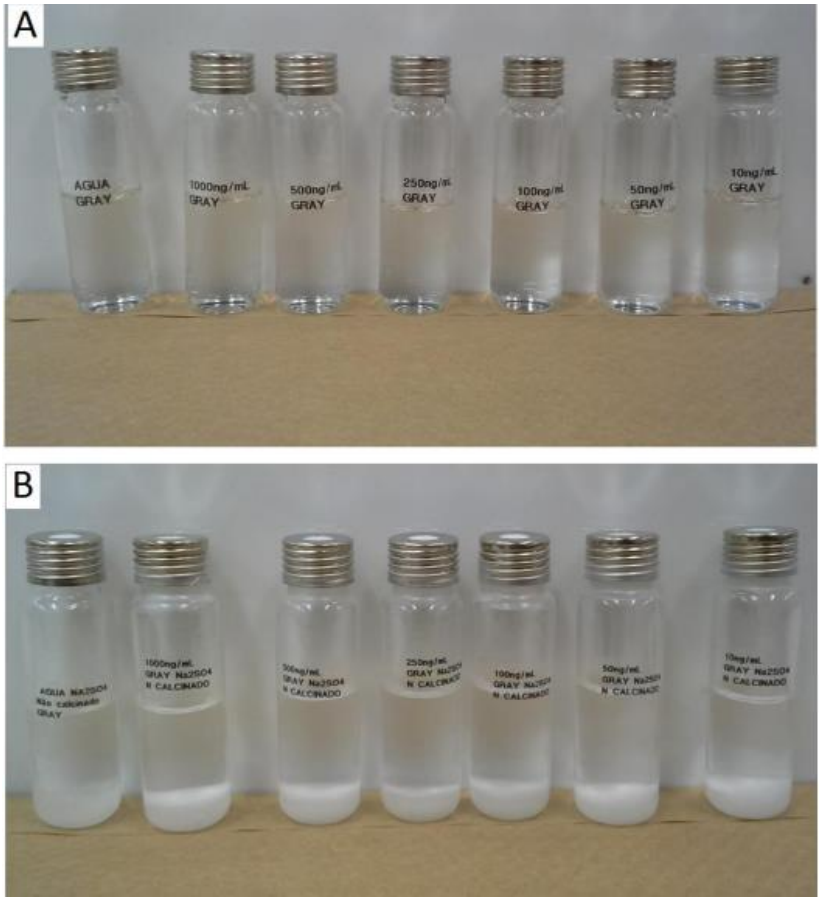
Cor	Tipo	Material
GRAY	Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane	Stableflex/SS
BLACK	Carboxen/Polydimethylsiloxane	Fused Silica/SS
WHITE	Polyacrylate	Fused Silica/SS
BLUE	Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene	Fused Silica/SS
PINK	Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene	Stableflex/SS

3.1.4. Perfil e Linearidade de β-Ionona, Geosmina e 2- MIB com adição de Sal NaCl (Método de *salting out*/ força iônica)

O método de *salting out* foi utilizado para favorecer e deslocar o equilíbrio dos compostos voláteis aqui testados da água para a fase gasosa com altas concentrações de sal, favorecendo a interação dos analitos com a fibra de SPME. Deste modo, a adição de sal contribui para o aumento das taxas de recuperação.

Levando-se em consideração algumas observações realizadas em análises anteriores e no que está descrito na literatura, decidiu-se fazer uma comparação entre as amostras sem a adição e com a adição de 4g de NaCl às amostras. A análise de todas as diluições foi realizada apenas com a fibra de 50/30µm - DVB/CAR/PDMS (Gray), utilizando-se adaptação de metodologias descritas por Ozaki et al. (2008) e Yaun et al. (2013) (Figura 05).

Figura 5: Vials de 20mL com 10 mL de: **A)** água e Solution Stock SS4 contendo os padrões nas diluições 1000 ng.mL^{-1}, 500 ng.mL^{-1}, 250 ng.mL^{-1}, 100 ng.mL^{-1}, 50 ng.mL^{-1}, 10 ng.mL^{-1} e **B)** água, SS4 contendo padrões e NaCl nas diluições 1000 ng.mL^{-1}, 500 ng.mL^{-1}, 250 ng.mL^{-1}, 100 ng.mL^{-1}, 50 ng.mL^{-1}, 10 ng.mL^{-1}



As condições das análises, desde a escolha da fibra, tempo de exposição da fibra, tempo de agitação da amostra, temperatura, entre outras variáveis, estão em processo de padronização, de acordo com as amostragens realizadas [68]. As frações obtidas nas extrações nos atuais experimentos foram analisadas por GC-MS para determinação quali e quantitativa dos compostos voláteis.

3. 2. Amostragens ambientais - Área de estudo

Amostras de água foram coletadas durante as florações de cianobactérias seguindo as recomendações descritas por Tundisi & Tundisi (2008) [70] para águas continentais no Brasil. As coletas foram realizadas, em três braços da represa Billings (Figura 06), situada na latitude 28° 47’ 12,4” S e longitude 46° 32’ 48,9” W, no municipio de Riacho Grande, SP.

Figura 6: Represa Billings, Riacho Grande, SP

Para amostragens qualitativa e quantitativa de fitoplâncton, seguiu-se a metodologia descrita por Huszar e Giani (2004) para águas continentais no Brasil. Foram realizados arrastos horizontais e filtragem de 30 L em rede de fitoplâncton (tela de 20 µm de abertura de malha) (Figura 07).

Figura 7: Amostragem fitoplanctônica. **A**- Represa Billings, **B**- arrasto horizontal em rede de fitoplâncton, **C**- filtragem de 30 L em rede de fitoplâncton, **D** e **E**- concentrado de células algais.

3.3. Seleção de organismos

Para selecionar cianobactérias quanto ao perfil de produção de COVs, foram investigadas 12 linhagens já isoladas e mantidas em culturas não axênicas no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**,** FCF-USP (Tabela 02).

Tabela 2: Relação de linhagens testadas quanto à produção de compostos orgânicos voláteis

Linhagem	Classificação	Produtora de toxinas	Isolada
LTPNA 01	***Microcystis aeruginosa***	**não produtora**	**Salto Grande**
LTPNA 02	***Microcystis aeruginosa***	**MYC**	**Salto Grande**
LTPNA 03	***Microcystis aeruginosa***	**não produtora**	**Salto Grande**
LTPNA 06	***Limnothrix redekei***	**não produtora**	**Taquacetuba**
LTPNA 07	***Limnothrix redekei***	**não produtora**	**Taquacetuba**
LTPNA 08	***Microcystis aeruginosa***	**MCY**	**Salto Grande**
LTPNA 09R	***Microcystis aeruginosa***	**MCY**	**Salto Grande**
LTPNA 10A	***Planktothrix mougeotii***	**não produtora**	**Taquacetuba**
ITEP-18	***Cylindrospermopsis raciborskii***	**STX**	**Tabocas, Caruaru, PE**
ITEP-24	***Sphaerospermopsis torquii reginae***	**ANTX-A(S)**	**Tapacurá, PE**
ITEP-26	***Sphaerospermopsis torquii reginae***	**ANTX-A(S)**	**Tapacurá, PE**
ITEP-30	***Cylindrospermopsis raciborskii***	**confirmar**	**Lago ITEP**

As linhagens foram cultivadas em meio de cultura ASM-1 [76], previamente autoclavado em *Erlenmerys* , em pH 8,0, temperatura de 24±2 °C, sem aeração, e sob irradiância de 20 µmoles de fótons.m^{-2}.s^{-1} (as intensidades foram medidas a partir de sensor quântico). Desses cultivos,

foram retirados 10mL de amostra e adicionados em vials com 4g de NaCl e analisados conforme descrito no item 3.1.1 (Figura 08).

Figura 8: Microextração em fase sólida (SPME) em combinação com a a Cromatatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS)

Tabela 3: Componentes meio de cultivo ASM-1 utilizado na manutenção das culturas

Composição	Concentração (mg/L)	Composição	Concentração (mg/L)
Solução A		**Solução C**	
$NaNO_3$	1700	H_3BO_3	2,48
$MgSO_4 . 7H_2O$	490	$MnCl_2 . 4H_2O$	1,39
$MgCl_2 . 6H_2O$	410	$FeCl_3 . 6H_2O$	1,08
$CaCl_2 . 2H_2O$	290	$ZnCl_2$	0,335
		$CoCl_2 . 2H_2O$	0,0019
		$CuCl_2 . 2H_2O$	0,0014
Solução B		**Solução D**	
KH_2PO_4	174	Na_2EDTA	7,44
$Na_2HPO_4 .12H_2O$	356		

3.4. Ensaios Biológicos

3.4.1. Produção de compostos orgânicos voláteis em diferentes tempos de crescimento de *Microcystis aeruginosa*

Com o objetivo de conhecer os COVs produzidos em diferentes fases de crescimento de cianobactérias foram utilizadas duas linhagens: *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 01 – não produtora de toxinas) e *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 08 - produtora de toxinas). Os cultivos foram realizados em triplicatas, com amostragens realizadas a cada seis dias no período de 30 dias (T6, T12, T18, T24, T30). A padronização foi definida após testes preliminares com as linhagens LTPNA 01 e 08 realizados a cada três dias. Nesse período, os tempos amostrais T_3 e T_6, T_6 e T_9, T_9 e T_{12}, foram comparados, e não apresentaram, diferenças na produção de compostos orgânicos voláteis (Figura 09).

Figura 9: Crescimento de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08 ao longo de 30 dias.

3.4.2. Avaliação do efeito de diferentes intensidades luminosas sobre a produção COVs

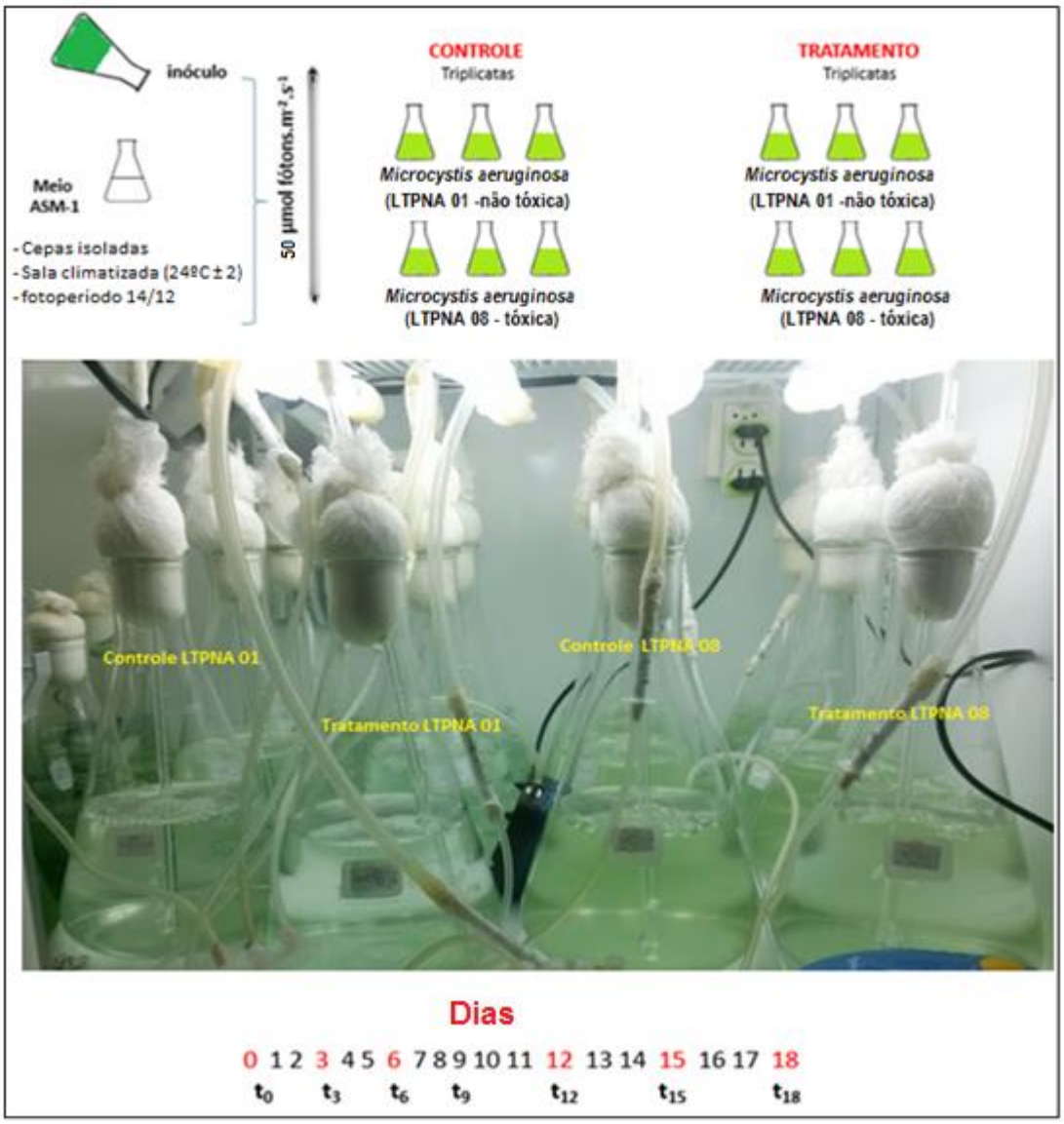
Para avaliar os possíveis efeitos de diferentes intensidades luminosas no perfil de produção de COVs, foram realizados ensaios ao longo do tempo de crescimento (período de 18 dias com amostragens a cada seis dias) das linhagens *de M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08 sob três diferentes irradiâncias (50, 150 e 250 µmoles de fótons.m^{-2}.s^{-1}). As linhagens isoladas foram inoculadas em Erlenmeyers de 2000 mL, contendo 1700 mL de meio ASM-1 (Figura 10).

Figura 10: Crescimento de cianobactérias em diferentes (50, 150 e 250 µmoles de fótons.m^{-2}.s^{-1})

3.4.3. Produção de COVs em cultivos com a adição de padrão de β- Ionona

Para verificar a produção de metabólitos orgânicos voláteis por GC-MS durante o crescimento celular, foram realizados cultivos de duas linhagens de cianobactérias, sendo uma linhagem não produtora de toxinas (LTPNA 01) e uma produtora de toxinas (LTPNA 08). Os cultivos foram realizados em triplicatas e separados em Controle e Tratamento (Figura 11). Aos tratamentos das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08, foram adicionados 3µL (concentração final 0,01 mM, baseada em trabalhos realizados por Ozaki, et al., 2008) do padrão de β- ionona em 1,7 L de meio de cultivo ASM-1 (Reynolds, 2006) de cada réplica, contendo 10^5 de céls/L. Os controles apresentaram as mesmas condições dos tratamentos, porém, sem a adição do padrão de β- Ionona. Os cultivos foram mantidos à 24º C, sob irradiância de 50 µmoles de fótons.m^{-2}.s^{-1} e rotacionados diariamente, para que recebessem uniformemente a mesma intensidade de luz. O ensaio foi mantido por 18 dia, com amostragens a cada três dias.

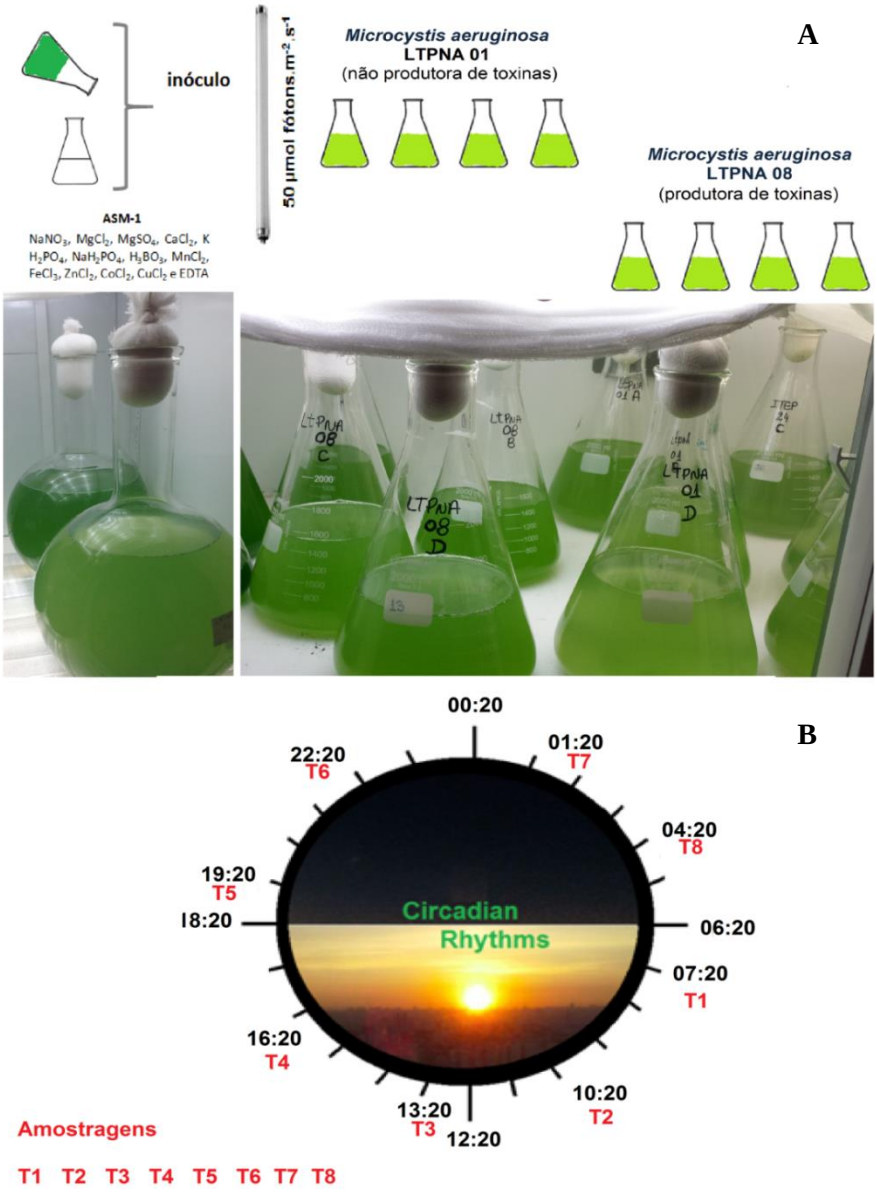
Figura 11: Controle e tratamento (com β- ionona) de *Microcystis aeruginosa* LTPNA 01 e *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08



3.4.4. Efeitos da intensidade luminosa (50 e 150 μmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}) sobre o ritmo circadiano da produção de compostos voláteis no crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 01 e LTPNA 08)

Foram realizados ensaios para conhecer quais os possíveis efeitos de diferentes intensidades luminosas sobre o ritmo circadiano de compostos orgânicos voláteis no período de 48h de crescimento de duas linhagens de *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 01 e LTPNA 08), com amostragens a cada três horas. Antes de iniciar o experimento, as células foram cultivadas em Erlenmeyers de 2000L, sem aeração, contendo 1500mL de meio ASM-1 e misturados no 12º dia em Erlenmeyers de 6000 L, com o objetivo de obter um número uniforme de células. Após a homogeneização das células, o cultivo foi mantido sob as irradiâncias 50 e 150 μmoles de fótons.m^{-2}.s por 20 dias e distribuídos novamente, no 21º dia (início do experimento), com células de fase de crescimento de 2 x 10^6 de céls/L, em Erlenmeyers de 2000L (1500mL cada Erlenmeyers) (Figura 12).

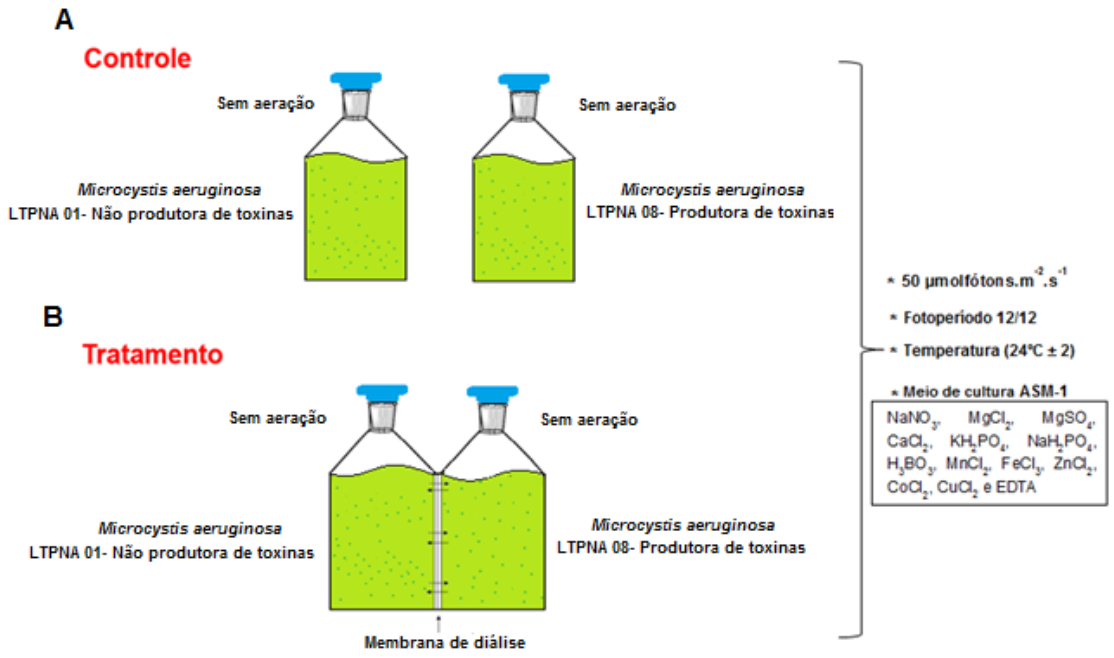
Figura 12: A. Ritmo circadiano de duas linhagens (tóxicas e não tóxicas) de *M. aeruginosa*, **B.** mantidas no período de 48 horas com amostragens a cada três horas



3.4.5. Produção de compostos orgânicos voláteis a partir da interação de duas linhagens (tóxicas e não tóxicas) de *M. aeruginosa*

Para investigar se o contato de duas linhagens (produtora e uma não produtora de toxinas) favorece ou inibe a produção de compostos orgânicos voláteis, foram realizados em sistemas individuais (frascos de acrílico) que, no entanto, possuíram comunicação entre si, de modo que as condições fossem iguais em ambos os sistemas e que uma comunicação química entre as diferentes linhagens estivesse estabelecida, através da troca líquida (osmótica) e gasosa entre as culturas sem que existisse mistura entre elas (Figura 13).

Figura 13: (A) Controle: cultivo das linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *M. aeruginosa* LTPNA 01, em sistemas individuais (frascos de acrílico), separados e, **(B)** Tratamento, LTPNA 01 crescendo em interação com LTPNA 08.



Os sistemas foram separados por membranas separadora de diálise de 20Da e com aeração constante. Durante o cultivo, a cada dois dias foram realizadas amostragens para análises dos COVs e crescimento celular.

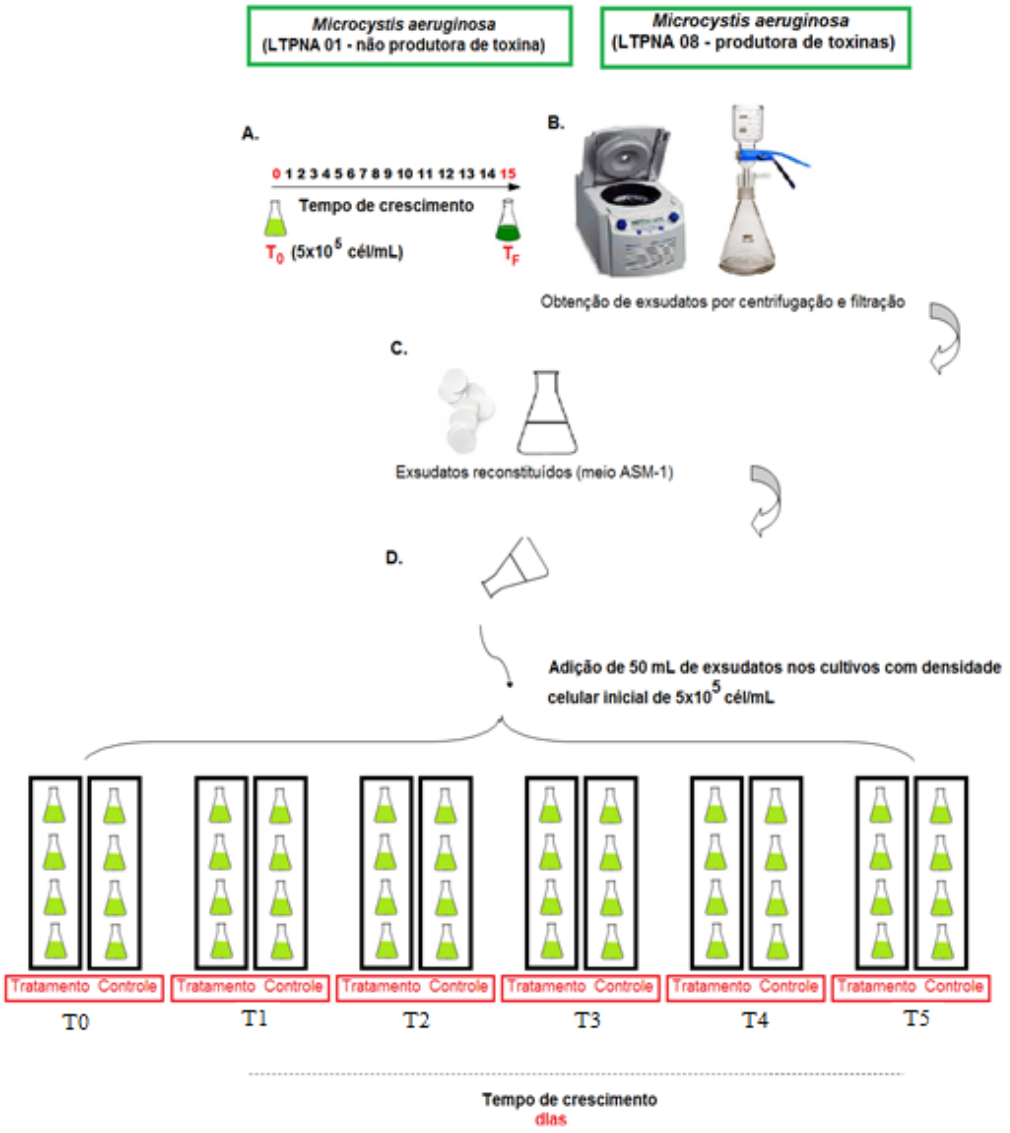
3.4.6. Efeito de exsudatos de *M. aeruginosa* em cultivos da própria linhagem em diferentes fases de crescimento (alelopatia)

Buscando conhecer os efeitos da adição de exsudatos de *M. aeruginosa* em cultivos da própria linhagem e também, possíveis alterações fisiológicas que indiquem uma auto-regulação, foram realizados experimentos com as linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 01 (não produtora de toxinas conhecidas) e LTPNA 08 (produtora de toxinas) com culturas iniciais com 2,0x 10^7cél/mL. Para obter volumes mais elevados de exsudatos, as culturas cresceram por 15 dias, período em que as células se encontravam em fase de crescimento exponencial (maior número de células) (Figura 14- A).

Os experimentos iniciaram no 15º dia após o crescimento inicial, portanto, os exsudatos foram obtidos exatamente nesse período. As células foram primeiramente separadas do meio de cultivo por centrifugação e posteriormente filtradas em filtros de borossilicato (Figura 14 –B). Aos filtrados obtidos, foram adicionados sais para a reconstituição do meio ASM-1 (Figura 14 – C). A esterilização foi feita por meio de filtração em membrana de poro 0.22um (Millipore - GV-PVDF - 47mm), em condições assépticas. Após a obtenção dos exsudatos concentrados, os experimentos tiveram duração de 12 dias, com amostragens a cada três (sete tempos amostrais), e todos iniciaram com o mesmo número de células (2,0x 10^7cél/mL) e receberam de forma sincronizada, 50 mL de exsudatos em cada replicata (Figura 14 – D).

Cada tempo amostral apresentou um Controle e um Tratamento com três réplicas, contendo 150 mL no volume total. No decorrer do experimento, as amostras pertencentes a cada tempo foram retiradas no dia da amostragem, ou seja, em cada tempo amostral um frasco de cultivo foi inteiramente analisado (um Controle e um Tratamento). Foram realizadas contagens celulares e análises dos compostos orgânicos voláteis, produzidos nos diferentes tempos amostrais ao longo dos 12 dias de experimentação (Figura 14).

Figura 14: Esquema representativo – **(A)** culturas das linhagens LTPNA 01 e 08 mantidas por 15 dias; **(B)** obtenção de exsudatos das linhagens por centrifugação e filtração; **(C)** reconstituição dos filtrados com sais do meio ASM-1; **(D)** sete tempos amostrais iniciados com o mesmo número de células (2,0x 10^7cél/mL), separados em Tratamento (com adição de 50 mL de exsudato concentrado) e Controle (sem adição de exsudatos).



- **50 µmolfótons.m^{-2}.s^{-1}**
- **Temperatura (24ºC ± 2)**
- **fotoperíodo 12/12 e sem aeração**

ASM-1

$NaNO_3$, $MgCl_2$, $MgSO_4$, $CaCl_2$, KH_2PO_4, NaH_2PO_4, H_3BO_3, $MnCl_2$, $FeCl_3$, $ZnCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$ e EDTA

3.4.7. Determinação do crescimento por contagem de células

O crescimento celular das culturas foi acompanhado por meio da contagem de células com o auxílio de microscópio óptico, em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal. A determinação para linhagens cocoídes foram realizadas por contagens diretas de células, de acordo com as regras pré-estabelecidas para contagem de elementos no hemocitômetro.

Para determinação da fase exponencial do crescimento, regressões exponenciais foram aplicadas a variação do número de células pelo tempo. Foi considerado fase exponencial, o período no qual a regressão apresentou aderência de dados de pelo menos 95% ou $R^2 \geq 0,95$. O crescimento foi avaliado como taxa intrínseca de crescimento, pela equação da regressão exponencial [1], de acordo com Reynolds.

[1] $N = N_0^{rn.t}$,

Onde N é o número de células no tempo *t*, N_0 é o número inicial de células e rn é a taxa intrínseca de crescimento.

3.5. Análises Estatísticas

Para a construção dos gráficos foi utilizado pacote estatístico do software GraphPad Prism® 5.03 (GraphPad Software, Inc). Os testes estatísticos foram realizados com auxílio de pacote estatístico do programa Minitab® 17 (Minitab Inc). Para os dados considerados paramétricos, foram utilizados testes de análise de variância (ANOVA) seguidos de teste de Tukey para comparações múltiplas de médias. O nível descritivo (P valor) foi utilizado como principal parâmetro avaliado nos resultados dos testes para interpretação dos resultados obtidos. O nível de significância (probabilidade do erro tipo I) adotado para os testes foi de 5%.

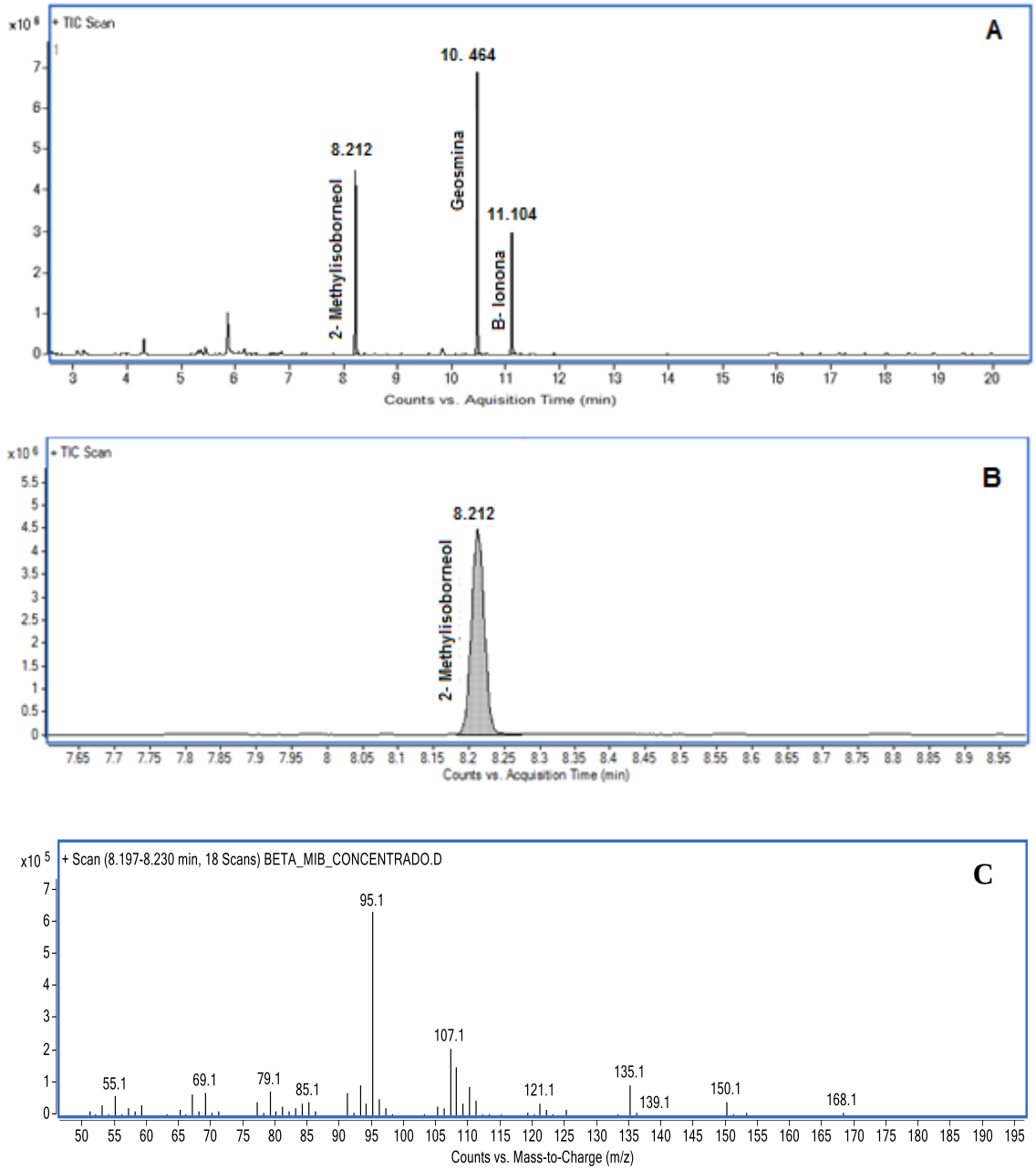
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

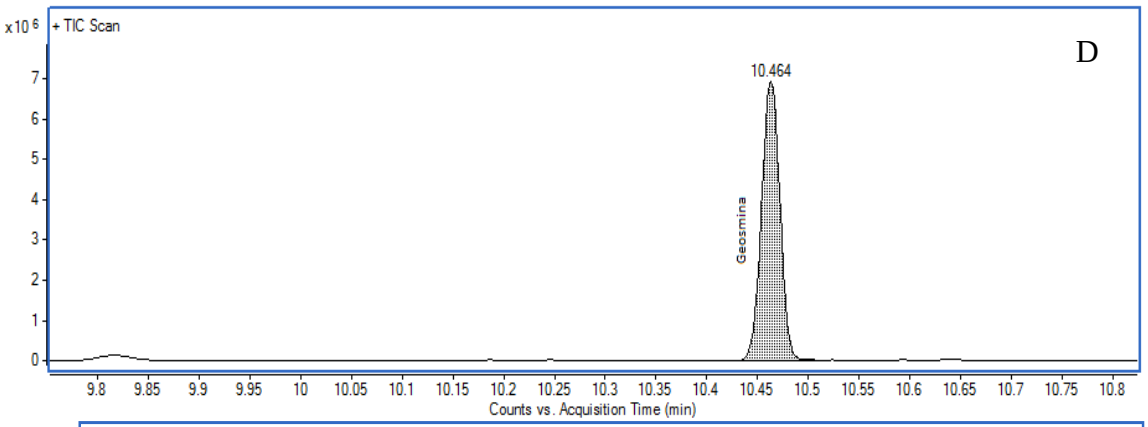
4.1. Métodos analíticos

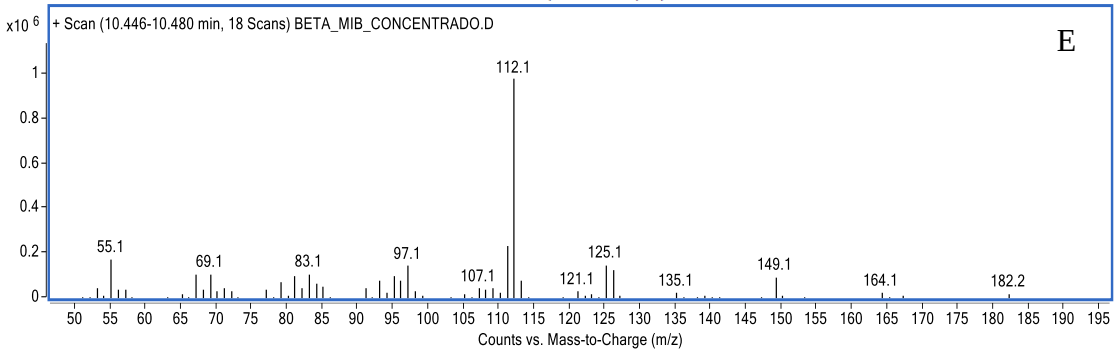
Os testes realizados com diferentes concentrações de padrões comerciais de β- Ionona, geosmina e 2-metilisoborneol em Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de massa - GC/MS utilizando-se os métodos descritos por Ozaki et *al.* (2008) e Yaun et *al*. (2013) não se mostraram eficientes na recuperação dos analitos injetados e na separação entre analito e coluna. Tais resultados podem ser decorrentes das diferenças encontradas entre os equipamentos Agilent Technologies 7890A com detector seletivo de massas 5975C e Agilent Techonologies 6890 com detector seletivo de massas 5973, utilizados nos métodos citados.

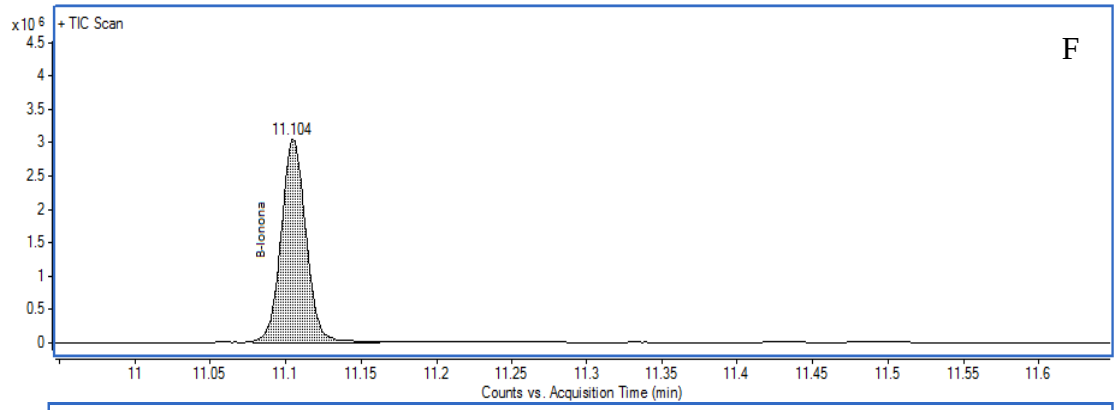
Por essa razão, foi desenvolvido um novo método baseado nos dois métodos testados conforme descrito no item 3.1.2. Os cromatogramas obtidos através dos testes realizados com o método desenvolvido estão dispostos na Figura 15.

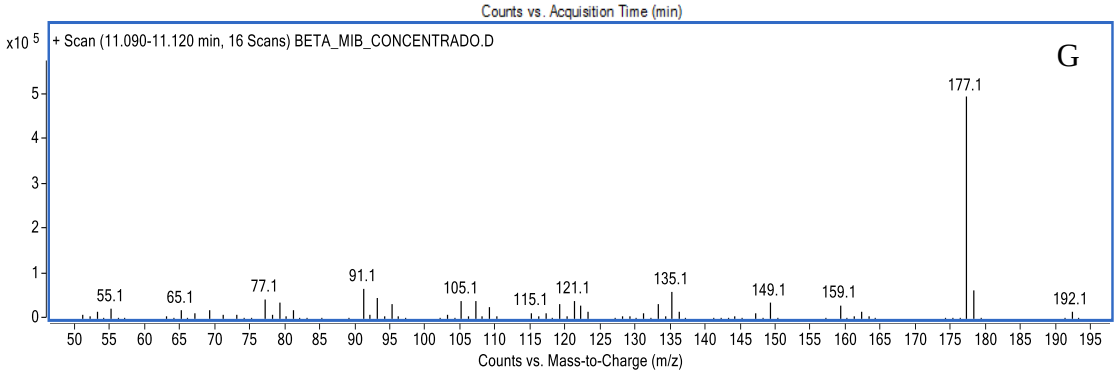
Figura 15: Cromatogramas obtidos por GC-MS no modo SCAN (A) e SIM (B, D, F) e espectro de massas (C, E e G) dos compostos β- Ionona, geosmina e 2-MIB.









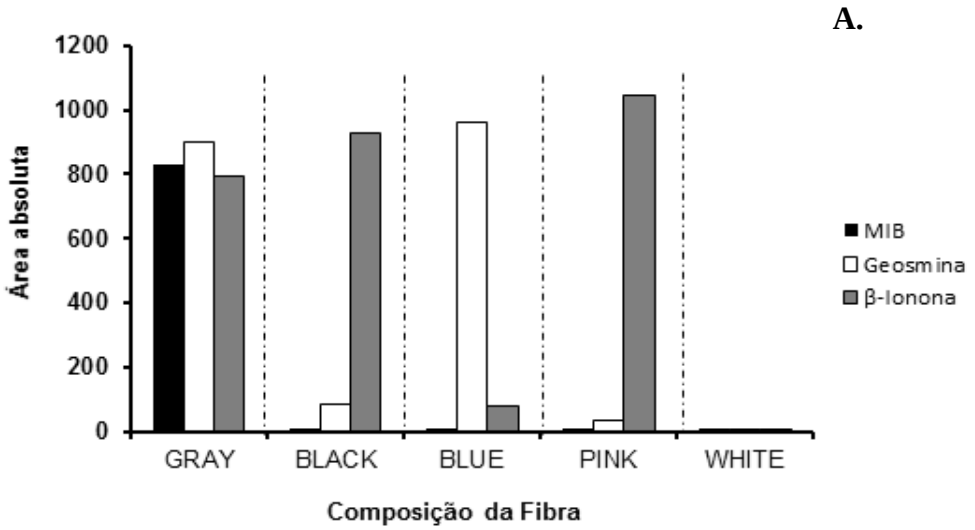


Ao analisar os dados obtidos, foi possível observar que o método novo mostrou-se eficiente na recuperação de todos os compostos injetados nas concentrações testadas, bem como na separação dos analitos e coluna.

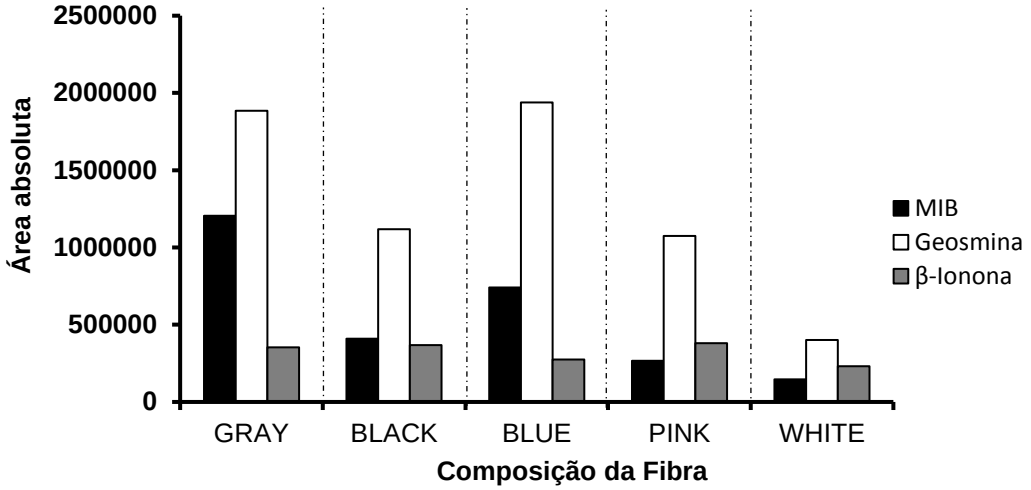
4.2. Otimização das condições de SPME

O processo de otimização das variáveis de HS-SPME: fase extratora, força iônica da matriz (*salting out*), tempo e temperatura de extração e de dessorção dos analitos torna-se indispensável para a obtenção de uma eficiente extração de compostos orgânicos voláteis. As características físico-químicas da fase extratora das fibras influenciam fortemente no processo de partição. Os dados obtidos da comparação entre as respostas das diferentes fibras testadas e expostas a uma mesma concentração (1000ng.mL^{-1}) da solução estoque SS4 (β- Ionona, geosmina e 2-metilisoborneol), com e sem adição de sal (NaCl), estão dispostos na Figura 16.

Figura 16: Comparação da resposta de diferentes fibras extratoras (DVB/CAR/PDMS -Gray; PDMS/CAR- Black; DVB/PDMS- Blue; DVB/PDMS- Pink; PA – White) a uma mesma concentração (1000ng.mL-1) da solução estoque (SS4) contendo padrões de β- Ionona, geosmina e 2-metilisoborneol: **(A)** sem adição de sal e **(B)** com adição.



B.



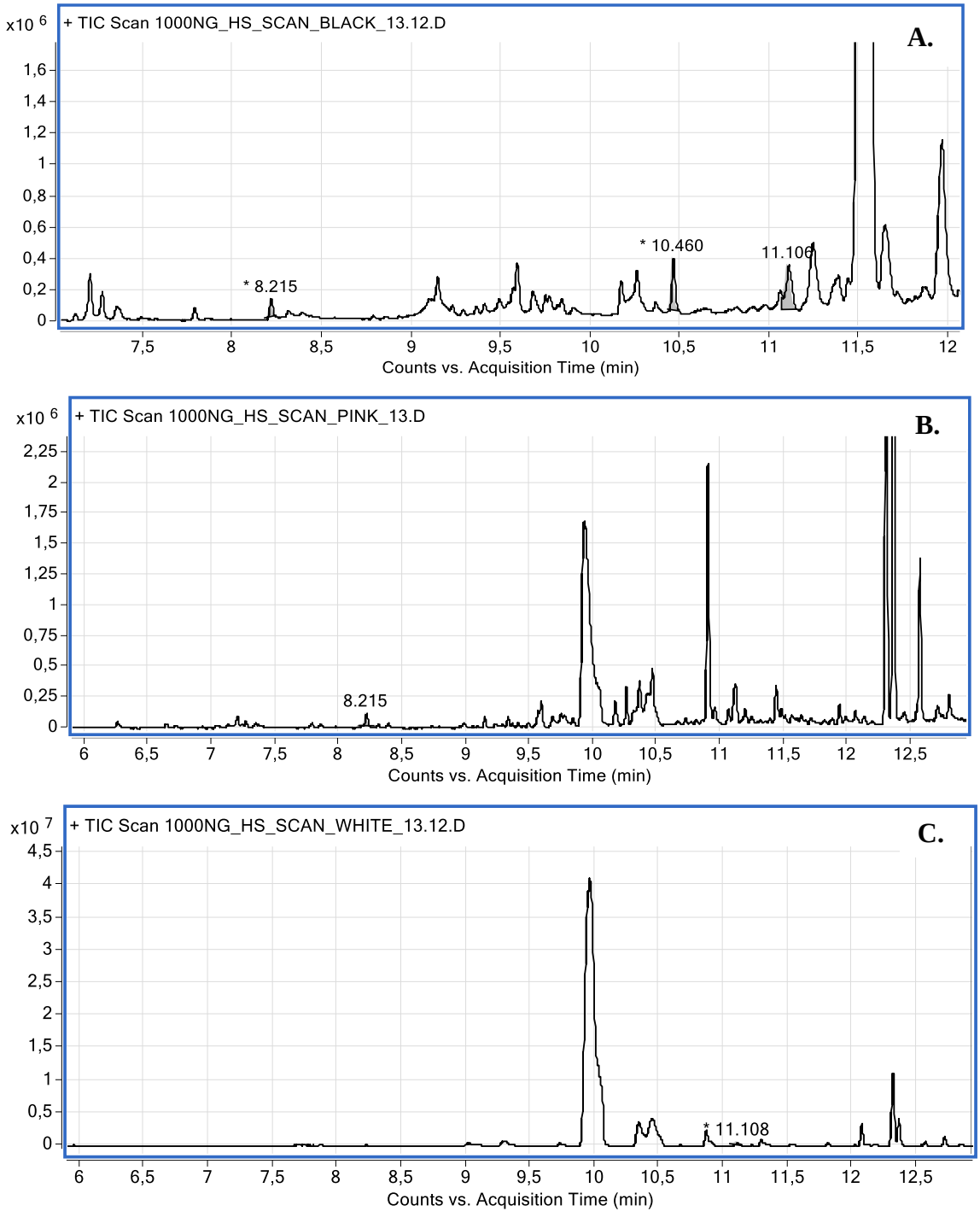
Os valores de resposta em área obtidos nas análises realizadas sem a adição de NaCl mostraram-se inferiores quando comparados aos valores de área obtidos com a adição de NaCl. Além disso, observou-se também respostas diferentes na recuperação dos três compostos estudados em todos os diferentes tipos de fibras analisados (Figura 16). Dos três compostos, a Geosmina obteve melhor resposta em todos os tipos de fibra, ao se desconsiderar a concentração detectada.

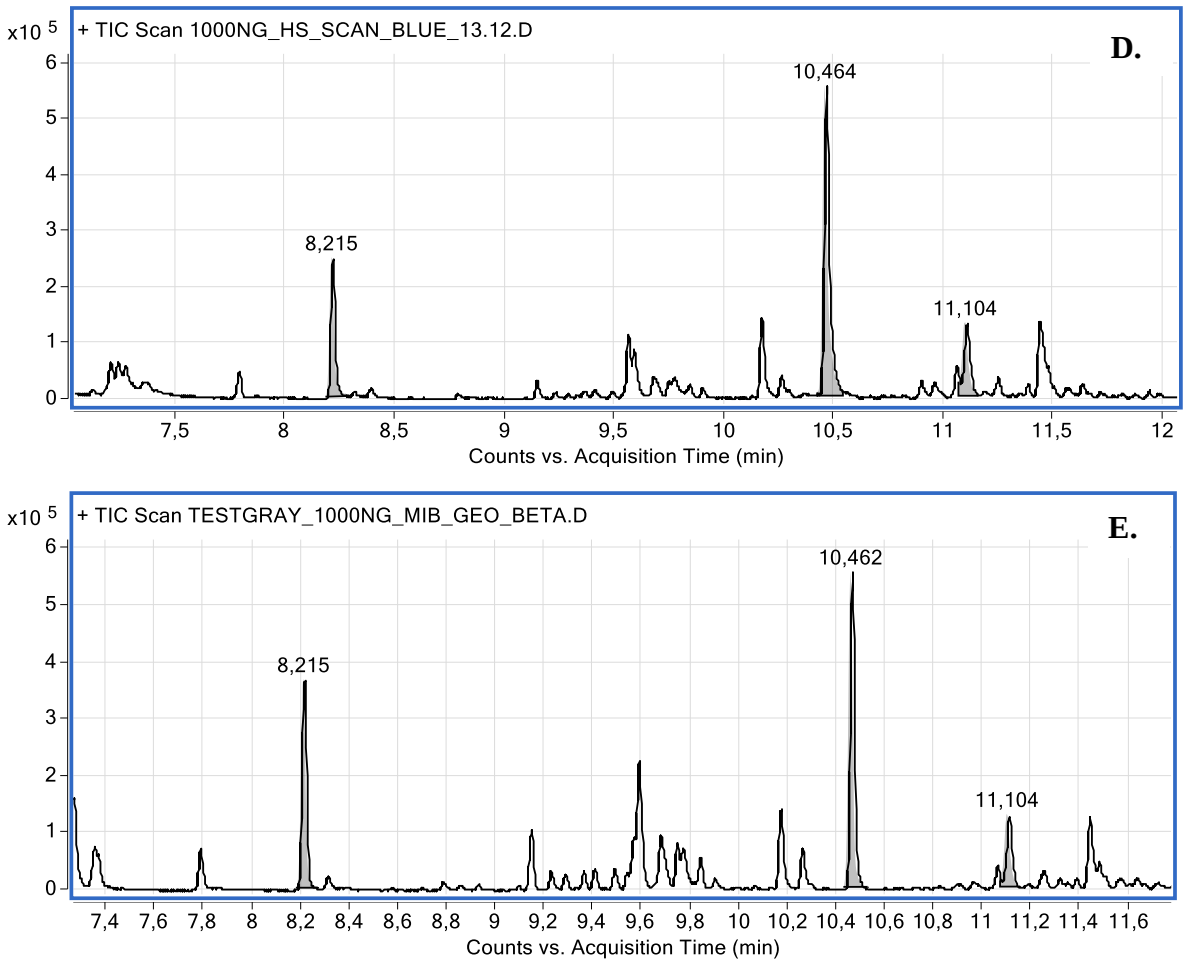
Embora cada composto tenha apresentado uma resposta particular a cada tipo de fibra; a fibra com recobrimento de 50/30µm- DVB/CAR/PDMS (Gray), das cinco fibras de SPME analisadas, apresentou-se mais eficiente, pois adsorveu todos os analitos, tanto nas amostras com adição quanto nas sem adição de NaCl. Observou-se ainda, na Figura 16, que as fibras com recobrimento de Polidimetilsiloxano/Carboxano -PDMS/CAR, 75µm (Black); fibra de Divinilbenzeno/Polidimetilsiloxano - DVB/PDMS, 65µm (Blue); fibra de Divinilbenzeno/Polidimetilsiloxano- DVB/PDMS (Pink)- 65µm; fibra Poliacrilato-PA, 85µm (White), adsorveram em grande quantidade apenas um dos três compostos em questão, sempre em maior concentração nas amostras contendo NaCl. Segundo Macka et. *al* (2000), no processo de seleção do revestimento das fibras de SPME, deve ser levada em consideração a polaridade do revestimento da fibra, que deve corresponder à polaridade do

composto a se analisar e, desta forma, espera-se que o coeficiente de partição seja elevado para um revestimento não polar e um analito não-polar. O número de grupos NRH, NH_2 e OH, os quais propiciam as ligações de hidrogênio, é uma propriedade importante dos analitos, pois determinam principalmente, a hidrofilicidade de um analito e afinidade ao revestimento. Além disso, o revestimento deve ser resistente às condições do meio de extração, tais como: pH, adição de sal, aditivos orgânicos e temperaturas elevadas.

Os cromatogramas obtidos através dos testes realizados com as diferentes composições de fibras, estão dispostos na Figura 17.

Figura 17: Cromatogramas obtidos por GC-MS, no modo SCAN dos compostos β-Ionona, geosmina e 2-MIB contendo padrões de β- Ionona, geosmina e 2-metilisoborneol com adição, concentrados por diferentes fibras de SPME: **A**. fibra de Polidimetilsiloxano/Carboxano- 75µm (PDMS/CAR)- (Black); **B**. fibra de Divinilbenzeno/Polidimetilsiloxano (DVB/PDMS) 65µm- (Pink); **C.** fibra de Poliacrilato- 85µm (PA) (White). **D.** fibra de Divinilbenzeno/Polidimetilsiloxano – 65µm (DVB/PDMS) (Blue); **E.** fibra de Divinilbenzeno/Carboxano/Polidimetilsiloxano-50/30µm (DVB/CAR/PDMS) (Gray).

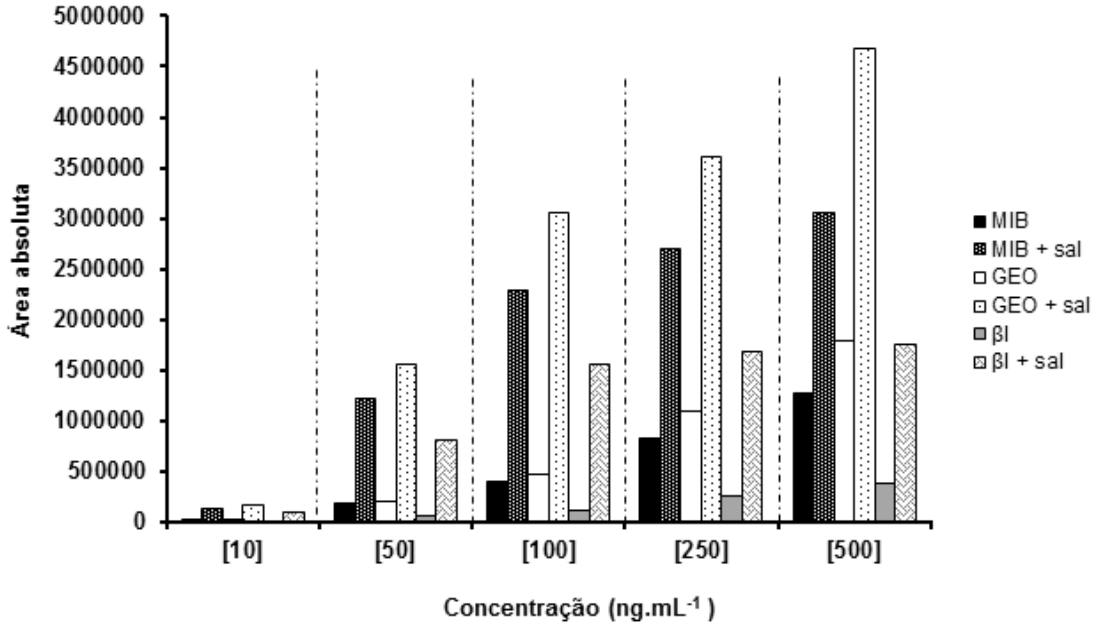




Considerando os fundamentos teóricos descritos e a eficiência das extrações realizadas neste experimento, a fibra extratora de DVB/CAR/PDMS (Gray), e o método de "*salting out*" (NaCl) foram selecionados como os mais adequados, para serem utilizados na otimização das demais variáveis de HS-SPME (Figura 18).

Dessa forma, a eficiência de extração dos compostos β-ionona, geosmina e 2-metilisoborneol com a fibra de DVB/CAR/PDMS (Gray) em menores concentrações (500 ng.mL^{-1}, 250 ng.mL^{-1}, 100 ng.mL^{-1}, 50 ng.mL^{-1}, 10 ng.mL^{-1}), sem a adição de sal (NaCl) e com a adição de sal (NaCl), foram testadas e apresentadas na Figura 18.

Figura 18: Comparação de extração dos compostos β- Ionona (βI), geosmina (GEO) e 2-metilisoborneol (MIB) com a fibra de DVB/CAR/PDMS (Gray) em diferentes diluições (500 ng.mL^{-1}, 250 ng.mL^{-1}, 100 ng.mL^{-1}, 50 ng.mL^{-1}, 10 ng.mL^{-1}) sem a adição de sal (MIB; GEO; βI) e com a adição de sal (MIB+ sal; GEO+ sal; βI$_+$ sal)



Ao comparar as análises realizadas nas amostras com e sem adição de sal, observa-se que em todas as diluições a presença de NaCl influenciou de maneira positiva na eficiência do processo de HS-SPME, aumentando a taxa de extração dos COVs (Figura 18). Observa-se ainda, que os compostos em concentrações de 10ng.mL^{-1} são possíveis de serem detectados nas duas condições (com e sem adição de sal), porém, concentrações menores só são detectadas em presença de sal. Essa eficiência é resultante do efeito de "salting out", no qual moléculas de água solvatam os cátions e ânions do sal, reduzindo as moléculas de água disponíveis para solubilizar os analitos na amostra, fazendo com que o equilíbrio seja deslocado da fase aquosa para a gasosa, aumentando a concentração dos COVs nesta última e melhorando a adsorção para a fase extratora (Macka et. *al*, 2000).

Dessa forma, com os resultados obtidos em todos os testes realizados neste experimento, o método desenvolvido mostrou-se adequado para as

análises de compostos orgânicos voláteis com variadas concentrações presentes em amostras de água.

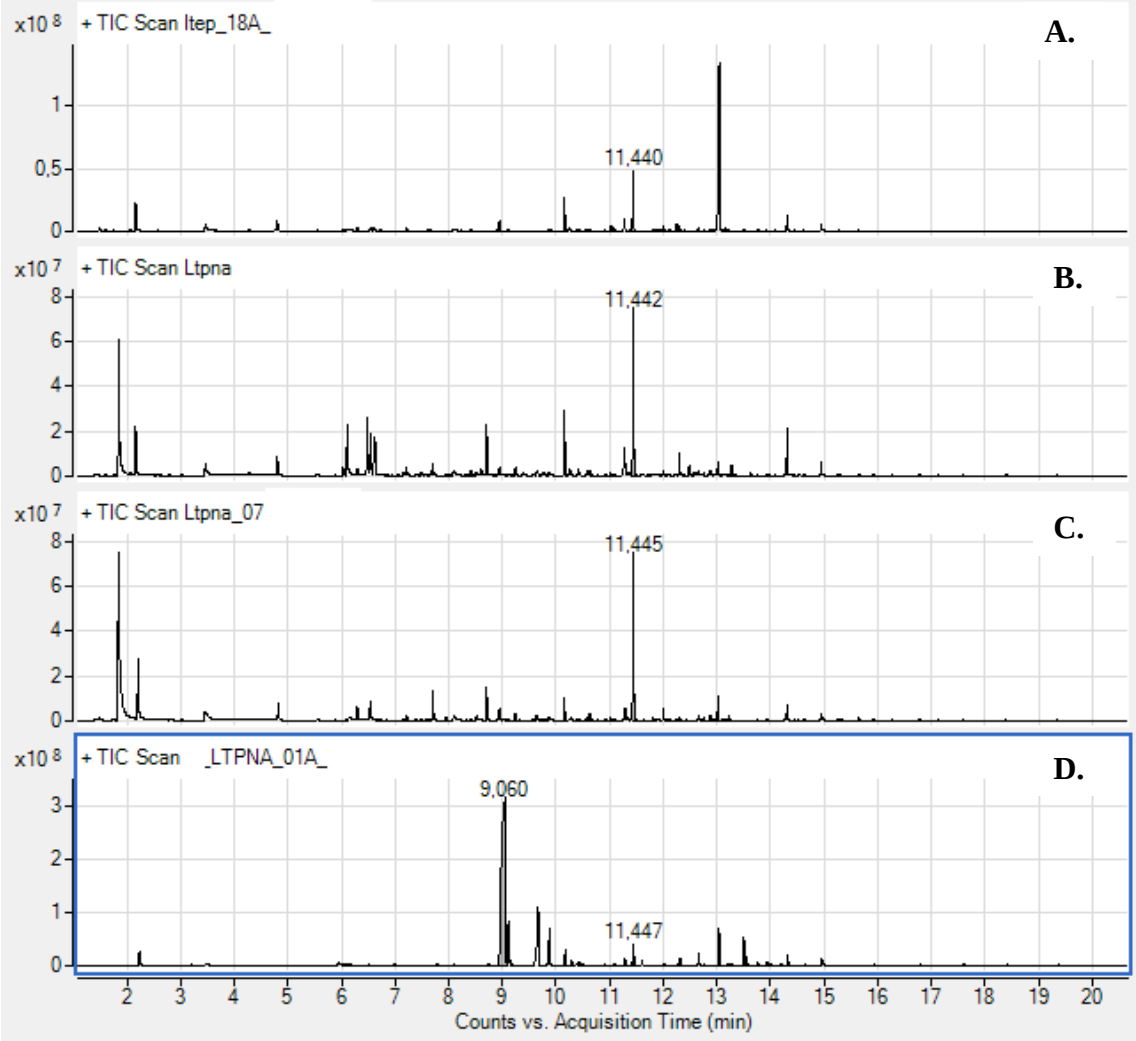
4.3. Análise de compostos orgânicos voláteis em amostras brutas de água do ambiente (florações)

Não houve detecção de COVs nas quatro amostragens realizadas na represa Guarapiranga. A razão para esse resultado negativo, provavelmente se deve ao fato do número de organismos encontrados ter sido muito baixo (análise realizada por microscopia óptica), consequentemente, baixa produção de COVs, sendo insuficiente para serem pré-concentrados pelas fibras de SPME. Os organismos encontrados foram isolados, porém, sem sucesso. Dessa forma, o trabalho foi realizado inteiramente com linhagens isoladas anteriormente e mantidas no banco de cultivo do laboratório LTPNA.

4.4. Seleção de linhagens produtoras de compostos orgânicos voláteis

Das 12 linhagens testadas quanto ao potencial de produção de COVs, as espécies *M. aeruginosa* (LTPNA 01), *M. aeruginosa* (LTPNA 08), *Limnothrix redekei* (LTPNA 07) e *Cylindrospermopsis rasciborskii* (ITEP 18), foram selecionadas por apresentarem, dentre os COVs conhecidos na literatura, produção do composto β- ionona em seus perfis. Os cromatogramas obtidos através dos testes realizados com diferentes linhagens estão na Figura 19.

Figura 19: Cromatogramas obtidos por GC-MS no modo SCAN do perfil de COVs produzidos por A. *M. aeruginosa* (LTPNA 01), B. *M. aeruginosa* (LTPNA 08), C. *Limnothrix redekei* (LTPNA 07) e D. *Cylindrospermopsis rasciborskii* (ITEP 18). Tempos de retenção: 9.06 (β- ciclocitral) e 11.44 (β- ionona)



Embora as quatro espécies tenham apresentado produção de β- ionona, apenas as *M. aeruginosa* LTPNA 01 (não produtora de toxinas) e LTPNA 08 (produtora de toxinas) apresentaram produção de β- ciclocitral e β-ionona. *M. aeruginosa* é uma cianobactéria pertencente à ordem Chroococcales, com formações de colônias flutuantes recobertas por uma camada de mucilagem (Komareck et al., 2002). É amplamente distribuída em todo o mundo e,

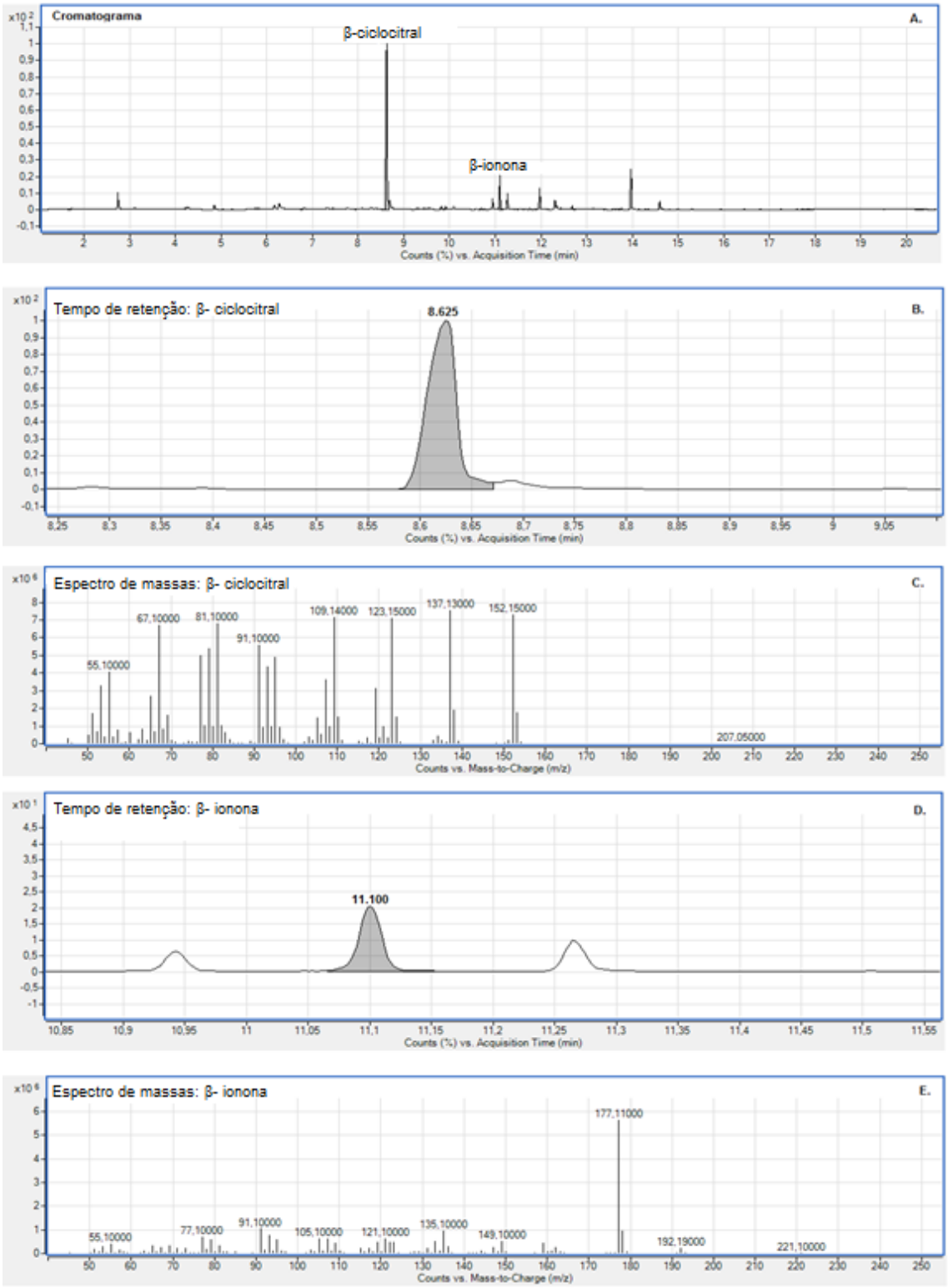
frequentemente, forma florações e é potencialmente produtora de microcistinas (Sant'Anna & Azevedo 2000).

Por estas razões, com o objetivo de prospectar os compostos orgânicos voláteis e seus efeitos na auto-regulação fisiológica de cianobactérias, as duas linhagens de *M. aeruginosa* foram selecionadas para serem testadas em diversas condições neste trabalho.

4.5. Perfil de produção de compostos orgânicos voláteis em diferentes tempos de crescimento de *M. aeruginosa*

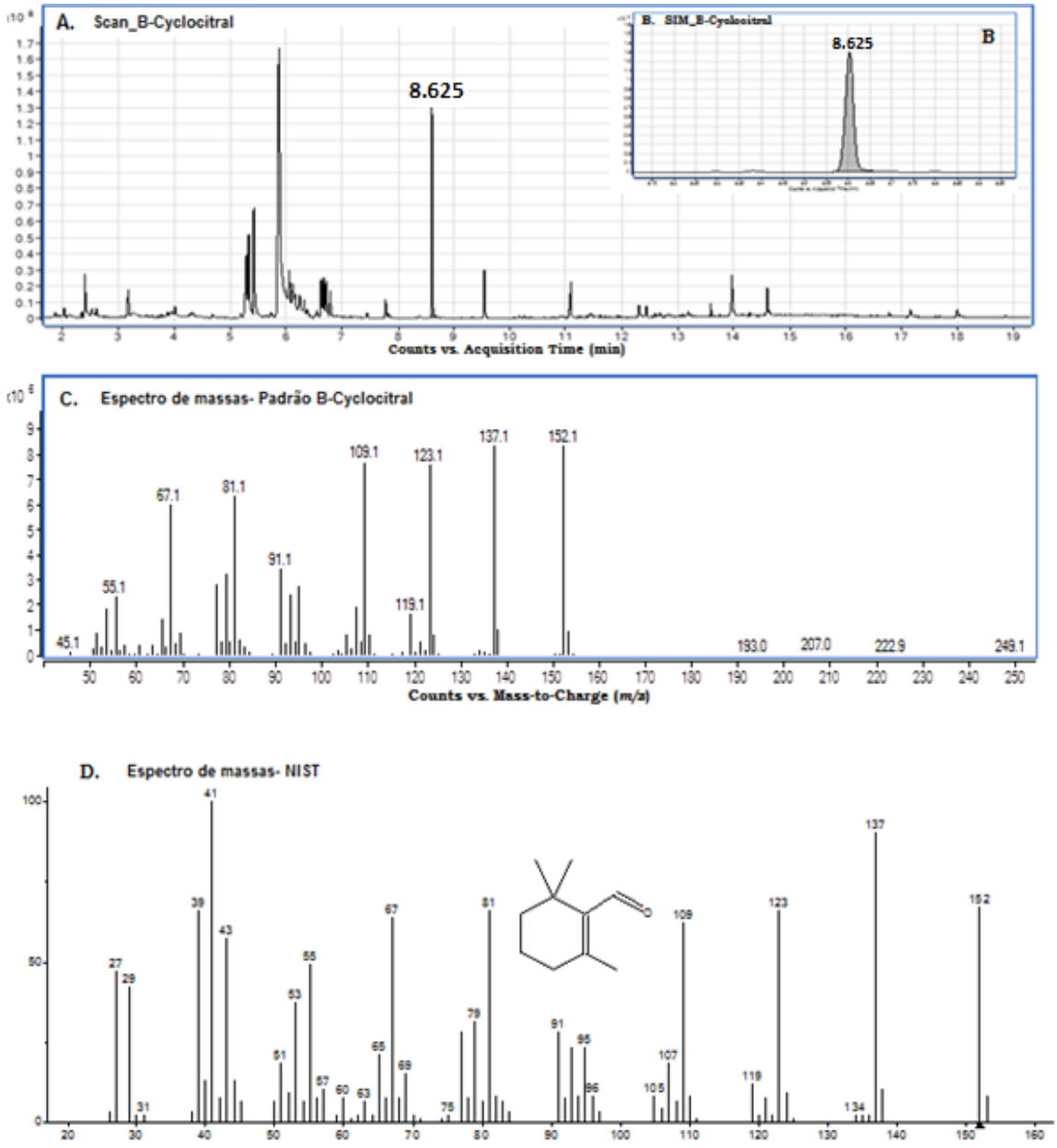
Os cromatogramas, os tempos de retenção e o espectro de massas dos compostos encontrados nas amostras das linhagens de *M. aeruginosa* (LTPNA 01 - não produtora de toxinas) e *M. aeruginosa* (LTPNA 08 - produtora de toxinas) estão apresentados na Figura 20.

Figura 20: Cromatogramas obtidos por GC-MS modo SCAN (A.); extração dos picos dos compostos em seus tempos de retenção: 8,625 para o composto β- ciclocitral (B.) e 11.100 para o composto β- Ionona (D.) e seus respectivos ions (C. e E.)



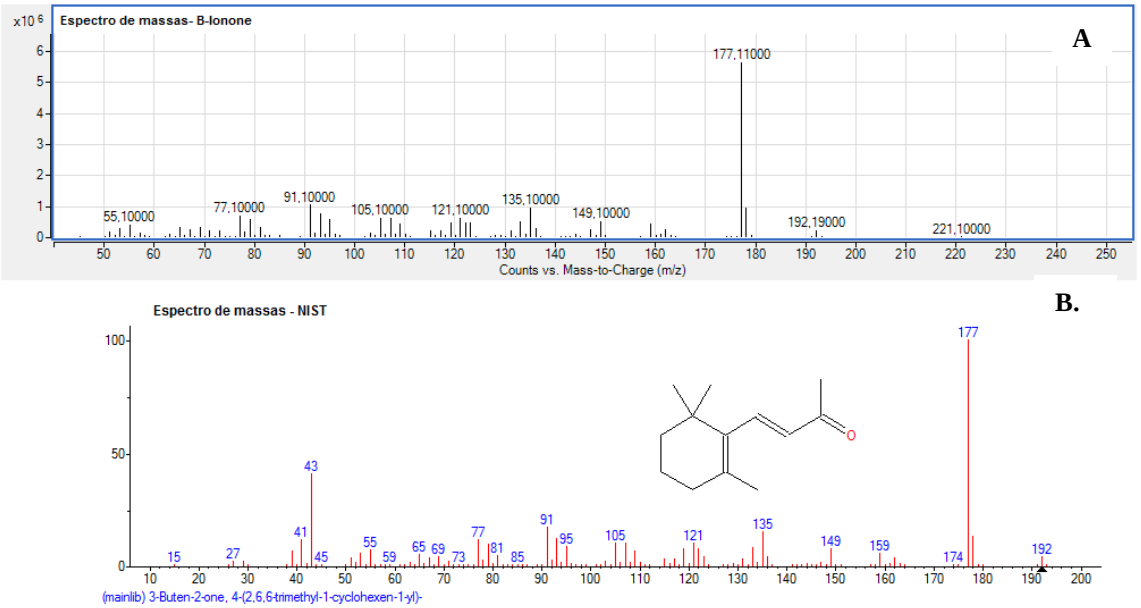
Os compostos foram identificados, inicialmente, por comparação do espectro de massas monitorados no modo SCAN, os íons de *m*/*z* 123, 137 e 152 referentes ao composto β- ciclocitral, com dados disponíveis na biblioteca Nist (National Institute of Standards and Techonology, MD, USA), com posterior identificação com o padrão interno comercial do composto (Figura 21).

Figura 21: Cromatogramas obtidos por GC-MS modo SCAN (A.) e extração dos íons nos tempos de retenção 8,625 para o composto β- ciclocitral (B.) e o espectro de massas obtido com o padrão de(C.) comparados com o espectro de massas encontrados na biblioteca NIST



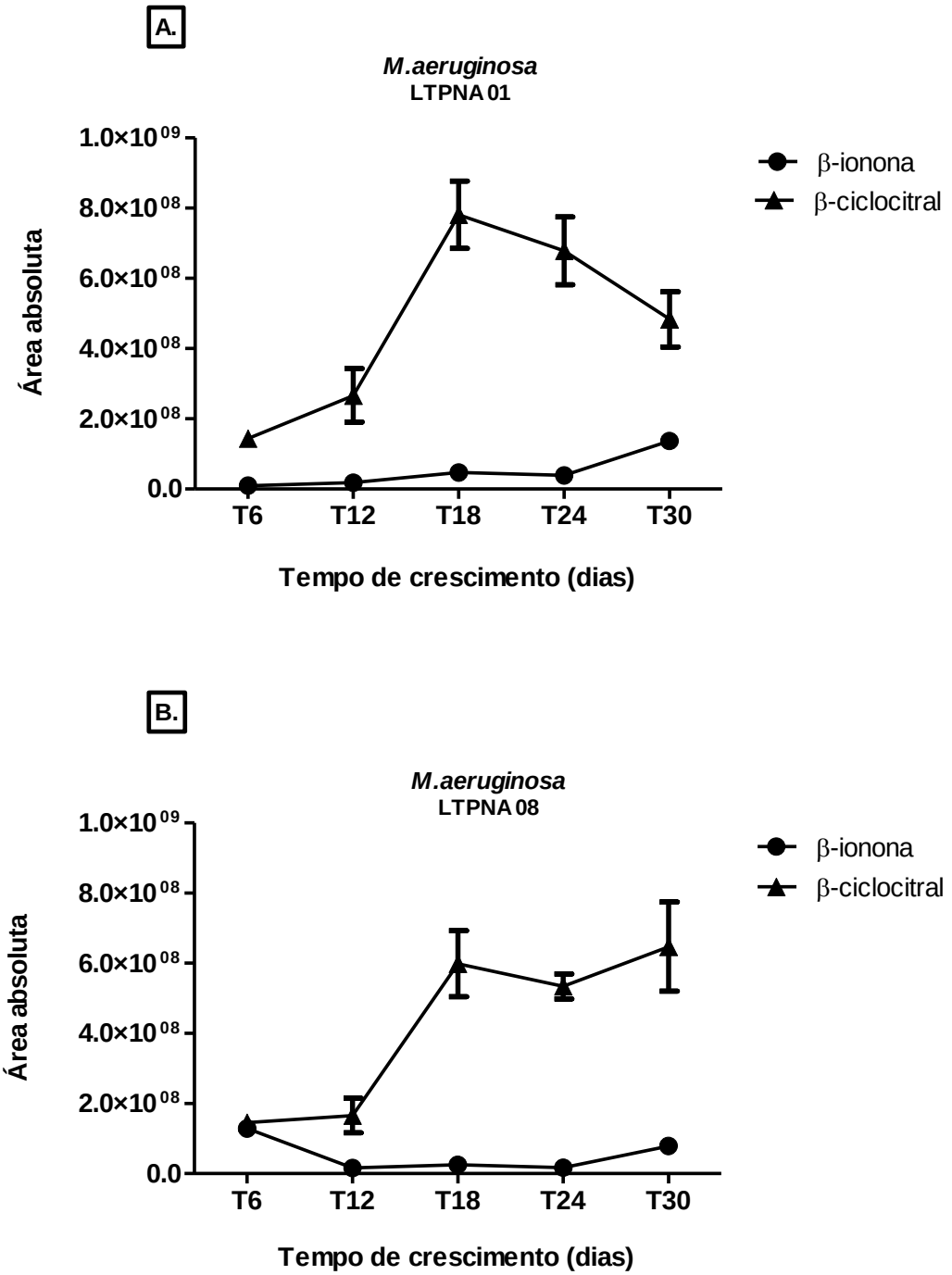
Já a identificação do composto β- ionona foi confirmada através da utilização do padrão interno comercial desse composto, bem como com a comparação dos íons referentes ao composto (*m*/*z* 105, 149 e 177) com dados disponíveis na biblioteca Nist (National Institute of Standards and Techonology, MD, USA) (Figura 22).

Figura 22: Comparação entre o espectro de massas encontrado para o composto β-ionona (A.) adquiridido no modo SCAN, e o espectro de massas encontrado na biblioteca NIST (B.)



Os resultados obtidos das análises referentes aos diferentes tempos de crescimento estão apresentados na Figura 23. A produção do composto β-ciclocitral e β- Ionona, foi observada em todos os tempos de crescimento tanto em amostras pertencentes à linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01 (Figura 23 A), não produtora de toxinas, quanto em amostras pertencentes à linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08 (Figura 23 B), produtora de toxinas. Observou-se ainda, oscilações na produção do composto β- ciclocitral, entretanto, superiores à produção de β- ionona em todos os tempos de crescimento estudados nas duas linhagens de *M. aeruginosa*.

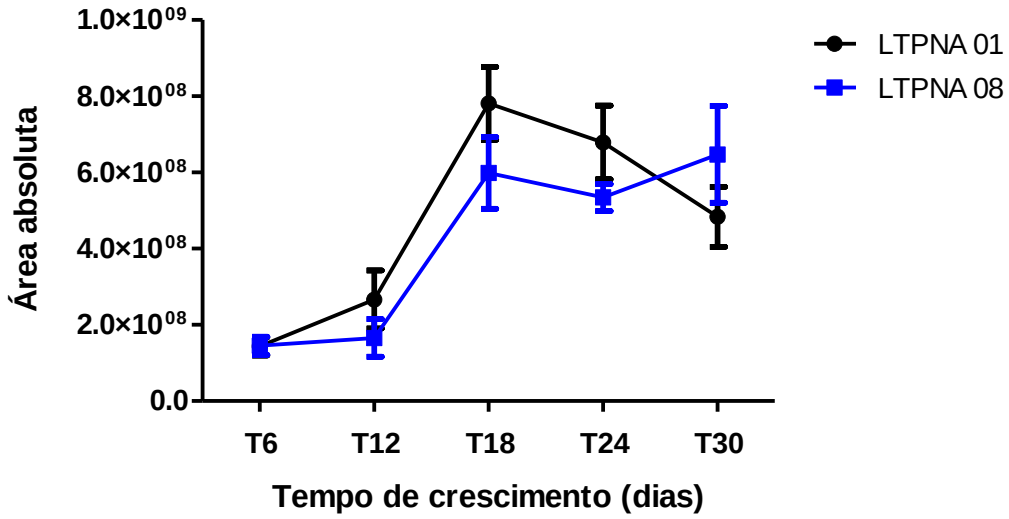
Figura 23: Perfil de produção dos compostos β- ionona e β- ciclocitral durante os tempos de crescimento das linhagens **(A)** *M. aeruginosa* LTPNA 01 e **(B)** *M. aeruginosa* LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3)



As concentrações do composto β- ciclocitral encontradas na linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01 foram menores nos tempos inicias de crescimento, não apresentando diferença estatística entre os tempos T6 e T12, sendo observado um aumento nas concentrações a partir do T18 sem variações até o final do período avaliado (30 dias) (Figura 24).

Resultados semelhantes foram observados nos diferentes tempos de crescimento da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, em que as concentrações do composto β- ciclocitral não apresentaram diferenças significativas entre os tempos T6 e T12, com máximas concentrações nos tempos T18, T24 e T30. Esse fator pode estar relacionado com a fase exponencial (T18) e a fase senescência (T24 e T30) em que as células encontravam-se. Embora tenha sido observada uma tendência no aumento da produção do composto β-ciclocitral, também não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos T24 e T30 (Figura 24).

Figura 24: Produção de **β- ciclocitral** durante 30 dias de crescimento das linhagens e *M. aeruginosa* LTPNA 01 e 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3).

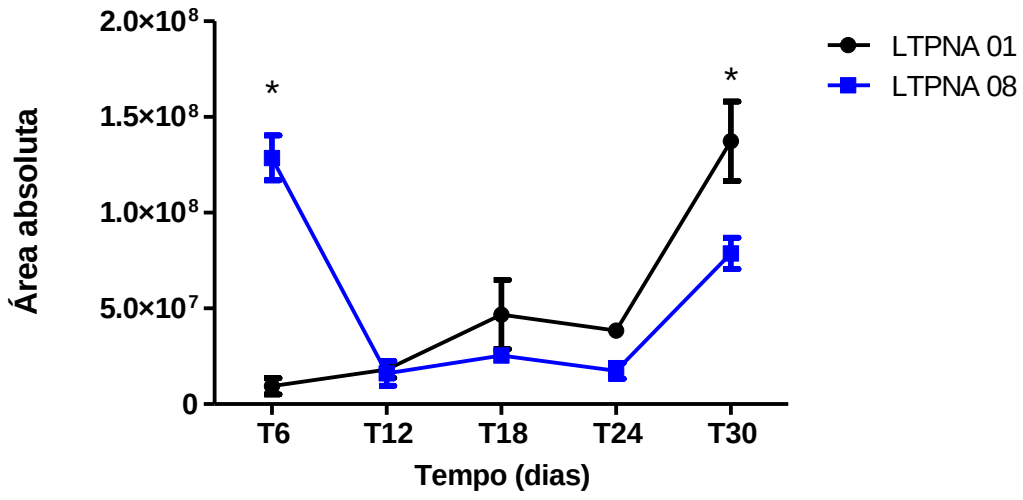


O COV β-ciclocitral mostrou aumentos e reduções em suas concentrações ao longo dos dias de crescimento nas duas linhagens

estudadas. Entretanto, apesar dessas variações não foram observadas diferenças estatísticas (P>0,05) na produção de β-ciclocitral entre as linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08.

Em amostras da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01, a produção de β-ionona não diferiu entre os tempos T6 e T12, apresentando concentrações mais intensas nos tempos T18 e T24, sem diferenças estatísticas entre eles, porém, com diferença significativa apenas no T30, fase em que os organismos encontravam-se em período de senescência (Figura 25). Já, ao se observar os diferentes tempos de crescimento nas amostras da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, notou-se que a produção de β- ionona foi mais intensa no tempo inicial T6, com diferenças significativas em relação aos demais tempos (T12, T18, T24 e T30). Os tempos T12, T18 e T24, não apresentaram diferença significativa entre si, voltando a apresentar aumento significativo no tempo de crescimento T30 (Figura 25).

Figura 25: Produção de **β- ionona** durante 30 dias de crescimento das linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Os asteriscos representam valores de P<0,001.



Foram observadas diferenças estatísticas significativas (P<0,001) nos tempos T6 e T30 na concentração de β-ciclocitral entre as linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08.

Comparando-se a produção do composto β-ciclocitral e a produção de β-ionona ao longo do tempo de crescimento das linhagens LTPNA 01 e 08, notou-se que a produção dos compostos foi mais intensa em amostras referentes à linhagem não produtora de toxinas (LTPNA 01) que as amostras pertencentes à linhagem produtora de toxinas (LTPNA 08). Embora tal observação tenha sido realizada, não existem relatos na literatura que a produção desses compostos esteja relacionada com a produção de toxinas. Observou-se ainda que, a produção máxima de β-ciclocitral ocorre no 18º dia de crescimento, enquanto que, para o COV β-ionona, apesar da variação de produção ao longo do tempo estudado, é necessário mais de 30 dias para observar produção máxima das células de LTPNA 01 e LTPNA 08.

A elevada concentração do composto β-ciclocitral nas amostras de LTPNA 01 e 08 nos diferentes tempos de crescimento estudados pode ser decorrente da maior biossíntese de β-caroteno realizada por *Microcystis.* Segundo Harada *et* al. (2009), os compostos β- ciclocitral e a β- ionona são terpenos cíclicos, gerados a partir da decomposição oxidativa do β- caroteno e são largamente produzidos por espécies de *Microcystis*, principalmente quando as células desse organismo encontram-se em fase de crescimento estacionária.

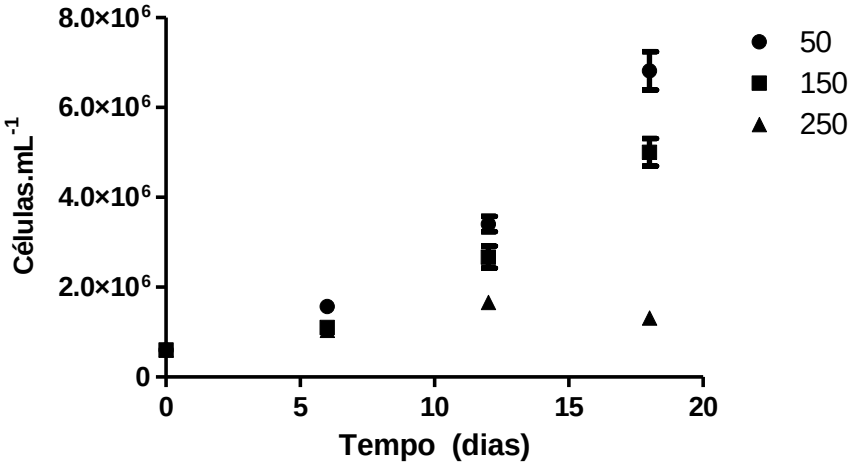
Assim sendo, as linhagens de *Microcystis aeruginosa* LTPNA 01 (não produtora de toxinas) e *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08 (produtora de toxinas) são produtoras de dois dos compostos mais comumente descritos na literatura: β- ciclocitral e β- ionona.

4.6. Influência de diferentes intensidades luminosas sobre a produção de metabólitos voláteis em duas linhagens de *Microcystis aeruginosa*

4.6.1. Efeitos sobre o crescimento

A curva de crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) nas intensidades 50, 150 e 250 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} está apresentada na Figura 26.

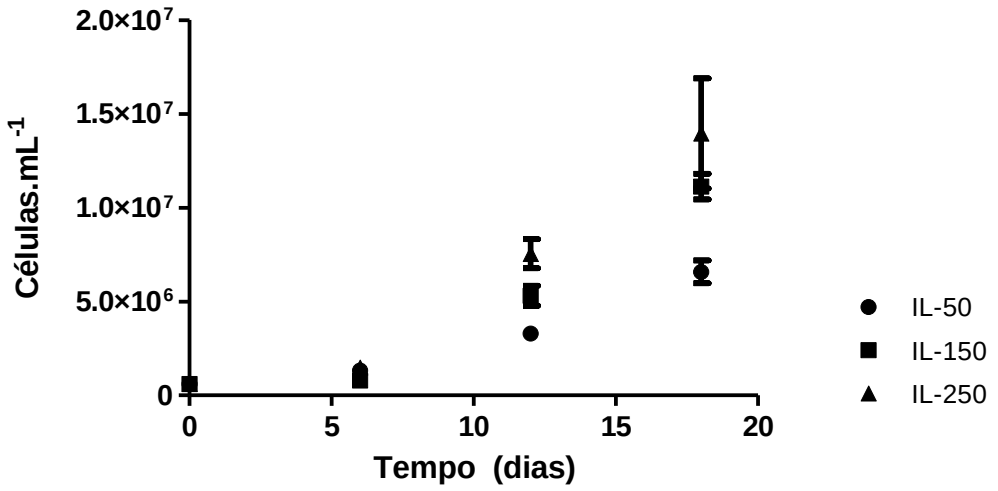
Figura 26: Curvas de crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) cultivada sob diferentes intensidades luminosas 50, 150 e 250 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}.



Na avaliação do efeito de diferentes intensidades sobre o crescimento de *M. aeruginosa* LTPNA 01 (Figura 26), foi possível observar que as células cresceram exponencialmente até o 18º dia de cultivo, com taxa de crescimento 0,356±2dia^{-1} para a intensidade IL 50 e de 0,3318±2 dia^{-1} para a intensidade IL 150, não observada fase de morte celular durante o tempo avaliado. Diferentemente da intensidade IL 250 que apresentou a menor taxa de crescimento de 0,2297±2dia^{-1} e morte celular em tempos subsequentes ao tempo 6.

A linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08 (Figura 27) cresceu exponencialmente até o 18º dia de cultivo, em todas as intensidades luminosas analisadas. A menor taxa de crescimento (0,3543 ±2dia^{-1}) foi observada para a linhagem crescida na intensidade 50 µmoles.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Na intensidade de 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}, a taxa de crescimento (0,4078±2dia^{-1}) apresentou valores intermediários. Já os maiores valores foram observados na condição IL-250, com taxa de crescimento de 0,427±2dia^{-1}.

Figura 27: Curvas de crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) cultivada sob diferentes intensidades luminosas 50, 150 e 250 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}.



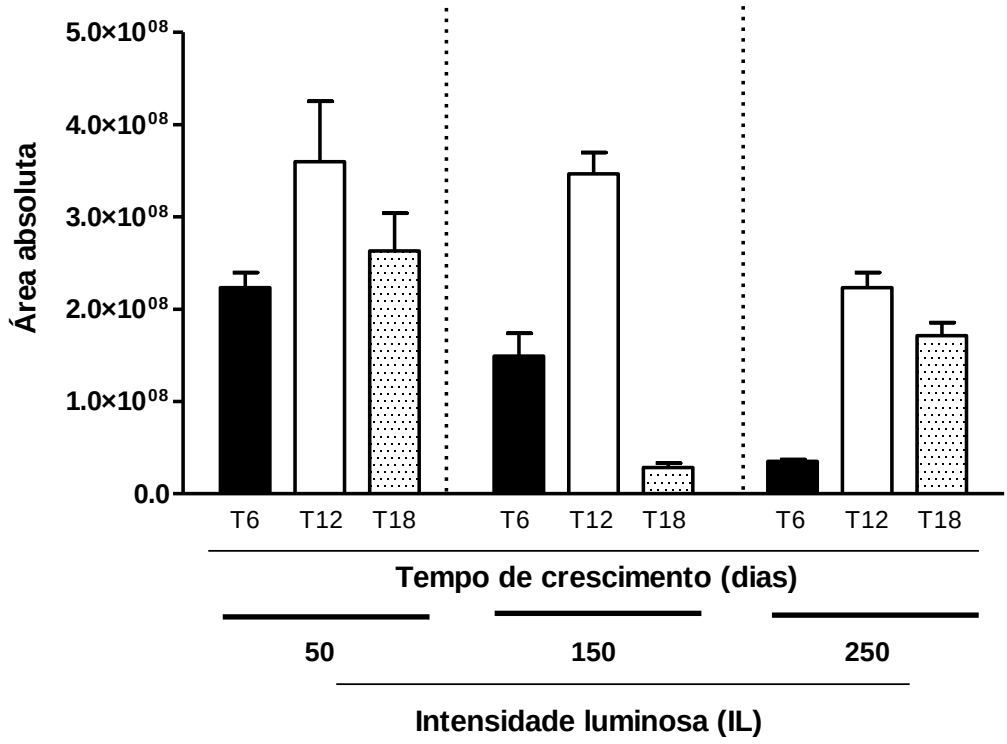
Dados semelhantes aos da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08 foram encontrados em estudos realizados por Molica (1996) e Carneiro (2005), quando verificaram que irradiâncias mais elevadas influenciam positivamente a taxa de crescimento. De acordo com Carneiro (2005), a maior taxa de crescimento para a linhagem *M. aeruginosa* (NPJB-1) foi observada a 100 µmol fótons m^{-2}. s^{-1}. As culturas mantidas a 40 µmol fótons m^{-2}. s^{-1} apresentaram as menores taxas de crescimento (µ=0,20). Molica (1996) também encontrou resultados semelhantes ao submeter *M. aeruginosa* (NPLJ- 4) a duas irradiâncias: 40 e 180 µmol fótons m^{-2}. s^{-1}. A maior taxa de crescimento foi

observada na cultura submetida à maior irradiância (μ=0,47 dia^{-1}) e as culturas mantidas a 40 μmol fótons m^{-2}. s^{-1} tiveram taxa de crescimento de 0,39 dia^{-1}.

4.6.2. Efeitos sobre a produção de COVs

Os compostos β-ciclocitral e β-ionona foram encontrados ao longo do crescimento das linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08 nas intensidades IL 50, 150 e 250 μmol fótons $m^{-2}.s^{-1}$. A produção desses compostos pela linhagem LTPNA 01 estão demonstrados na Figura 28.

Figura 28: Produção de β-ciclocitral durante os tempos de crescimento (T6, T12, T18) da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3)

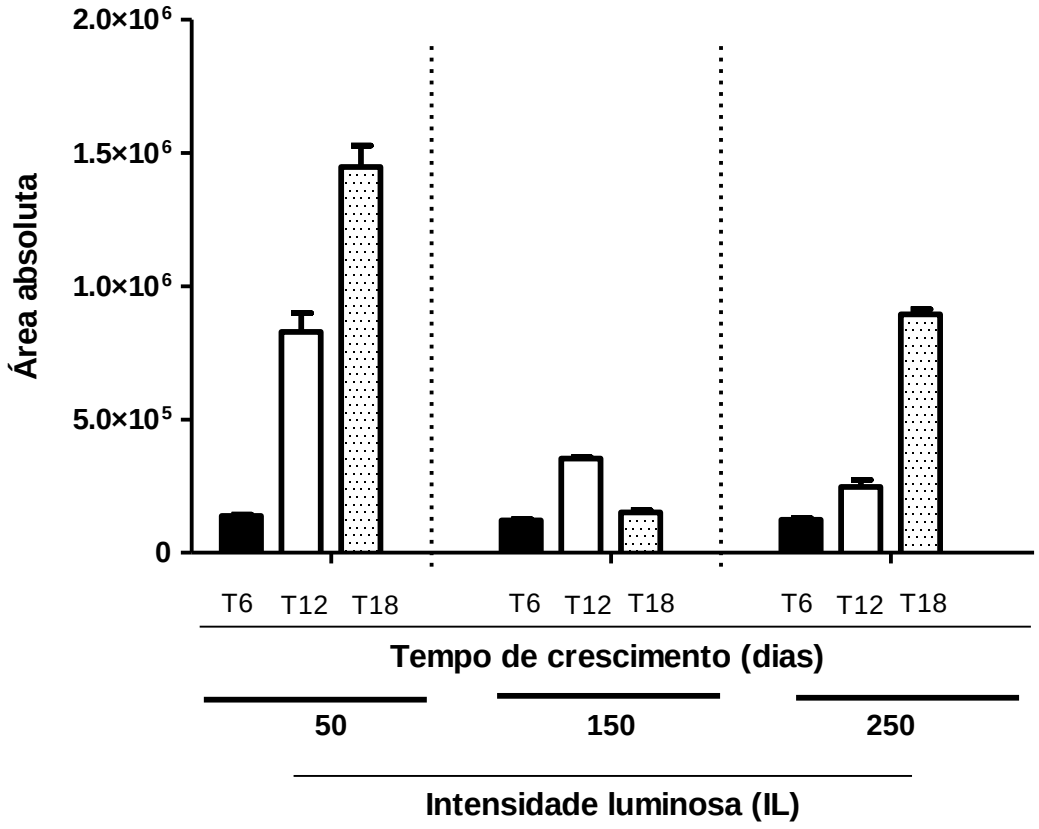


As concentrações do composto β-ciclocitral foram elevadas ao longo de todo crescimento na IL 50, com aumento no tempo T12. Neste mesmo tempo, foram também observadas concentrações mais altas nas IL 150 e 250. Em tal período, as células se encontravam em fase exponencial de crescimento com elevada atividade metabólica voltada para divisão celular. Avaliando a

produção na IL 150, foi possível obsevar que os tempos T6 e T12 apresentaram tendências semelhantes às encontradas na IL 50, porém, com menor concentração no tempo T18. Já na IL 250 a menor concentração do composto β- ciclocitral foi observada no tempo inicial (T6), com aumento significativo no tempo T12 e leve redução no tempo T18.

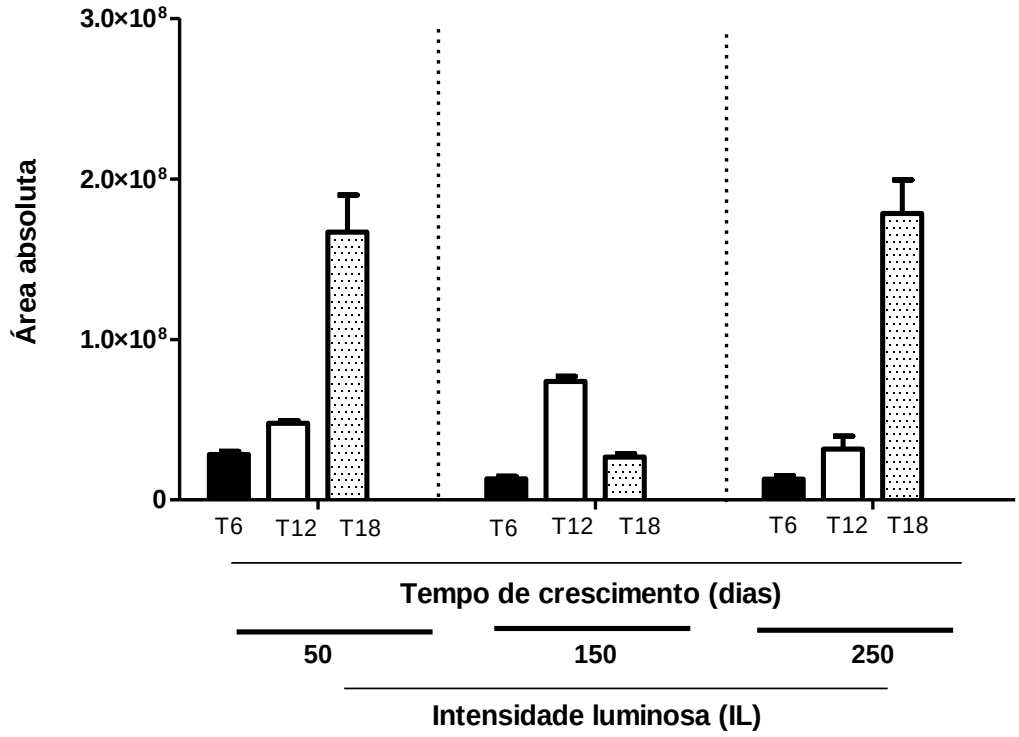
No perfil do composto β-ionona, produzido pela linhagem LTPNA 01, não foi observada diferença estatística (P>0,05) nos tempos iniciais entre as três intensidades testadas. Diferenças significativas (P<0,001) foram encontradas a partir do tempo T12 entre as IL 50 e 150 e entre 50 e 250. Já no tempo T18 as concentrações de β-ionona aumentaram em seus valores nas intensidades IL50 e 250 e sofreram redução na IL150 (Figura 29).

Figura 29: Produção de β- ionona durante os tempos de crescimento (T6, T12, T18) da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3)



Na avaliação de produção da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, as concentrações do composto β- ciclocitral oscilaram de forma semelhante nos tempos iniciais (T6) entre as intensidades luminosas. As concentrações do composto β- ciclocitral apresentaram uma maior tendência em sua produção no tempo de crescimento T12 na intensidade 150 μmol fótons $m^{-2}.s^{-1}$. Já a maior produção ocorreu no tempo T18 nas intensidades IL 50 e 250. Em ensaios realizados anteriormente, os maiores valores foram encontrados no tempo de crescimento T18 (período em que as células de *M. aeruginosa* encontravam-se em fase de crescimento exponencial) (Figura 30).

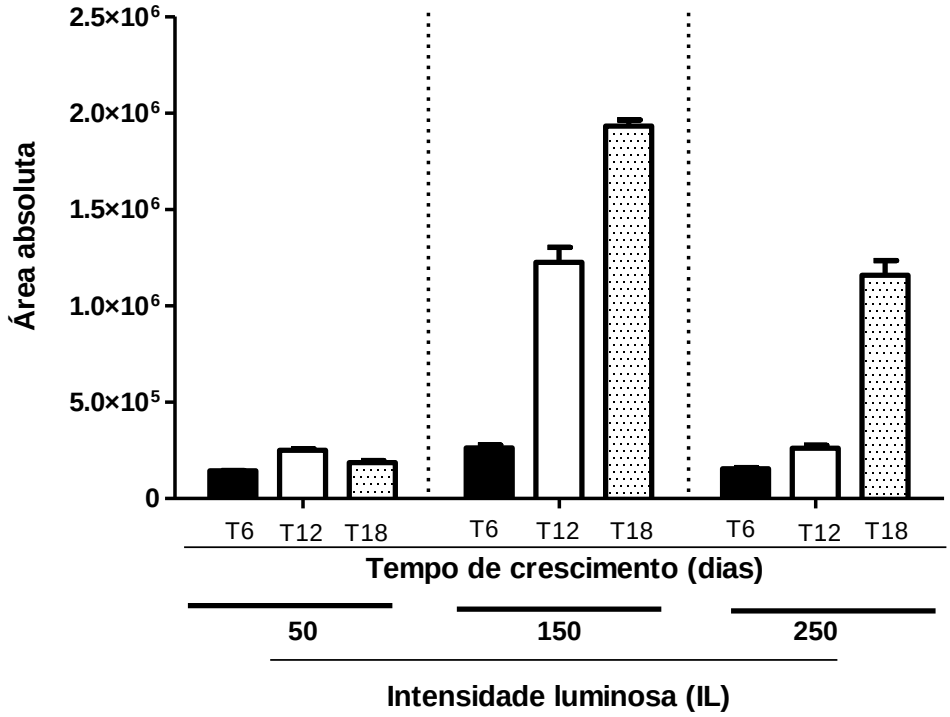
Figura 30: Produção de β- ciclocitral durante os tempos de crescimento (T6, T12, T18) da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3)



Com relação as concentrações do COV β- ionona, obtidas ao longo dos tempos da linhagem LTPNA 08, observou-se produção homogênea na IL 50, semelhante aos dados obtidos na IL 250, com exceção do tempo T18 que apresentou valores mais elevados entre essas duas intensidades. Não foram encontradas diferenças estatísticas no tempo T6 entre as intensidades. Observou-se ainda, que as concentrações obtidas nos tempos T12 e T18 na IL

150, foram as maiores quando comparadas com as intensidades 50 e 250 (Figura 31).

Figura 31: Produção de β- ionona durante os tempos de crescimento (T6, T12, T18) da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3)



Estudos demonstram que a produção de compostos orgânicos voláteis esteja associada com a fase de crescimento do organismo e com as linhagens de cianobactérias, bem como, com estímulos ambientais, tais como luz, temperatura e nutrientes, esses estímulos podem favorecer tanto um aumento da produção quanto da sensibilidade a estes compostos por alguns grupos de organismos (Ikawa M, et *al.* 2001). As linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 01 (não produtora de toxinas) e *M. aeruginosa* LTPNA 08 (produtora de microcistinas) apresentaram taxas de crescimento distintas quando expostas às variações de luz, com maiores produções em intensidades mais elevadas (IL 250) pela LTPNA 08.

Embora a taxa de crescimento tenha sido maior para células da linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 08 do que para células da linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 01, as concentrações de β- ciclocitral e β- ionona não seguiram tal tendência. As maiores concentrações de β- ciclocitral foram obtidas na intensidade IL 50, com valores mais elevados na linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01. Já as concentrações de β-ionona foram maiores na linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, com maiores concentrações na intensidade luminosa IL 150.

Pode-se inferir que intensidades elevadas (IL 250) favorece a taxa de crescimento da linhagem de *M. aeruginosa* produtora de toxinas LTPNA 08 e diminui a taxa de crescimento de *M. aeruginosa* não produtora de toxinas LTPNA 01 nos diferentes tempos de crescimento, conforme já observado por Li, et al. (2017), que intensidades mais baixas (IL 50), estimula a produção dos compostos β- ciclocitral e β- ionona nas duas linhagens, sendo mais abundante na linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01.

4.7- Efeitos da intensidade luminosa (50 e 150 µmol.fótons.m-2.s-1) sobre o ritmo circadiano da produção de compostos voláteis de M. aeruginosa (LTPNA 01 e LTPNA 08)

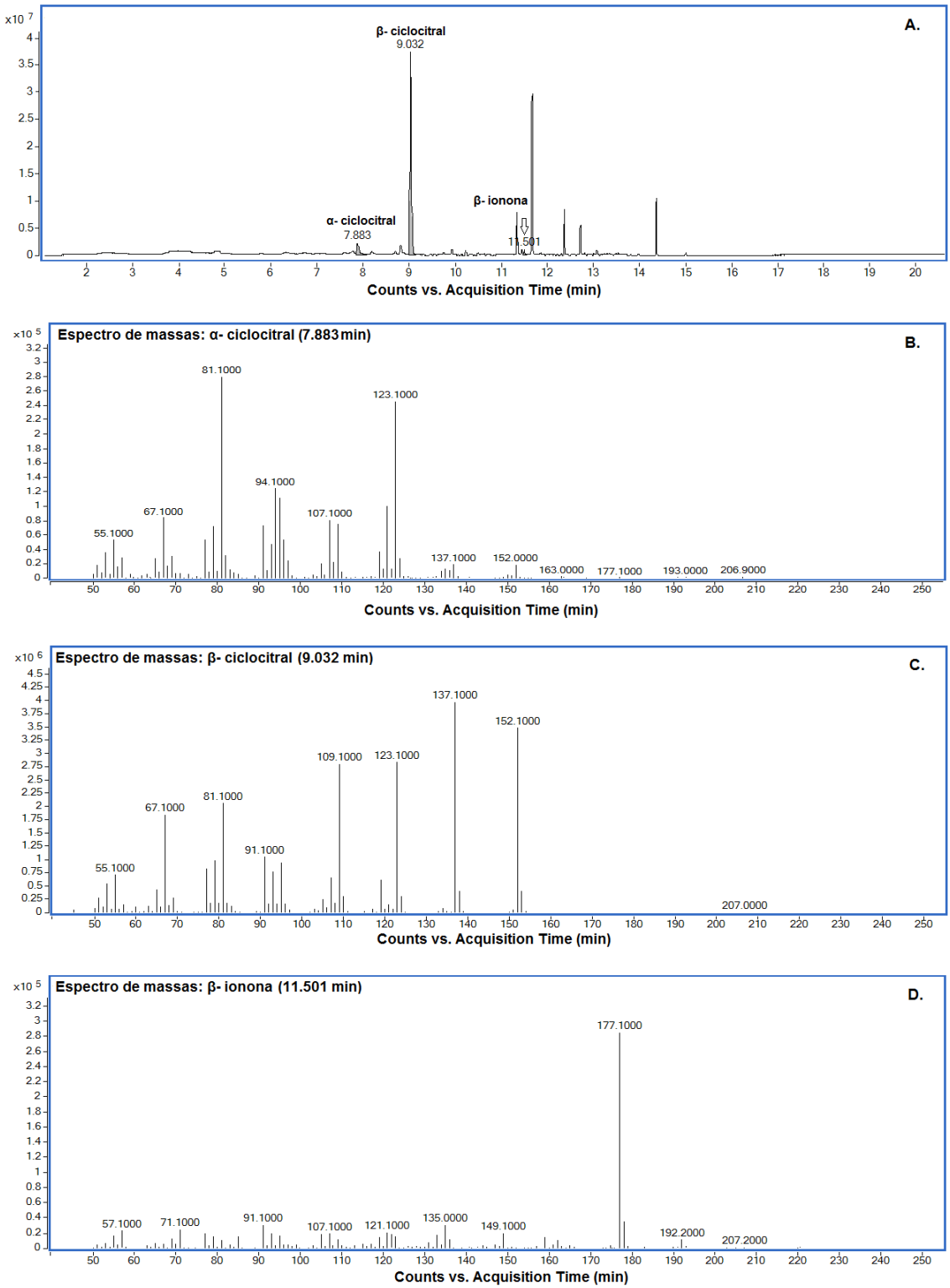
Foram realizados experimentos com duas linhagens de *M. aeruginosa* (LTPNA 01- não produtora de toxinas e LTPNA 08 – produtora de toxinas) para investigar as possíveis variações na produção de compostos orgânicos voláteis durante o ciclo de 48 horas e se as concentrações encontradas de compostos orgânicos voláteis seguem a mesma tendência nas duas linhagens estudas.

Em todas as amostragens realizadas foram detectados, majoritariamente, três compostos: α- ciclocitral, β- ciclocitral e a β- ionona. Os dois últimos compostos foram observados em outros ensaios anteriormente, porém neste experimento também foi observado. Embora o α- ciclocitral não estivesse contido no mix de soluções de padrões interno comerciais, usados para identificação e determinação dos tempos de retenção, a identidade deste

composto foi obtida por comparação do espectro de massas com espectros de referência disponíveis na biblioteca NIST 08.

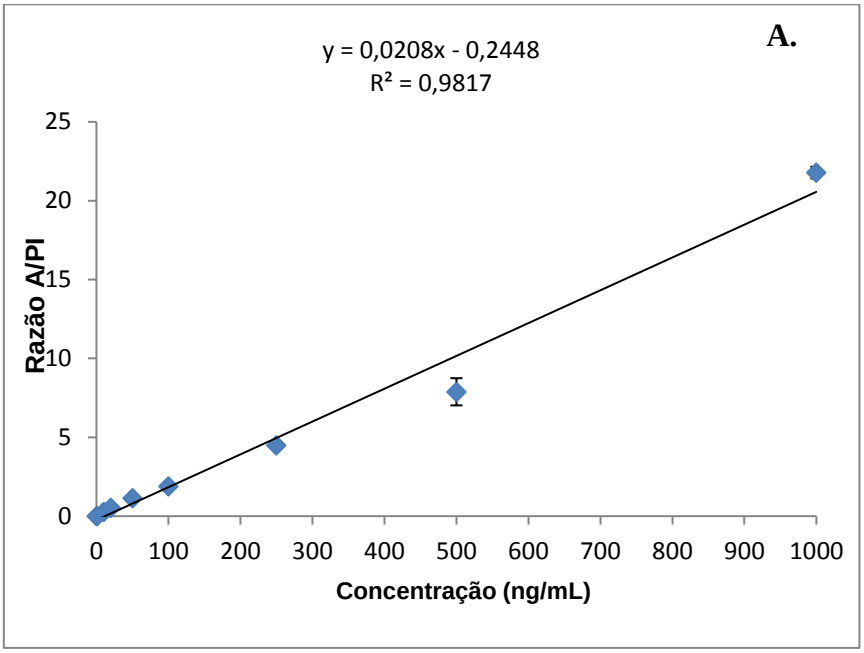
Como o perfil de COVs foi o mesmo para as linhagens de LTPNA 01 e LTPNA 08, sob intensidades luminosas de 50 e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} com variações na intensidade dos picos, apenas um cromatograma e o espectro de massas dos compostos encontrados nas amostras das linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 01e 08 estão representados na Figura 32.

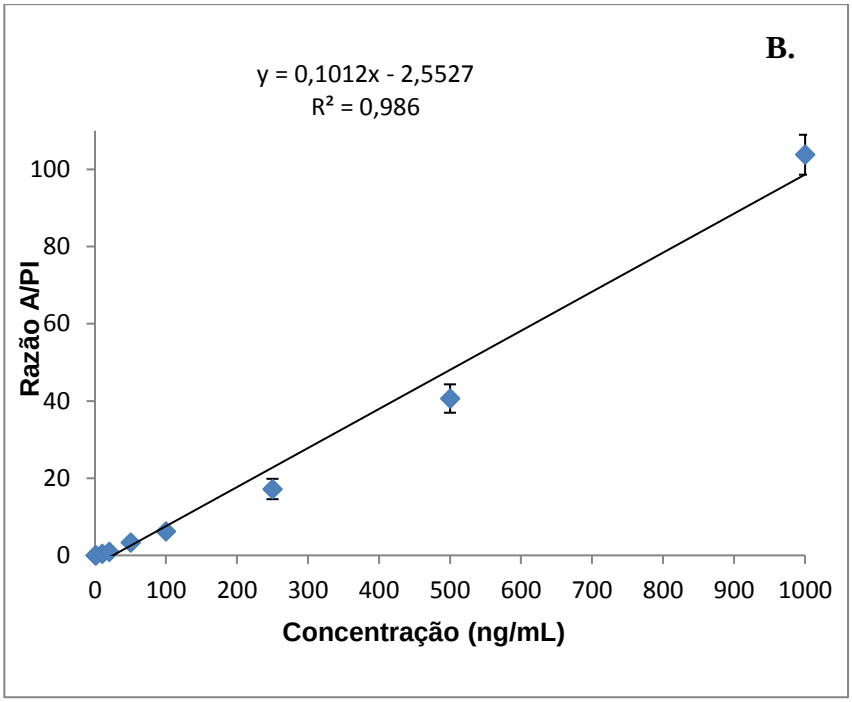
Figura 32: Cromatograma obtido por GC-MS modo SCAN (A.) e extração dos íons nos tempos de retenção 7.883 para o composto α- ciclocitral; 9.032 para o composto β-ciclocitral e 11.501 para o composto β- ionona e seus respectivos espectros de massas (B, C e D).



As curvas de calibração usadas na análise das amostras, construídas com padrões analíticos dos compostos dos compostos orgânicos voláteis β-ciclocitral e β- ionona, apresentaram valores de R^2 superiores a 0.98 (Figura 33).

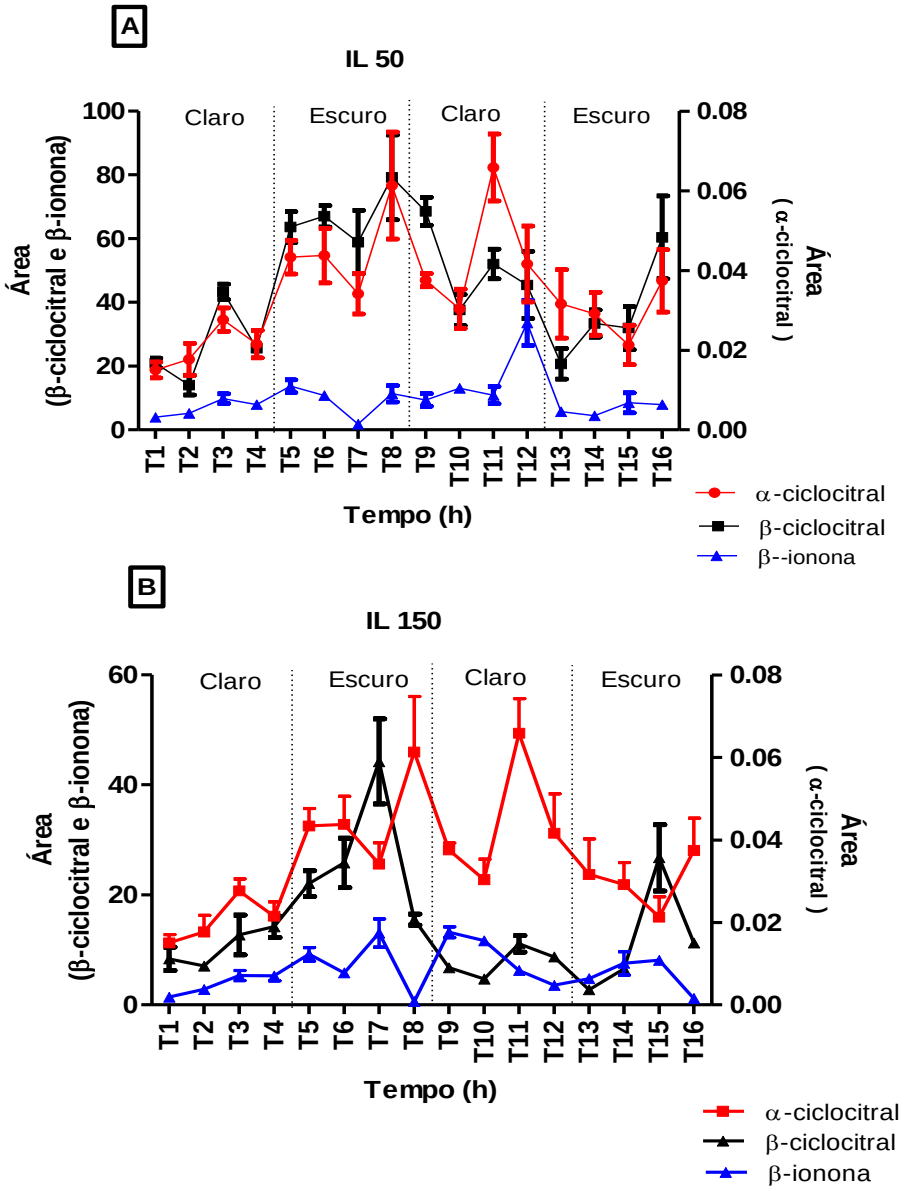
Figura 33: Curvas de calibração de **(A)** β-ciclocitral e **(B)** β-ionona, construídas com padrões analíticos em análises realizadas por GC/MS.





Pela integração dos picos cromatográficos obtidos, pôde-se determinar a concentração dos COVs encontrados. A produção destes compostos presentes na linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01, ao longo de 48 horas sob intensidades luminosas de 50 e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}, está representada na Figura 34.

Figura 34: Gráficos das concentrações dos compostos α- ciclocitral (vermelho), β-ciclocitral (preto) e β-ionona (azul) ao longo do ritmo circadiano de *Microcystis aeruginosa* LTPNA 01 sob intensidades luminosas de **A.** 50 e **B.** 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h

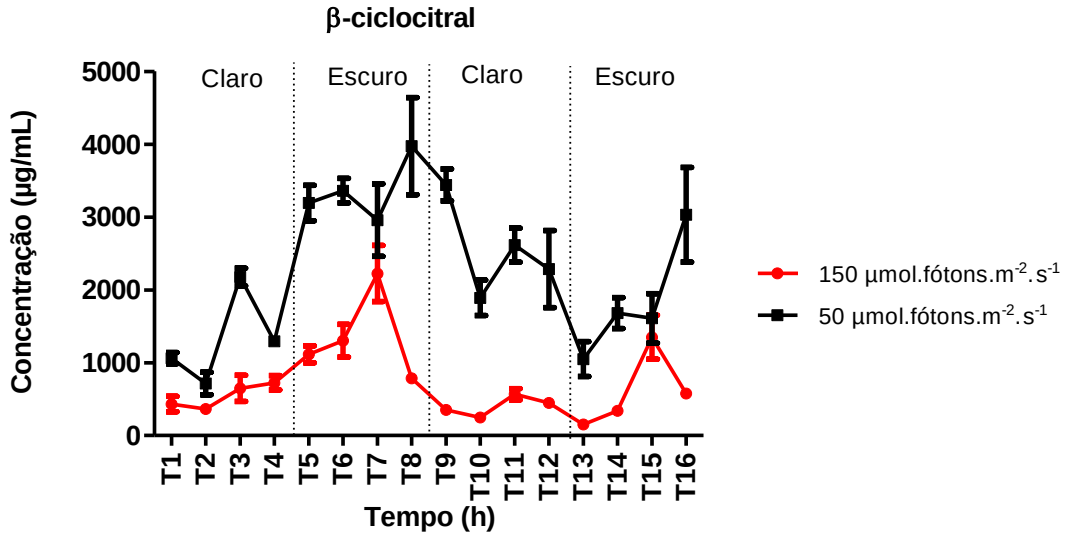


Ao analisar o perfil de COVs da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01, pode-se observar que os três compostos foram identificados nas duas intensidades testadas. A produção desses compostos variou de forma semelhante nas intensidades luminosas IL 50 e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}, com concentrações maiores na IL 50. As concentrações do composto β- ciclocitral

encontradas na LTPNA 01 foram maiores quando comparadas às concentrações dos compostos α- ciclocitral e β-ionona ao longo de todas as amostragens nas duas intensidades testadas. Observou-se ainda, que apesar dos compostos estarem em escalas diferentes, as maiores concentrações dos compostos foram obtidas no período em que culturas não estavam recebendo luz (Figura 34).

As amostragens ocorreram no período de 48 horas sendo avaliadas em dois ciclos de 24 horas. Assim, na avaliação do perfil do composto β-ciclocitral (Figura 35), obtido entre as intensidades luminosas 50 e 150 μmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}, não foi observada diferença estatisticamente significativa (P>0,05), nos tempos iniciais do período claro, exceto no tempo T3 (P<0,001). Já no início do período escuro, as concentrações apresentaram diferenças significativas (P< 0,001) nos tempos T5, T6 entre as L 50 e IL 150, sem diferenças no tempo T7. Entretanto, apesar de não ter sido observada diferença estatística nesse tempo, foi possível analisar que as concentrações na IL 50 foram inversas às obtidas na IL 150. No fim do período escuro na IL 50, tempo T8, os valores foram superiores ao T7, o mais elevado dentre os quatro tempos (T5, T6, T7 e T8) e significativamente diferente (P<0,001) em relação ao tempo T8 da intensidade luminosa 150. As concentrações de β-ciclocitral apresentaram uma redução em seus valores após 3 horas do início do período claro (segundo ciclo) e com diferenças significativas (P<0,001) entre as duas intensidades luminosas em todos os tempos. Porém, com variações mais intensas nos tempos na IL 50. Ao avaliar o segundo ciclo do período escuro, foi observada diferença significativa (P<0,01) no tempo 13 entre as IL 50 e 150, tendendo a aumentar seis horas após seu início. Os períodos subsequentes apresentaram diferenças estatísticas (P<0,001) entre as duas intensidades estudadas. As concentrações obtidas na IL 15 foram inferiores aos da IL50 em todos os tempos analisados e diferiram significativamente em praticamente todos eles. Contudo, no tempo T15 as concentrações obtidas nas duas intensidades foram praticamente iguais e não apresentando diferenças significativas entre si (Figura 35).

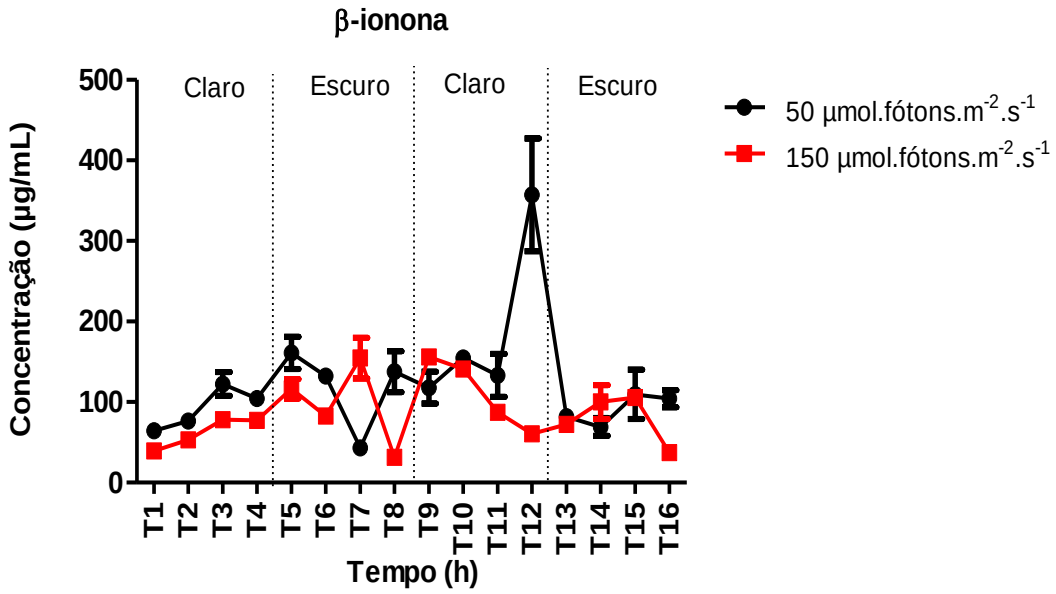
Figura 35: Produção do composto β- ciclocitral ao longo do ritmo circadiano de LTPNA 01 entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h



Com relação a produção do COV β- ionona, observou-se um aumento na concentração nas intensidades luminosas 50 e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} nos tempos iniciais do período claro, com uma leve redução no fim desse período. No entanto, os valores não se mostraram estatisticamente significativos. Ao avaliar o período escuro foi possível observar que a β- ionona apresentou uma tendência de aumento em suas concentrações após 3 horas de início do período, com diferenças significativas, nos tempos T6 ($P< 0,05$) e T7 e T8 ($P< 0,01$) entre as duas intensidades. Observou-se ainda, que as concentrações obtidas nos tempos T7 e T8 na IL 50 foram inversas às obtidas na IL 150. Já no período claro (segundo ciclo) não ocorreram variações significantes nos tempos T9 e T10 com aumento nas últimas seis horas e variações significativas nos tempos T11 ($P<0,05$) e T12 ($P<0,001$) (Figura 36). A produção de β- ionona foi, isoladamente, maior no tempo T12 na intensidade IL 50, sendo a maior concentração obtida em todos os tempos observados. Foi possível observar ainda, que os valores na IL 50 passaram a ser reduzidos no início do tempo 13

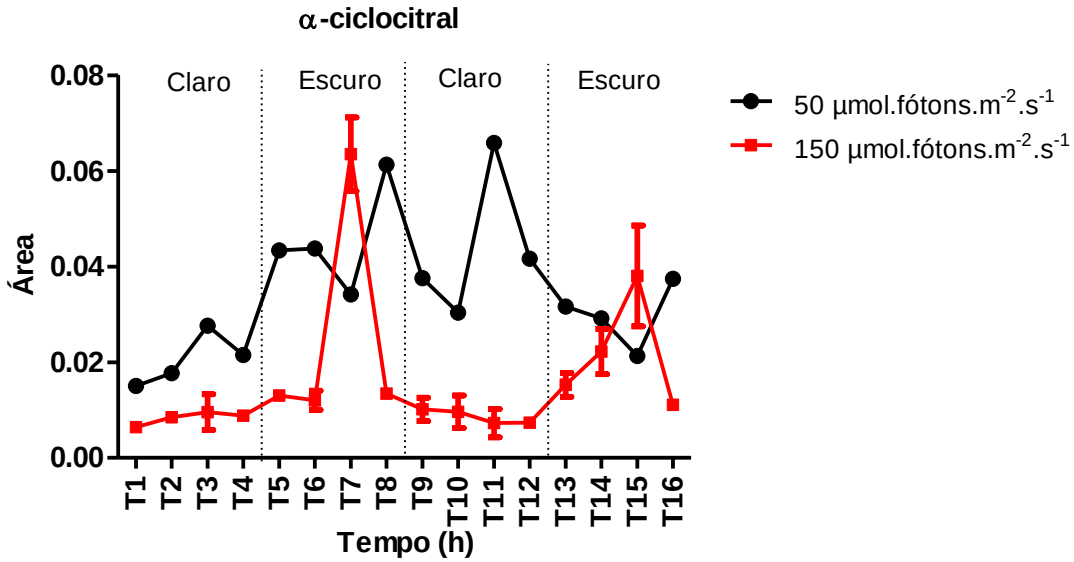
(segundo ciclo no escuro), semelhantemente às concentrações encontrados na IL 150, sem diferença significativa em todos os tempos, exceto no tempo 16 com diferenças significativas (P<0,001) entre as duas intensidades (Figura 36).

Figura 36: Produção do composto β- ionona ao longo do ritmo circadiano de *M.aeruginosa* LTPNA 01 entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h



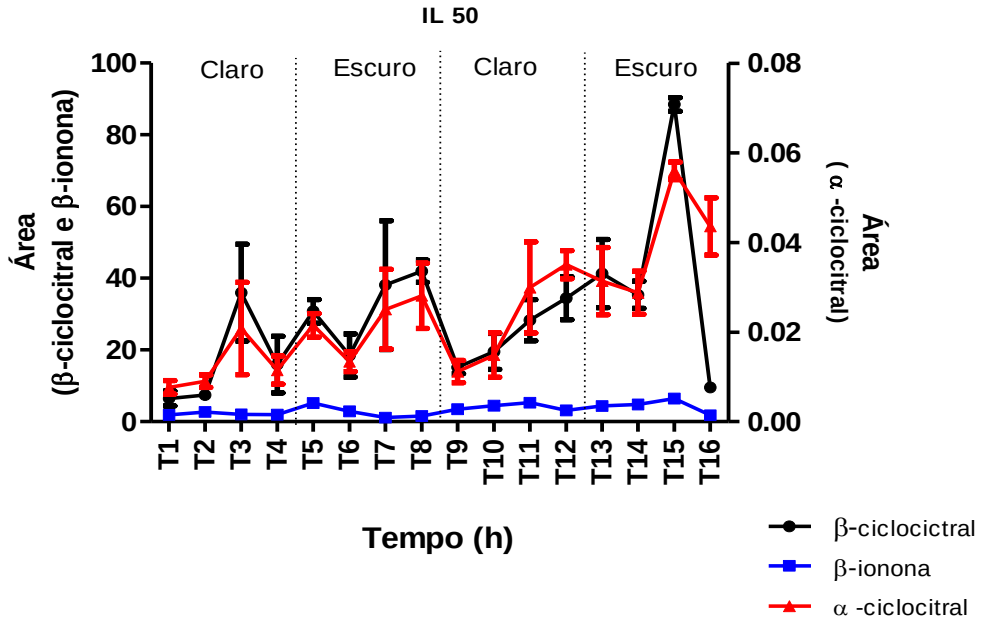
As concentrações do composto α- ciclocitral permaneceram constantes ao longo do período claro na IL150. Já no período escuro, as maiores variações ocorreram no tempo T7 e em todos os tempos do último ciclo do período escuro (tempo 13 – 16). Na IL 50 os níveis da concentração do composto α- ciclocitral apresentaram oscilações nos períodos claro e escuro. Porém, os níveis de produção aumentaram no início do período escuro (primeiro ciclo) e diminuíram expressivamente no fim do início do período escuro no segundo ciclo. Diferenças foram observadas entre as IL50 e 150 nos tempos T3 (P<0,01), T9, T10, T11 e T12 (P<0,001) no período claro. E, diferenças significativas em praticamente todos os tempos T5, T6, T7 e T8 (P<0,001) e T13, T14 (P<0,01), T15 (P<0,001) entre as duas intensidades luminosas no período escuro (Figura 37).

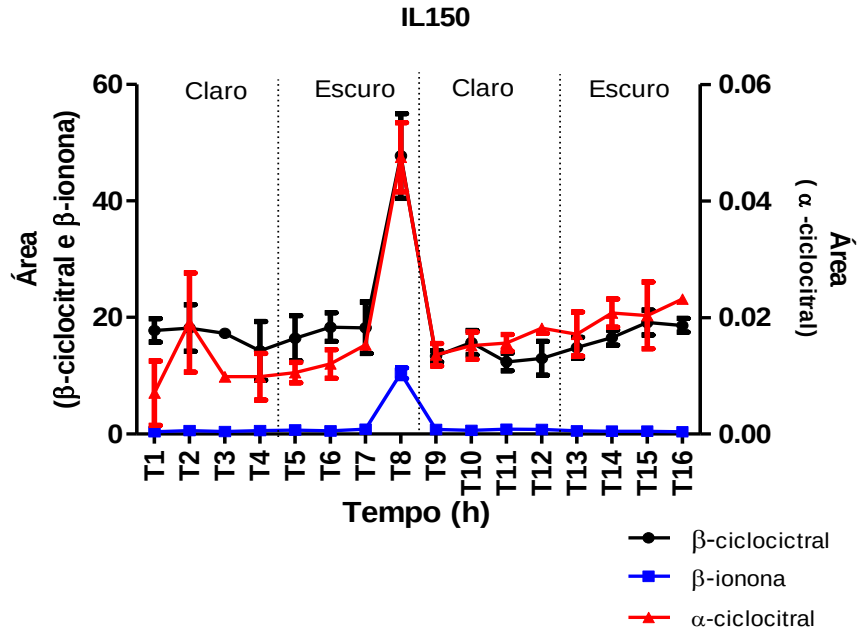
Figura 37: Produção do composto α- ciclocitral ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* LTPNA 01 entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h



No perfil da variação circadiana da linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 08, pode-se observar que na IL50 as concentrações dos compostos apresentaram oscilações em todos os tempos com maiores picos no segundo ciclo do período escuro. Já na IL 150, observa-se que a produção ocorreu de forma homogênea ao longo do estudo. Porém, as concentrações dos compostos aumentaram, isoladamente, no tempo T8, fim do período escuro e decaíram no início do período claro (Figura 38).

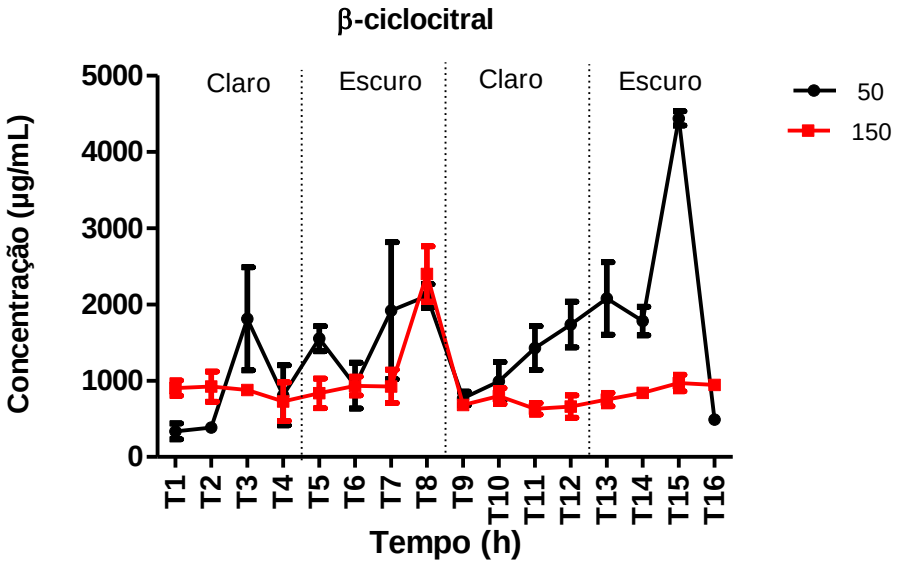
Figura 38: Gráficos das concentrações dos compostos α- ciclocitral (vermelho), β-ciclocitral (preto) e β-ionona (azul) ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* **LTPNA 08** sob intensidades luminosas de **A.** 50 e **B.** 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h





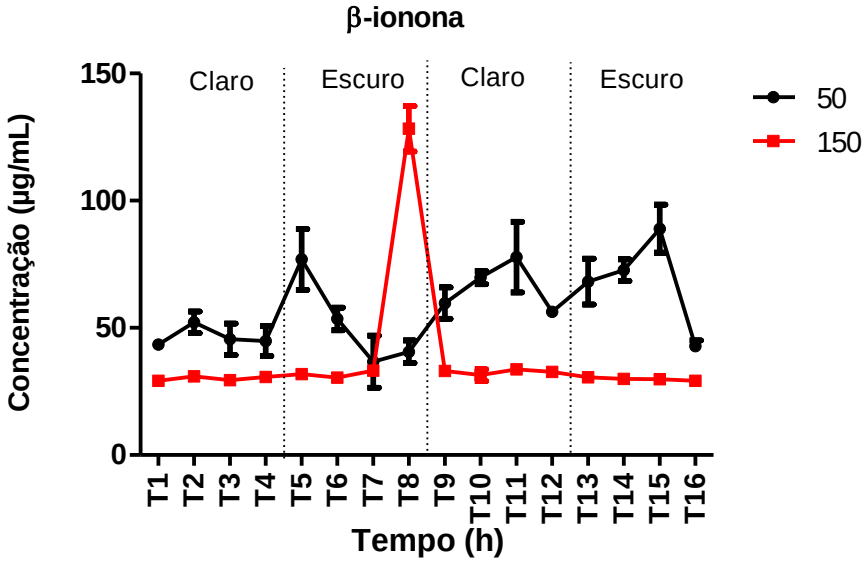
Na avaliação do COV β- ciclocitral produzido pela linhagem LTPNA 08, foi possível observar que os maiores valores ocorreram na IL 50 e no periodo escuro. Já na intensidade IL 150 a produção de β – ciclocitral ocorreu de forma homogênea em todos os períodos com acentuado aumento no tempo T8. Não foi observada diferença estatisticamente significativa (P>0,05) no perfil do composto β-ciclocitral obtido entre as intensidades luminosas 50 e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}, nos tempos iniciais do período claro nos dois ciclos analisados, exceto nos tempos T3 (P<0,01). Já no início do período escuro, as concentrações apresentaram diferenças significativas (P< 0,001) nos tempos T5, T6 entre as L 50 e IL 150, sem diferenças no tempo T7 (Figura 39).

Figura 39: Produção do composto β- ciclocitral ao longo do ritmo circadiano de *M.aeruginosa* **LTPNA 08** entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h



Em todos os ciclos analisados na IL 50 as concentrações de β- ionona mostraram aumentos e reduções simultâneos, com maiores diferenças entre os tempos T5 e T13. Diferentemente ocorreu na intensidade luminosa 150, em que as concentrações obtidas exibiram ritmo homogêneo em todos os ciclos, exceto no tempo T8. Embora o COV β- ionona tenha sido produzido de forma homogênea na IL 150, praticamente todos os tempos apresentaram diferenças estatisticamente significativas (P<0,01) quando comparados com a IL 50 (figura 40).

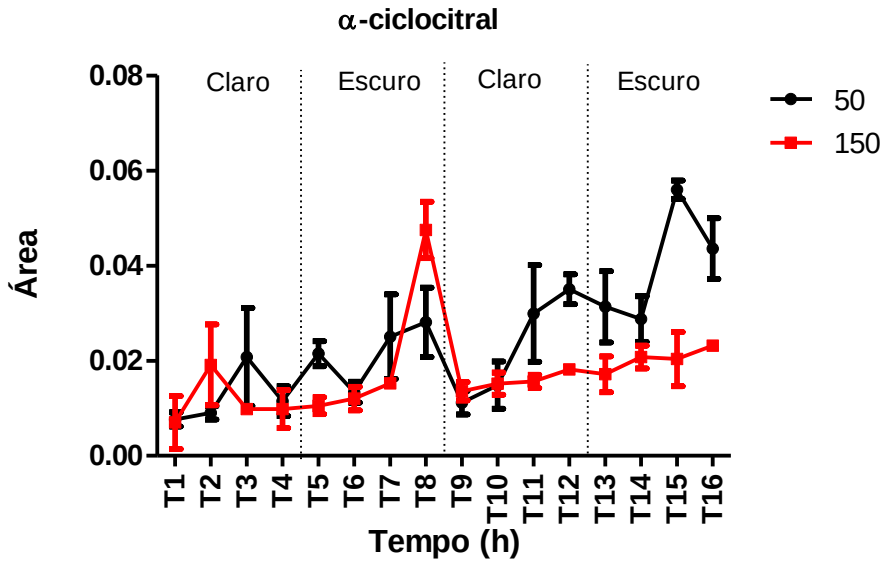
Figura 40: Produção do composto β- ionona ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* **LTPNA 08** entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h



Comparando-se a produção do composto α- ciclocitral entre as intensidades luminosas, observa-se que as concentrações foram mais intensas na IL 50 com valores levemente maiores, no período escuro. Nota-se ainda, que, embora não tenham surgido diferenças estatísticas significativas nos tempos iniciais entre as intensidades, as concentrações variaram de forma inversa nos tempos T 2 e T3. Diferenças significativas foram observadas nos

tempos T8, T15 e 16 (P<0,001), T11 e T13 (P<0,05), T12 (P<0,01), entre as intensidades 50 e 150 (Figura 41).

Figura 41: Produção do composto α- ciclocitral ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* **LTPNA 08** entre as intensidades luminosas de 50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h



Até meados de 1985, diversos estudos indicavam que os ritmos circadianos existiam exclusivamente em eucariotos por se supor que um cronometro endógeno marcado por um período com cerca de 24 horas não seria útil aos organismos que se dividem mais de uma vez ao longo deste intervalo de tempo, como ocorre em muitos procariotos (Johnson et *al*., 1996). Entretanto, a partir de estudos com cianobactérias a presença de ritmos circadianos em organismos procariotos foi comprovada. Até o momento, foram encontrados estudos que tratam, principalmente, da fixação de nitrogênio, divisão celular, fotossíntese, e captação de aminoácidos, síntese de carboidratos e, biossíntese de microcistinas, saxitona e neosaxitoxina, densidade populacional e nada sobre a produção de compostos orgânicos voláteis relacionados ao ritmo circadiano de cianobactérias.

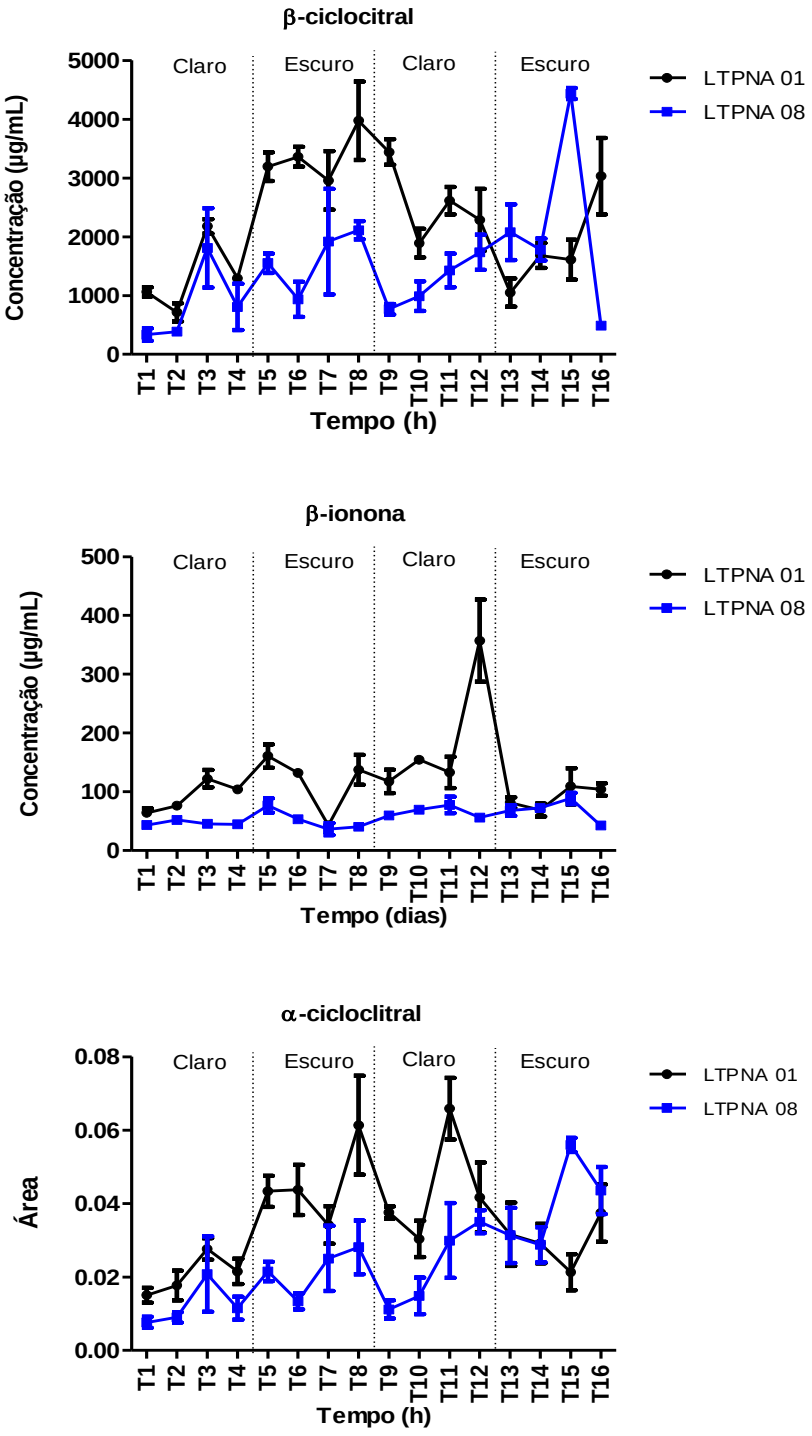
As concentrações dos compostos na intensidade IL 50 produzidos nos ciclos claro: escuro pelas linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 01 (não produtora de toxinas) e *M. aeruginosa* LTPNA 08 (produtora de microcistinas) apresentaram variações semelhantes entre os mesmos horários, porém, com valores mais intensos em amostras pertencentes à linhagem não toxigênica (LTPNA 01). As maiores diferenças entre as concentrações de COVs em horários de coleta consecutivos ficaram nos períodos entre os tempos T5 e T12, nas duas linhagens estudadas (Figura 42).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P>0,05$) nos tempos iniciais da produção de β-ciclocitral entre as linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08. Por outro lado, em relação aos tempos subsequentes T5, T6, T8, T9, 15 e T16 ($P<0,001$), T7 e T11 ($P<0,01$) e T10 e T13 ($P<0,05$), diferenças significativas ocorreram (Figura 42).

Em todos os ciclos analisados, a β- ionona mostrou aumentos e reduções em suas concentrações em amostras pertencentes à LTPNA 08. Fato contrário foi observado nas amostras de LTPNA 01 com produção homogênea em todos ciclos. Assim, diferenças significativas entre as linhagens 01 e 08 foram obtidas nos tempos T3, T5, T6, T8, T10, T12, T16 ($P<0,001$), T4, T9 e T11 ($P<0,01$).

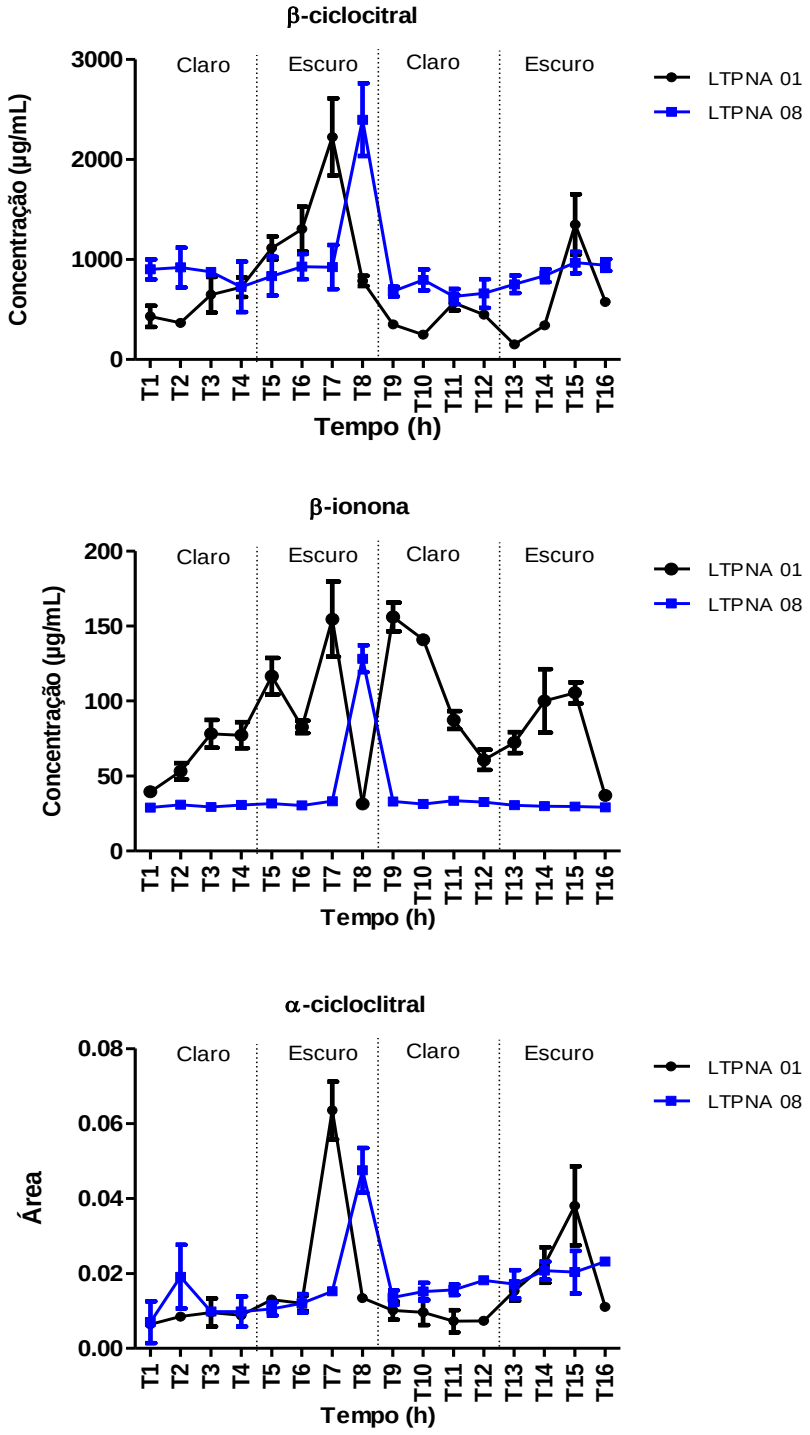
Com base na comparação das concentrações de α- ciclocitral avaliadas em ambas linhagens, pode-se perceber que a espécie *M. aeruginosa* LTPNA 01 produziu maiores concentrações do que a *M. aeruginosa* LTPNA 08 com diferenças significativas nos tempos T5, T6, T8, T9, T11, T15 ($P<0,001$), T10 ($P<0,05$).

Figura 42: Gráficos das concentrações dos compostos **A)** α- ciclocitral, **B)** β- ciclocitral e **C)** β-ionona ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* **LTPNA 01 e LTPNA 08** sob intensidade luminosa de **50 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}**. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Tempos T1:7h; T2:10h; T3:13h; T4:16h; T5:19h; T6:22h; T7:1h; T8:4h; T9:7h; T10:10h; T11:13h; T12:16h; T13:19h; T14:22h; T15:1h; T16:4h



Pela análise das concentrações dos compostos obtidos na intensidade luminosa 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1} pode-se observar que os valores dos compostos α - ciclocitral e β- ciclocitral foram maiores em amostras pertencentes a linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 01 do que a linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 08 em praticamente todos os ciclos claro:escuro. Observou-se ainda que as concentrações de β- ionona produzidas pela linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 08, foram significativamente inferiores às concentrações de *M. aeruginosa* LTPNA 01 com diferenças estatísticas em todos os tempos ($P<0,001$), exceto nos tempos T1 e T16 (Figura 43).

Figura 43: Gráficos das concentrações dos compostos A) β- ciclocitral, B) β-ionona e C) α- ciclocitral ao longo do ritmo circadiano de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e LTPNA 08 sob intensidade luminosa de 150 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). β- ciclocitral: T1 e T14 (P<0,05), T2, T7, T8, T10 e T13 (P<0,001), α- ciclocitral: T2, T12 (P<0,05), T7, T8 e T15 (P<0,001)



O β- ciclocitral foi o composto de maior abundância encontrado nas linhagens LTPNA 01 e 08, bem como nas duas intensidades testadas e em todos os períodos analisados. Surpreendentemente, as concentrações de β-ciclocitral encontradas nas duas espécies de *M. aeruginosa* foram muito maiores do que as normalmente encontradas no ambiente.

Embora as condições testadas assemelhem-se às condições encontradas no ambiente natural e às condições que esses organismos foram aclimatados, a elevada produção de compostos orgânicos voláteis no período escuro, pode estar relacionada ao estresse devido à falta de luz. De acordo com Wood et *al*. (2010) a luz é um estímulo externo que pode influenciar os ritmos circadianos em cianobactérias, pois a proteína CikA repassa sinais ambientais para o oscilador circadiano utilizando um estado redox como medida da luz. Porém, não existem na literatura, relatos sobre a associação da produção de compostos orgânicos voláteis com ausência de luz, nem tampouco, a produção de compostos orgânicos voláteis associados a produção de toxinas e/ou a outros metabólitos secundários. Fato que torna o experimento ainda mais interessante.

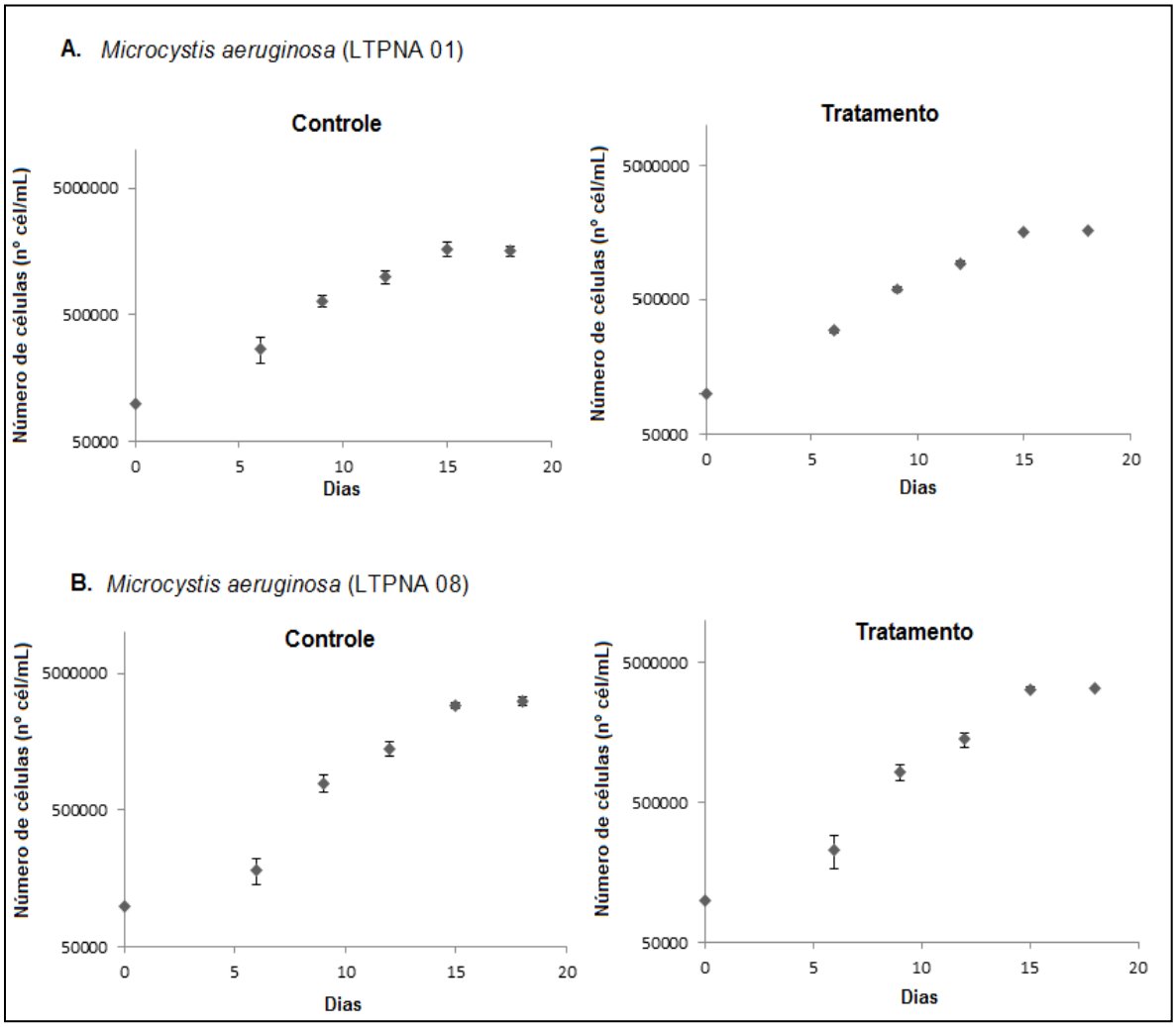
4.8. Ensaios aleloquímicos

4.8.1- Efeitos de β- ionona (composto comercial) sobre o crescimento de *M. aeruginosa*

Ensaios com padrões de formulações comerciais de β- ionona foram adicionados aos cultivos de duas linhagens de *M. aeruginosa*, e o crescimento monitorado. As curvas de crescimento para as condições controle (C- sem adição de padrão de β- Ionona) e tratamento (T- com adição de β- Ionona) das

linhagens LTPNA 01 (não produtora de toxinas) e LTPNA 08 (produtora de toxinas) estão apresentadas na Figura 44.

Figura 44: Curvas de crescimento de **A.** *M. aeruginosa* (LTPNA 01) e **B.** *M. aeruginosa* (LTPNA 08) em condições de cultivo: Controle - sem adição de padrão eTratamento – com adição de padrão



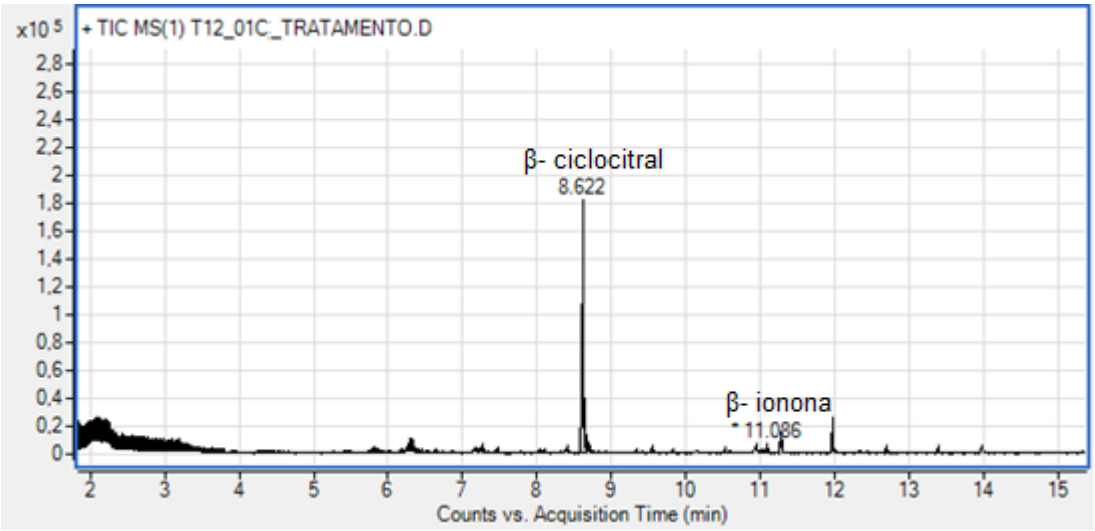
As células de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) (Figura 44 A.) cultivadas na condição Controle, cresceram exponencialmente até o 15º dia de cultivo (R^2 =0,9904), com taxa de crescimento de crescimento de 0,1919 ± 0,02dia^{-1}. Na condição Tratamento foi observado crescimento exponencial até o 15º dia (R^2= 0,9959) com taxa de crescimento de 0,1866 ± 0,02dia^{-1}. Situações semelhantes foram observadas em células de *M. aeruginosa* (LTPNA 08); que apresentaram crescimento exponencial até o 15º dia (R^2 =0,9458) com taxa de crescimento de 0, 2372 ± 0, 02.dia^{-1}, para células cultivadas na condição Controle. Na condição Tratamento também foi observado crescimento exponencial até o 15º dia (R^2= 0,9698) com taxa de crescimento de 0,2381 ± 0, 02.dia^{-1} (Figura 44

B.). De acordo com o Test t-Student (P>0,05) realizado não houve diferenças significativas entre os grupos Controle e Tratamento, tanto para LTPNA 01 quanto para LTPNA 08, indicando que não ocorreu inibição ou aumento na taxa de crescimento na condição Tratamento em relação a condição Controle. De acordo com experimentos realizados por Ozaki et *al*. (2008), após 23 horas à adição do padrão de β- ionona na concentração de 2,5 mM aos cultivos ocorreu a lise das células de cianobactérias, transformando culturas verdes em azuis. Por essa razão, decidiu-se neste experimento utilizar uma concentração mais baixa, pois o objetivo era acompanhar e avaliar a resposta das células de cianobactérias à adição de β- ionona ao longo do seu crescimento. A adição de concentrações maiores que 0,01 mM poderia implicar na lise das células, inviabilizando o acompanhamento ao longo do seu crescimento.

4.8.1.1 Efeitos de β- ionona sobre a produção de COVs

Em todas as análises realizadas ao longo do crescimento das linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08, nas condições controle (C- sem adição de padrão de β- Ionona) e tratamento (T- com adição de β- Ionona), foram detectados dois compostos, o composto β- ionona e o composto β- ciclocitral. Como o perfil de produção dos compostos foi o mesmo nas duas linhagens, e também, nas condições controle e tratamento, com uma pequena variação na intensidade dos picos, apenas um cromatograma representativo da condição está representado na Figura 45.

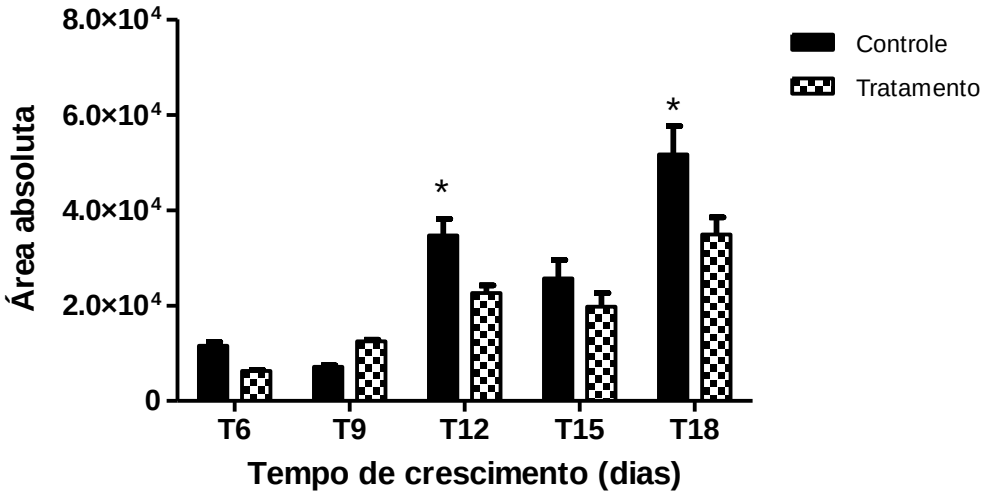
Figura 45: Cromatograma representativo do perfil de COVs das linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08, na condição tratamento, obtido por GC-MS modo SCAN.



Ao comparar as análises dos compostos β-ciclocitral em relação a resposta em área ao longo do crescimento das linhagens LTPNA 01, nas condições controle (C- sem adição de padrão de β- ionona) e tratamento (T- com adição de β- ionona), é possível observar que a linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 01 apresenta significativa produção do composto β- ciclocitral nas duas condições estudadas (C e T), com maiores produções na condição Controle (Figura 46).

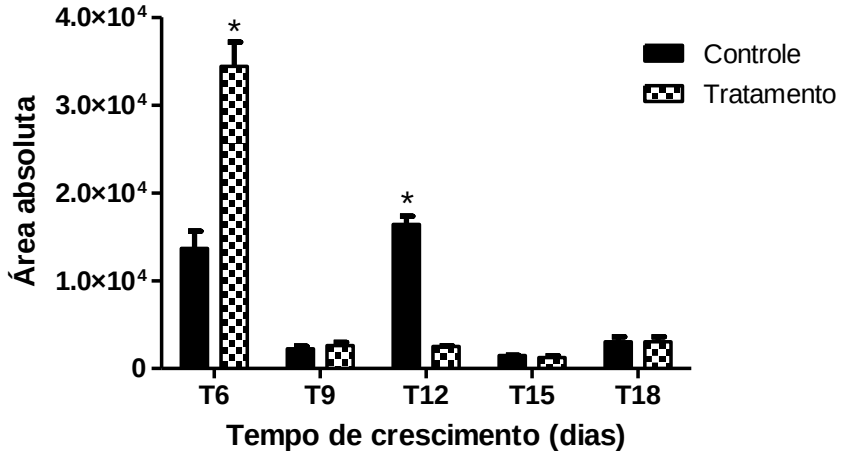
Não foram observadas diferenças estatísticas nos tempos iniciais entre as duas condições estudadas, mesmo com tendência de maior produção do composto β-ciclocitral nos tempos T6 (controle) e T9 (tratamento). Diferenças foram analisadas nos tempos T12 (P<0,001) e T18 (P<0,05) entre as condições Controle e Tratamento (Figura 46).

Figura 46: Comparação entre resposta (área) do composto β- ciclocitral nas condições controle e tratamento durante o tempo de crescimento de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Os asteriscos representam valor de P<0,001 no tempo T12 e P<0,05 no tempo T18.



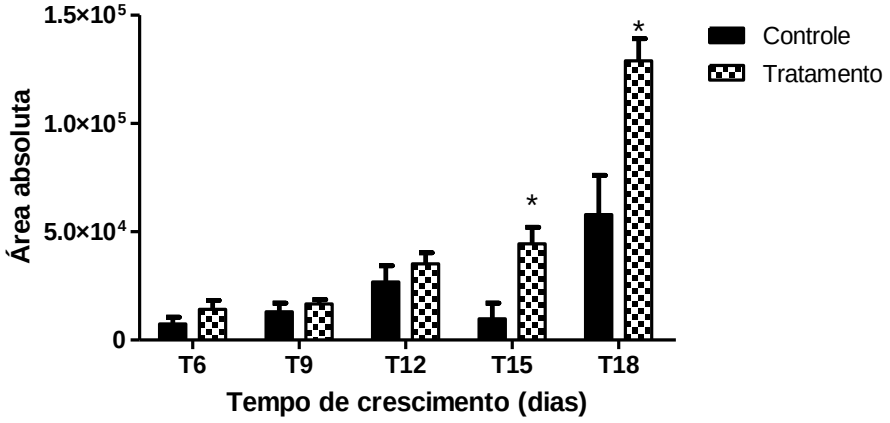
Quando analisados o perfil de β- Ionona, na linhagem de LTPNA 01, nas condições controle e tratamento, nota-se, que valores elevados são obtidos inicialmente nas duas condições, com significativas diferenças estatísticas (P<0,001) entre elas. Entretanto, a produção deste composto, é ainda maior na condição tratamento, provavelmente, devido ao valor produzido pela linhagem, somado ao valor adicionado do composto. Observa-se que a produção de β-Ionona foi homogênea ao longo dos tempos analisados, com exceção do tempo T12, que um brusco aumento em termos de resposta em área na condição tratamento (Figura 47).

Figura 47: Comparação entre resposta (área) do composto β-ionona nas condições controle e tratamento durante o tempo de crescimento de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Os asteriscos representam valor de P<0,001 nos tempos T6 e T12.



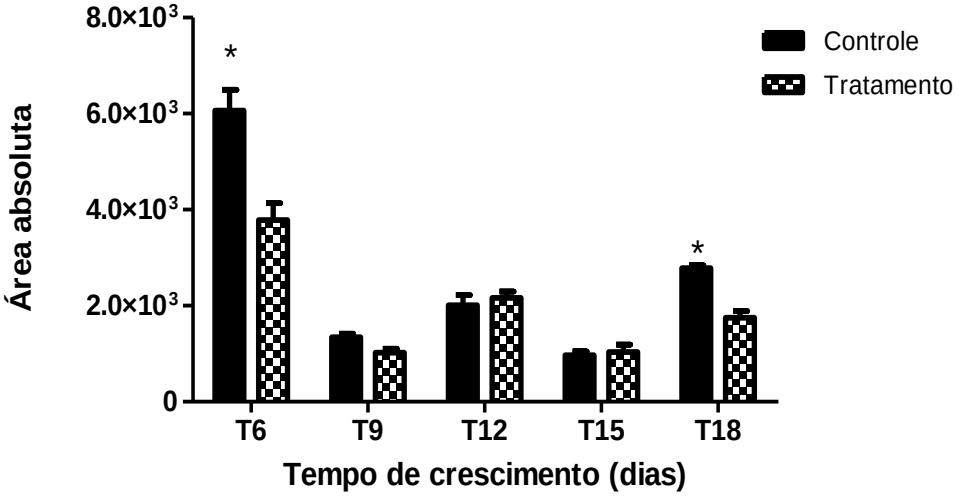
Considerando o perfil de produção do composto β- ciclocitral, na linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, foi possível observar maior produção na condição tratamento em todos os tempos analisados. Não foram visualizadas diferenças estatísticas nos tempos iniciais entre as duas condições avaliadas. No entanto, o composto β- Ciclocitral, apresentou aumento significativo (P<0,001) nos tempos T15 e T18, entre as condições tratamento e controle, com valores maiores na condição tratamento (Figura 48).

Figura 48: Comparação entre resposta (área) do composto β- ciclocitral (A) nas condições controle (C) e tratamento (T) durante o tempo de crescimento de LTPNA 08 (A) e LTPNA 08 (B). Os asteriscos representam valor de P<0,001 nos tempos T15 e tempo T18.



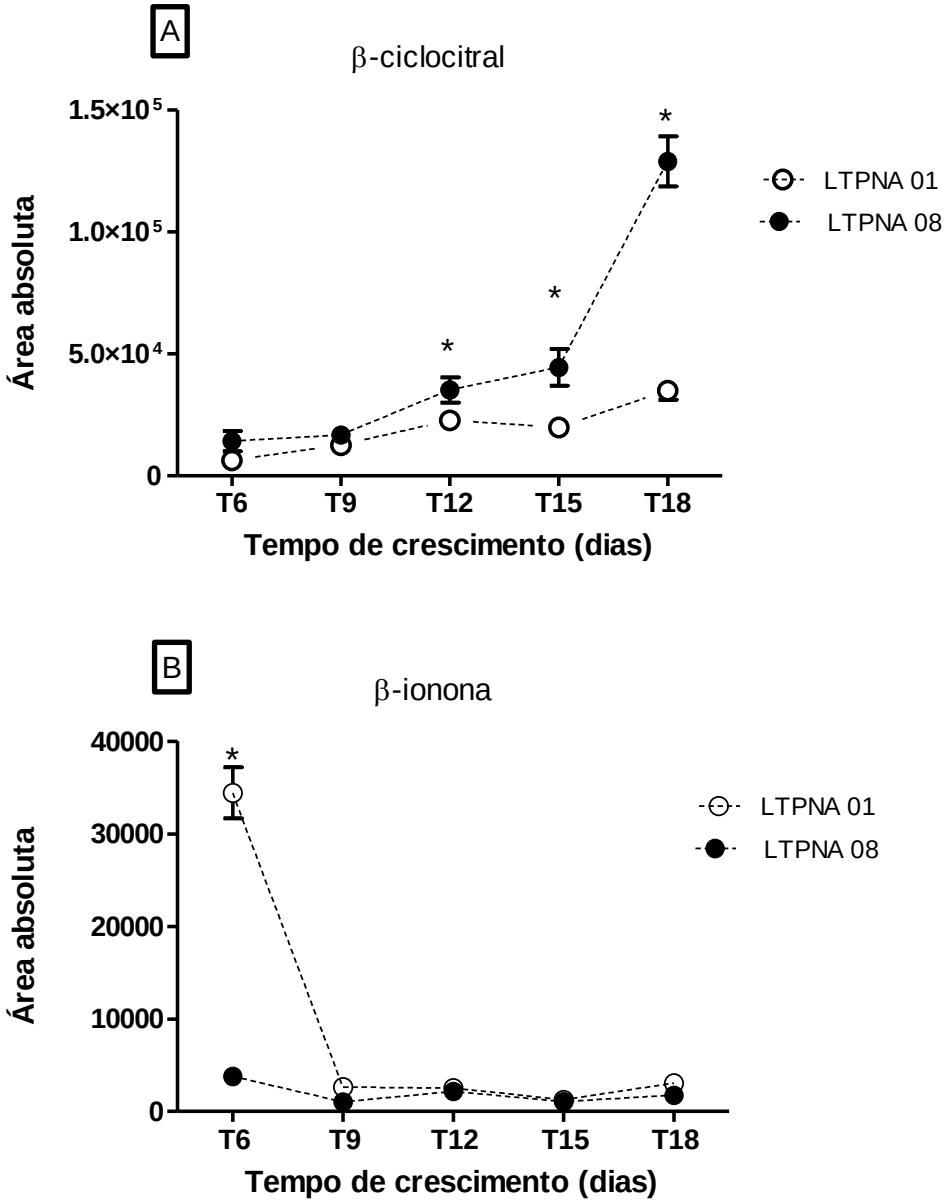
Em todos os tempos analisados, a β- ionona mostrou aumentos e reduções em suas concentrações em amostras pertencentes à *M. aeruginosa* LTPNA 08 nas condições controle e tratamento, com maior tendência de produção na condição controle. Apresentando diferenças significativas nos tempos T6 (P<0,001) e T18(P<0,05) entre as condições Controle e Tratamento (Figura 49).

Figura 49: Comparação entre resposta (área) do composto β-ionona nas condições controle e tratamento durante o tempo de crescimento de LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Os asteriscos representam valor de P<0,001 no tempo T16 e P<0,05 no tempo T18



Comparando-se o perfil de produção dos COVs β- ciclocitral e β- ionona entre as linhagens *M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08, na condição tratamento, foi possível observar que composto β-ciclocitral apresentou maior produção, na linhagem produtora de toxinas (LTPNA 08). Com diferenças estatisticamente significativas nos tempos T12, T15 (P<0,01) e T18 (P<0,001). Já a produção de β- ionona, na condição tratamento, apresentou produção mais elevada na linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01.Com diferença estatisticamente significativa no tempo inicial T6(P<0,001) (Figura 50).

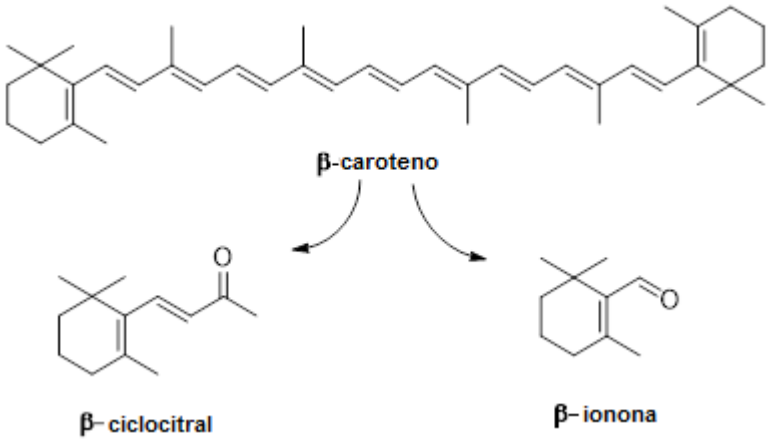
Figura 50: Comparação entre resposta (área) dos compostos **(A)** β-ciclocitral e **(B)** β-ionona nas condições controle e tratamento durante o tempo de crescimento de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Os asteriscos representam valor de P<0,01 nos tempos T12 e T15 e P<0,001 no tempo T18.



A elevada concentração do composto β- ciclocitral nas amostras de LTPNA 01 e 08 no tempo T18 pode ser decorrente da decomposição oxidativa do β- Caroteno. Como mencionado anteriormente, o composto β-ciclocitral e a β-ionona, são produtos da degradação do β- caroteno e são largamente

produzidos por espécies de *Microcystis*, principalmente quando as células desse organismo se encontram em fase de crescimento estacionária (Ozaki *et al*.,2000; Harada *et al*.,2009 e Fujise *et al*.,2010) (Figura 51).

Figura 51: Formação de β-ionona e β-ciclocitral a partir do β-caroteno



Fonte: Wintherhalter, P. *et al*., 2002

A adição de β-ionona, às linhagens de *M. aeruginosa*, pode ter influenciado de forma negativa na biossíntese do β- ciclocitral da linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 01, não produtora de toxinas. Embora tenham sido encontrados intensas concentrações ao longo tempo de crescimento, os valores na LTPNA 01, foram significativamente menores quando comparados com os encontrados na LTPNA 08. Não existe na literatura, relatos que faça correlações entre produções de β- ciclocitral com organismos tóxicos e não toxigênicos.

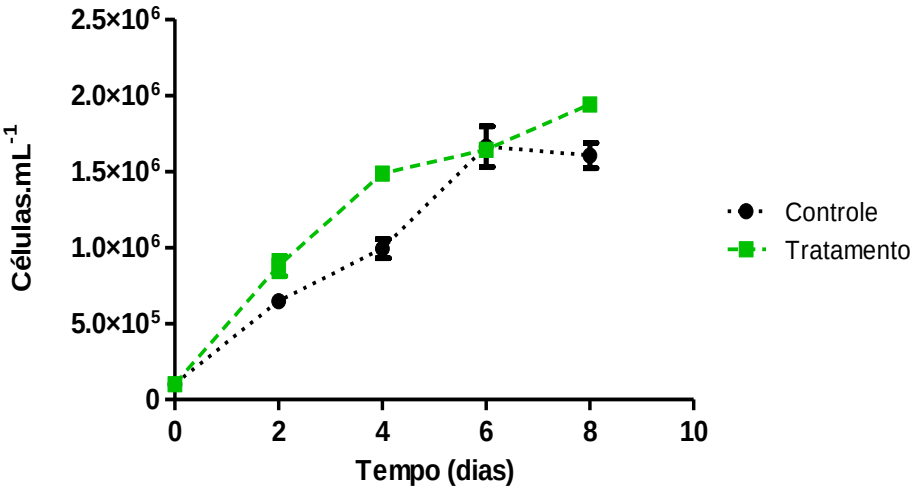
4.8.2- Produção de compostos orgânicos voláteis a partir da interação de duas linhagens (tóxicas e não tóxicas) de *M. aeruginosa*

Para investigar se o contato de duas linhagens (produtora e uma não produtora de toxinas) favorece ou inibe a produção de compostos orgânicos voláteis cultivos de duas linhagens de *M. aeruginosa*, foram realizados em sistemas individuais (frascos de acrílico), que no entanto, possuíam comunicação entre si, de modo que as condições fossem iguais em ambos os sistemas e que uma comunicação química entre as diferentes linhagens fosse estabelecida, através da troca líquida (osmótica) e gasosa entre as culturas sem que houve mistura entre elas.

4.8.2.1- Efeitos de interações de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08 sobre o crescimento

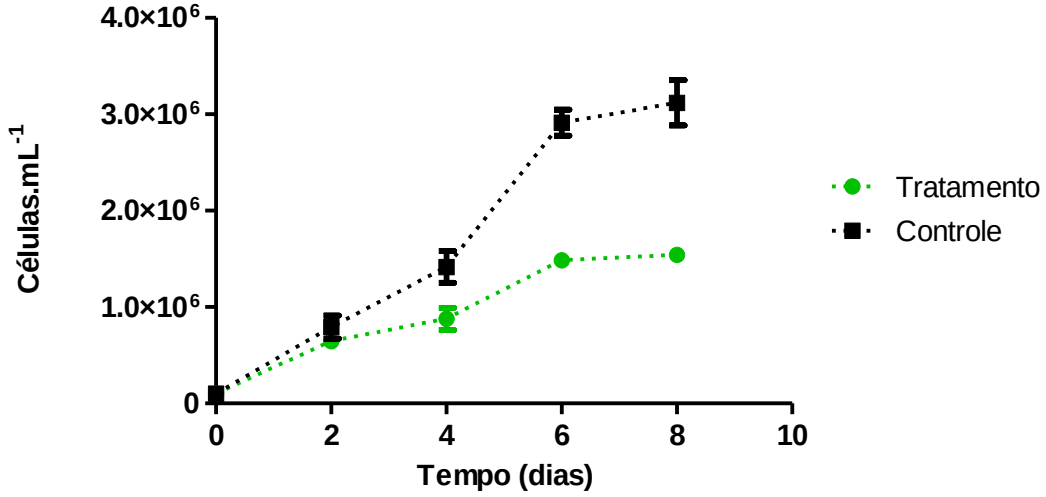
Ao avaliar o crescimento celular da linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 01, após contato com cultivo de *M. aeruginosa* LTPNA 08 por meio de sistema separado por membrana de diálise, foi possível observar que houve um aumento na quantidade de células em praticamente todos os tempos na condição Tratamento (células de LTPNA 01 em crescimento com interação das linhagens com separação de membrana de diálise entre os frascos de cultura) de *M. aeruginosa* LTPNA 01 em relação ao controle desta mesma linhagem. Houve na condição Tratamento, crescimento exponencial até o 8º dia (R^2=0,8326), com taxa de crescimento de 0,378 ± 0,02dia^{-1}. O mesmo ocorreu na condição controle, em que células de *M. aeruginosa* cresceram exponencialmente até o 8º dia de cultivo (R^2= 0,9005) com taxa de crescimento de 0,1902 ± 0, 02dia^{-1}. Apesar do crescimento ter sido exponencial nas duas condições, segundo o Test T realizado, houve diferenças significativas entre os tempos 4 ($P<0,001$) e 8 ($P<0,01$) em relação ao controle de LTPNA 01 (Figura 52).

Figura 52: Curva de crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) obtida a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do (A) Controle: crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 e, B- Tratamento: células de LTPNA 01 em crescimento com interação das linhagens com separação de membrana de diálise entre os frascos de cultura. Os dados são média mais desvio padrão (n=3).



Quanto ao efeito do contato das duas linhagens sobre o crescimento celular da linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 08, foi possível avaliar que, diferentemente do crescimento de LTPNA 01, o crescimento da linhagem LTPNA 08 foi inferior ao valor encontrado na condição controle em todos os tempos, exceto no tempo inicial. Houve na condição controle, crescimento exponencial até o 10º dia (R^2= 0,9392), com taxa de crescimento de 0,2362 ± 0,02.dia^{-1}. O mesmo ocorreu na condição tratamento, em que células de *M. aeruginosa* cresceram exponencialmente até o 10º dia de cultivo (R^2= 0,9047) com taxa de crescimento de 0,1847 ± 0, 02.dia^{-1}. Segundo o Test T realizado, houve diferenças significativas (P<0,001) nos tempos 4, 6 e 8 em relação a condição Controle (Figura 53).

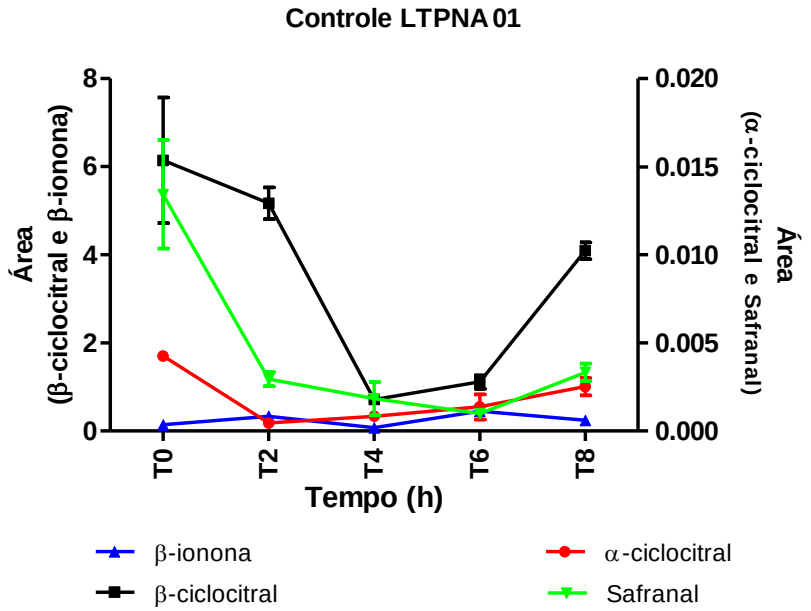
Figura 53: Curva de crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) obtida a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do (A) Controle: crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 e, B- Tratamento: células de LTPNA 01 em crescimento com interação das linhagens com separação de membrana de diálise entre os frascos de cultura. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Test-T: P <0,001 para os tempos 4,6 e 8.

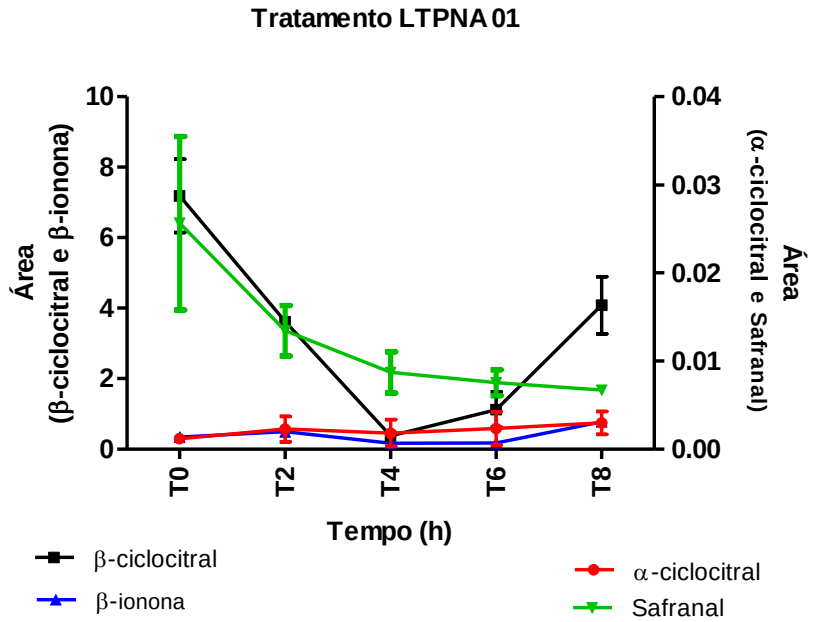


4.8.2.2- Efeito de interações de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e *M. aeruginosa* LTPNA 08 sobre a produção de COVs

Foram identificados quatro compostos observados em todos os tempos de crescimento de LTPNA 01, tanto na condição controle quanto na condição tratamento, com variações em suas concentrações. Os compostos identificados foram o α- ciclocitral, β- ciclocitral e a β- ionona e safranal (Figura 54).

Figura 54: Perfil da produção de COVs a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 8 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do **A-** Controle: crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 e, **B-** Tratamento: células de LTPNA 01 em crescimento com interação das linhagens com separação de membrana de diálise entre os frascos de cultura. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) normalizados com a área do padrão interno.

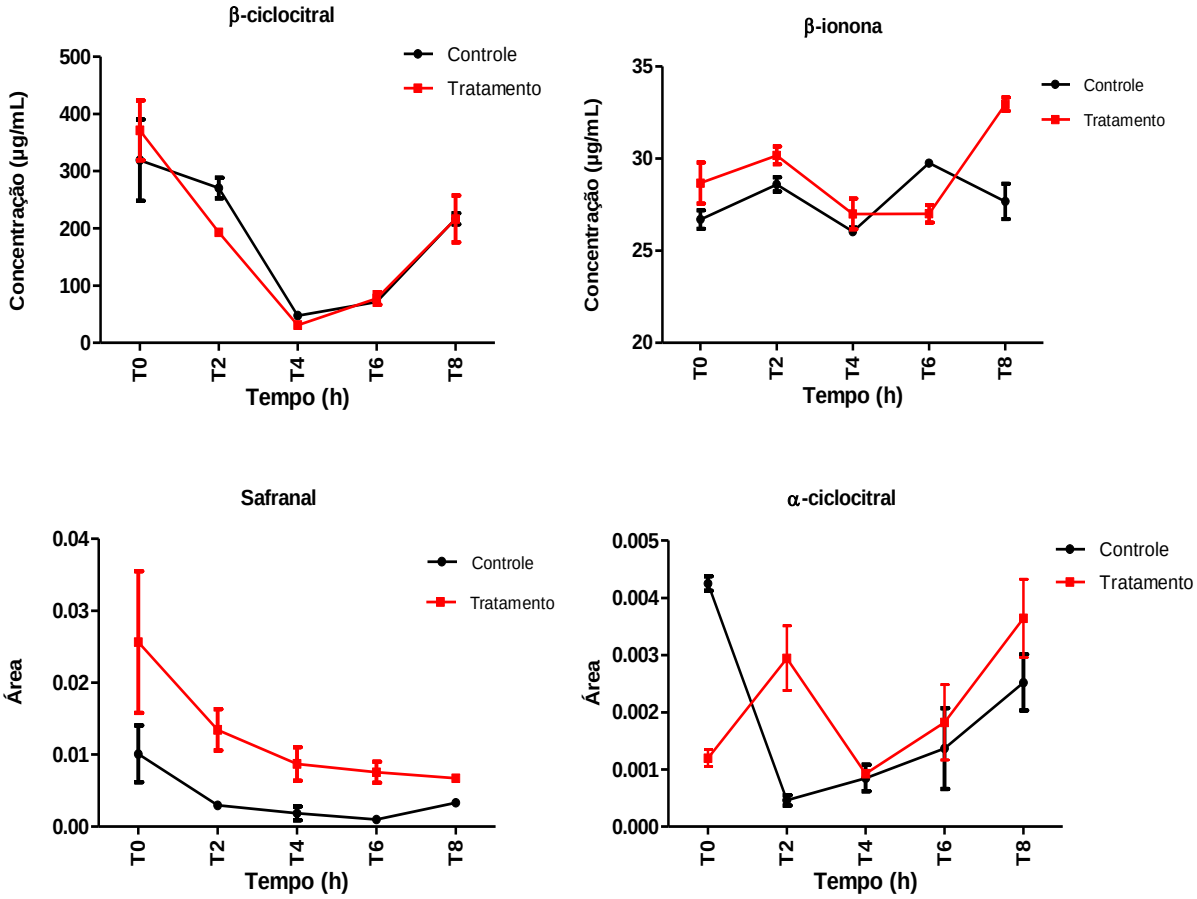




No perfil de produção dos compostos encontrados na LTPNA 01, foi possível observar na condição tratamento, que a produção de β- ciclocitral foi superior a todos os outros compostos encontrados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as condições controle e tratamento, exceto no tempo 2 ($P<0,01$) no qual foi observada uma menor produção de do COV β-ciclocitral em relação ao controle (Figura 55).

As concentrações de β- ionona foram constantes ao logo de quase todo o crescimento, nas duas condições analisadas, apresentando aumento no último tempo de crescimento com diferenças significativas nos tempos 6 e 8 ($P<0,01$) da condição controle (Figura 55).

Figura 55: Gráficos da produção de COVs a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do controle da LTPNA 01 comparados com os dados do tratamento da LTPNA01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) normalizados com a área do padrão interno.

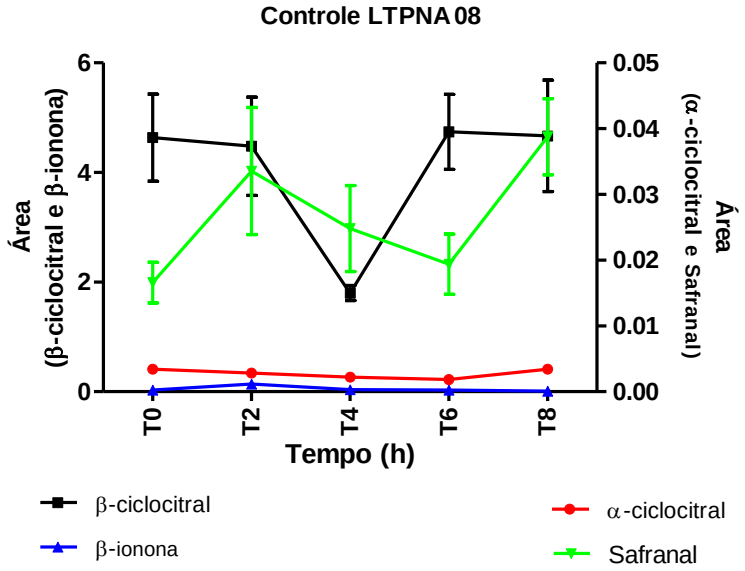


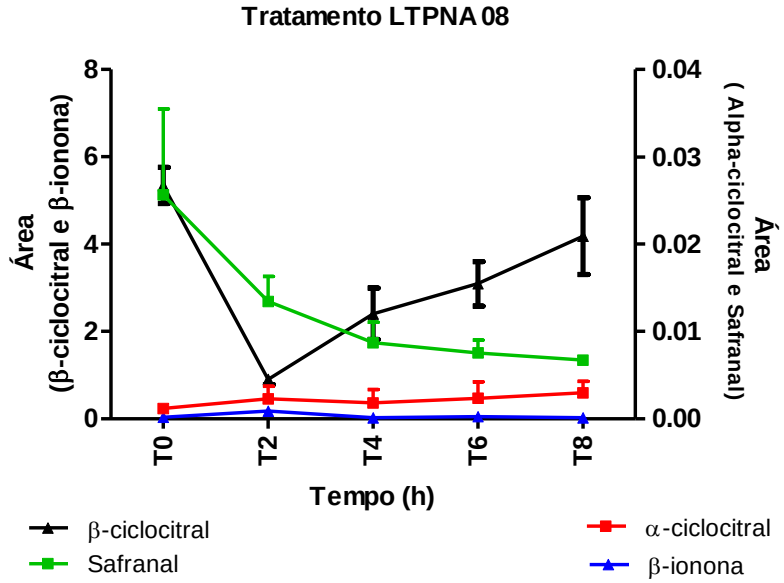
O composto safranal foi observado em baixas concentrações quando comparado com os compostos β- ciclocitral e β- ionona. Porém, as concentrações foram distintas ao longo do tempo de crescimento entre os grupos controle e tratamento, com diferenças significativas em todos os tempos exceto no tempo 8.

Inicialmente, as concentrações encontradas do COV α- ciclocitral na condição tratamento nos tempos 0 e 2, foram opostas as encontradas na condição controle, com diferenças significativas ($P<0,001$) entre eles. Em tempos subsequentes, as concentrações foram praticamente semelhantes nas duas condições.

A produção de COVs pela *M. aeruginosa* LTPNA 08, seguiu o mesmo padrão encontrado na LTPNA 01, nas concentrações dos compostos α-ciclocitral, β- ciclocitral e a β- ionona e safranal (Figura 56).

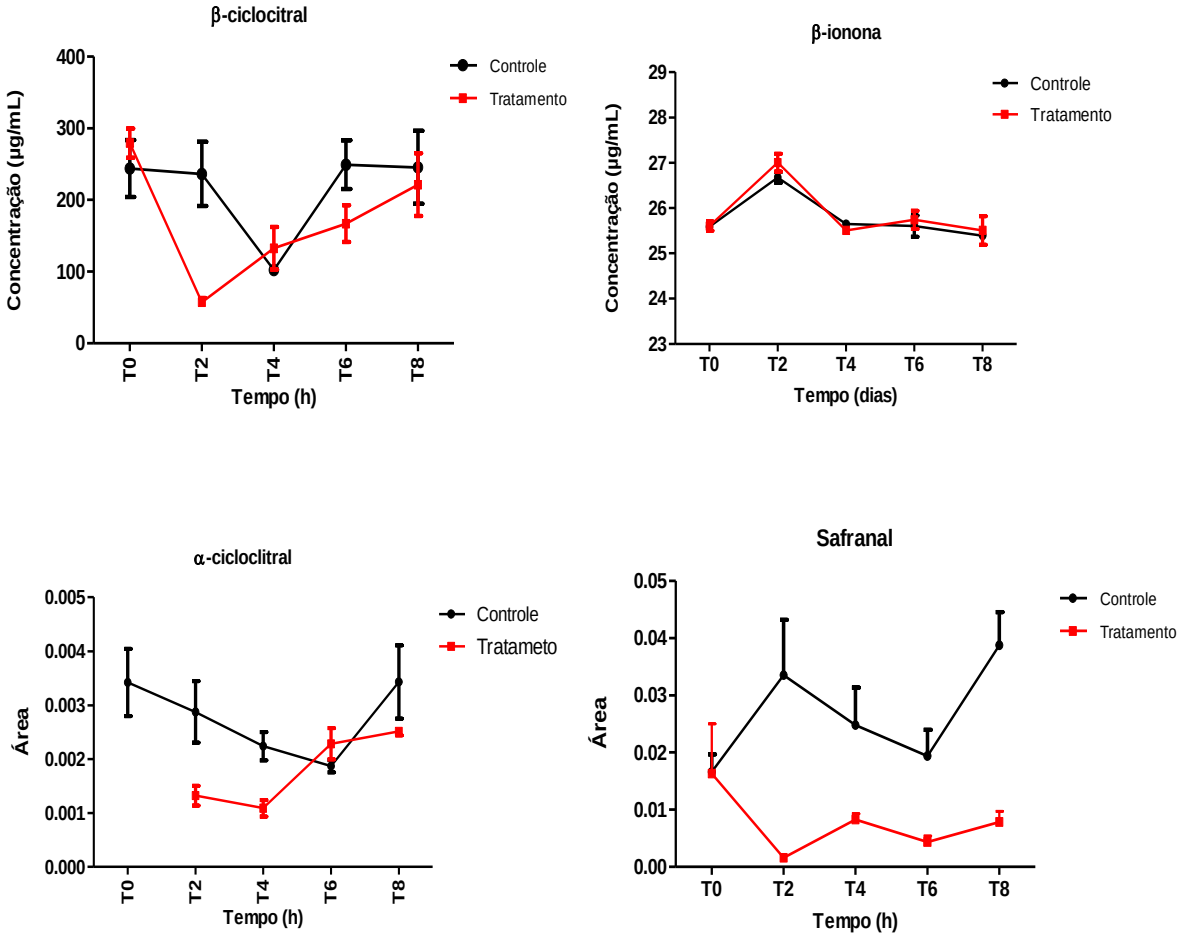
Figura 56: Gráficos da produção de COVs a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do A- Controle: crescimento isolado das células de LTPNA 08 e, B- Tratamento: células de LTPNA 08 em crescimento com interação das linhagens com separação de membrana de diálise entre os frascos de cultura. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) normalizados com a área do padrão interno.





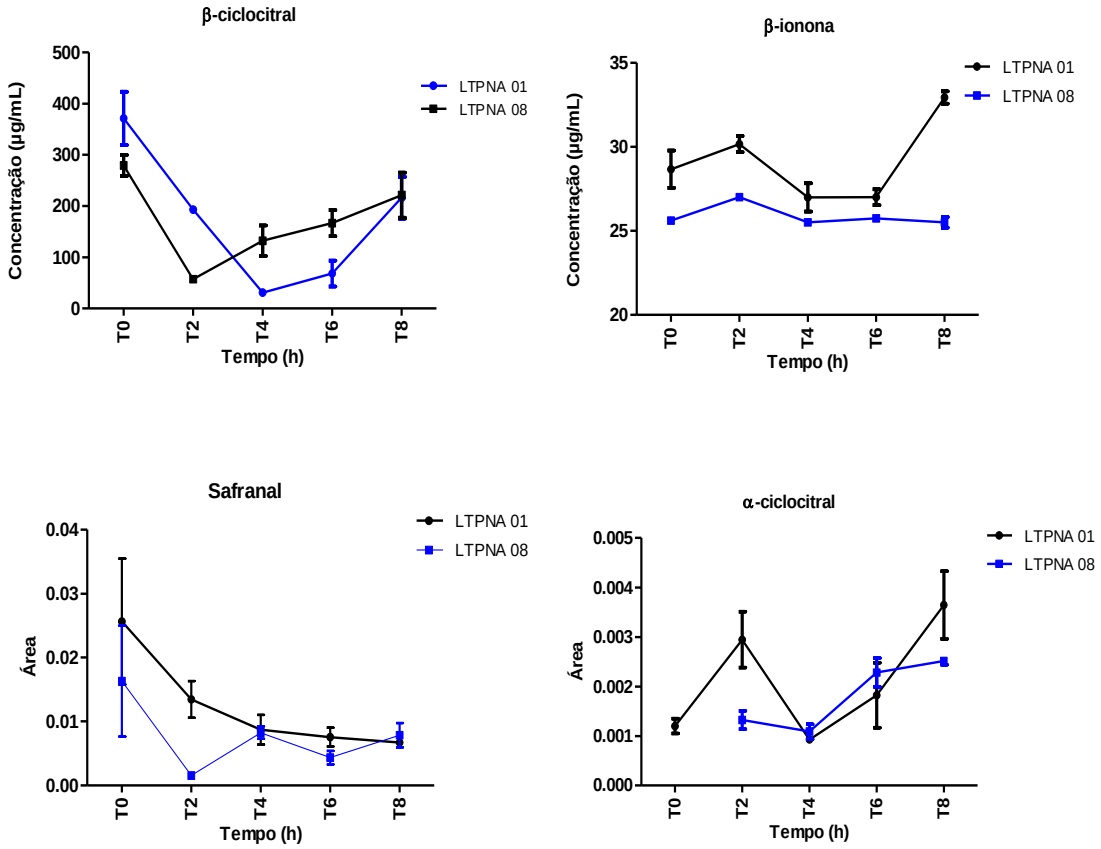
No perfil de produção dos compostos encontrados na LTPNA 08, foi possível observar que a produção de β- ciclocitral foi superior a todos os outros compostos encontrados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as condições controle e tratamento, exceto no tempo 2 no qual a produção foi significativamente menor no tratamento ($P<0,01$) (Figura 57). Já as concentrações de β- ionona aumentam no tempo T2 e depois diminuem no tempo T4 se mantendo constante até final do período estudado (Figura 57).

Figura 57: Gráficos da produção de COVs a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do controle da LTPNA 08 comparados com os dados do tratamento da LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) normalizados com a área do padrão interno.



Ao analisar o perfil de produção de COV das duas linhagens, foi possível observar que, embora a taxa de crescimento de LTPNA 01 tenha sido maior em todos os tempos de crescimento, quando comparado com a LTPNA 08, a produção dos compostos seguiu a mesma tendência de produção em todos tempos e compostos (Figura 58).

Figura 58: Gráficos da produção de COVs a partir da interação das linhagens LTPNA 01 e LTPNA 08 ao longo de 10 dias. Nesta figura estão apresentados os dados do Tratamento da LTPNA 01 comparados com os dados do tratamento da LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) normalizados com a área do padrão interno.



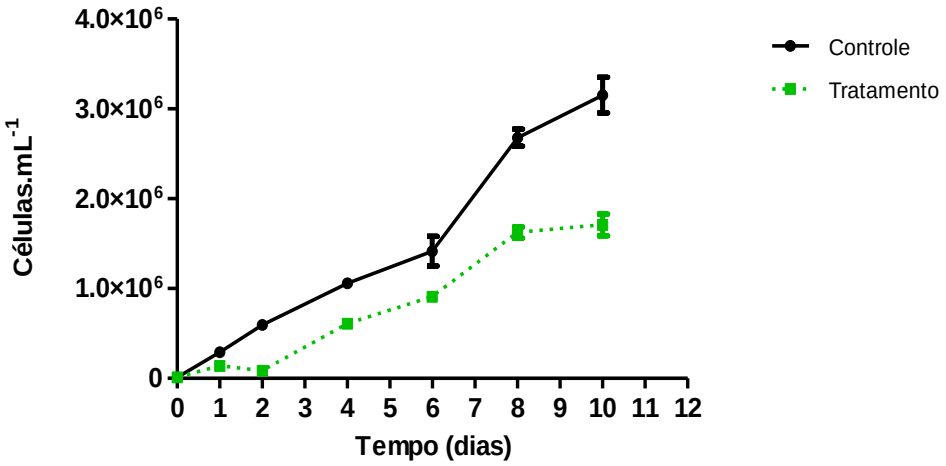
4.8.3. Efeito de exsudatos de *M. aeruginosa* produtora de toxinas em cultivos de *M. aeruginosa* não produtora de toxinas

4.8.3.1- Efeitos de exsudatos sobre o crescimento de *M. aeruginosa*

Na avaliação do crescimento celular da linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 01, após adição de exsudatos de *M. aeruginosa* LTPNA 08, acompanhado inicialmente, a cada 24h por dois dias e depois, a cada dois dias, até o décimo dia de crescimento, foi possível observar que houve morte celular e decréscimo no número de células nos cultivos em que foram adicionados os exsudatos nos primeiros dois dias de crescimento retomando o crescimento após esse período (Figura 59). Verificou-se que houve, no tratamento, crescimento exponencial até o 10º dia (R^2= 0,8363), com taxa de crescimento de 0,3074 ± 0,02.dia^{-1}. Na condição controle, as células de *M. aeruginosa* cresceram exponencialmente até o 10º dia de cultivo (R^2= 0,916) com taxa de crescimento de 0,3289 ± 0, 02.dia^{-1}. Embora o crescimento tenha sido exponencial nas duas condições, segundo o Test T ($P<0,001$) realizado, houve diferenças significativas entre todos os tempos das duas condições, indicando que houve inibição na taxa de crescimento na condição Tratamento em relação a condição Controle (Figura 60).

Figura 59: Crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) ao longo de 10 dias. Controle: crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 e, Tratamento: células de LTPNA 01 com meio ASM-1 e exsudatos de LTPNA 08.

Figura 60: Curva de crescimento de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) ao longo de 10 dias. Controle: crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 e, Tratamento: células de LTPNA 01 com meio ASM-1 e exsudatos de LTPNA 08. Os dados são média mais desvio padrão (n=3).



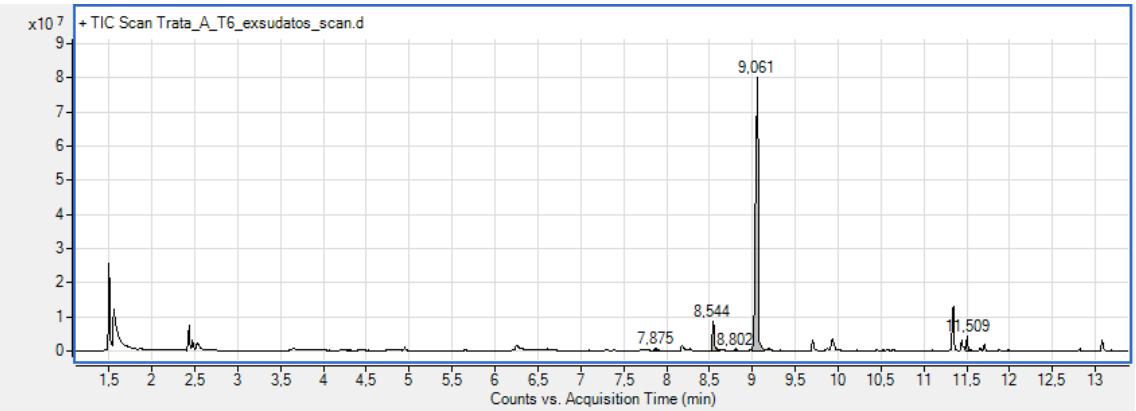
Não há na literatura relatos que evidenciem efeitos de exsudatos de *M. aeruginosa* toxigênicas sobre o crescimento de *M. aeruginosa* não produtora de toxinas. Entretanto, existem relatos de efeitos sofridos por *M. aeruginosa* após exposição a exsudatos de uma monocultura de *C. raciborskii* e exsudatos de culturas mistas de ambas as espécies. Em estudos realizados por Mello, M. et al (2012), ocorreu inibição significativa do crescimento de *M. aeruginosa* apenas quando foi exposta a exsudados de cultura mista com alta proporção de *C. raciborskii*, sugerindo que a produção de inibidores de crescimento parece depender do estresse (competição) e da densidade das espécies produtoras.

Já em estudos realizados por Wang, L. et al. (2017), foi observado que exsudados de *M. aeruginosa* obtidos a partir de diferentes fases de crescimento inibiram significativamente o crescimento de organismos como: *Scenedesmus quadricauda, Chlorella pyrenoidosa e Cyclotella meneghiniana*. Relações semelhantes foram relatadas por Xu, R. et al. (2016), ao comparar o efeito de exsudatos da fase exponencial de crescimento de *M. aeruginosa* com exsudados durante a fase de declínio nas mudas das espécies de macrófitas *Potamogeton crispus*. A biomassa, o teor de clorofila, a proporção de fluorescência variável-máxima (F-v / F-m) e a capacidade de resposta à luz das sementes de *P. crispus* foram significativamente inibidas quando afetadas por exsudados de *M. aeruginos*a da fase de crescimento exponencial, mas promovidos por exsudatos da fase de declínio.

4.8.3.2- Efeito de exsudatos sobre a produção de COVs

No perfil de COVs produzidos ao longo de 10 dias, foram detectados, majoritariamente, quatro compostos: α- ciclocitral, β- ciclocitral e a β- ionona e safranal. Como o perfil de COVs das culturas da condição Controle e Tratamento foi o mesmo durante o período estudado, com diferenças na intensidade dos picos, apenas um cromatograma representativo da condição tratamento está representado na Figura 61.

Figura 61: Cromatograma representativo do perfil de COVs de *M. aeruginosa* (LTPNA 01) observado em estudo ao longo de 10 dias.



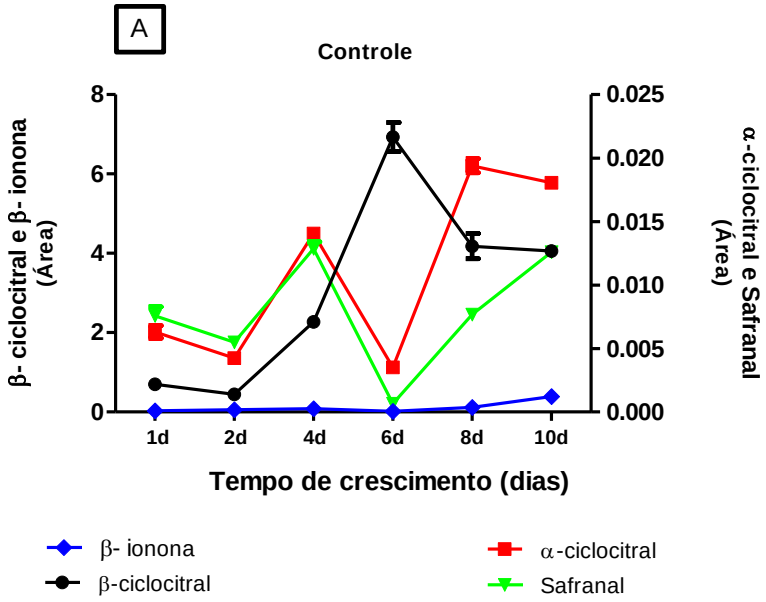
Os compostos identificados foram encontrados entre os tempos de retenção 7,875 a 11,509 e estão apresentados na tabela 4. Na tabela estão apresentados também o tempo de retenção e a *m/z* dos compostos identificados.

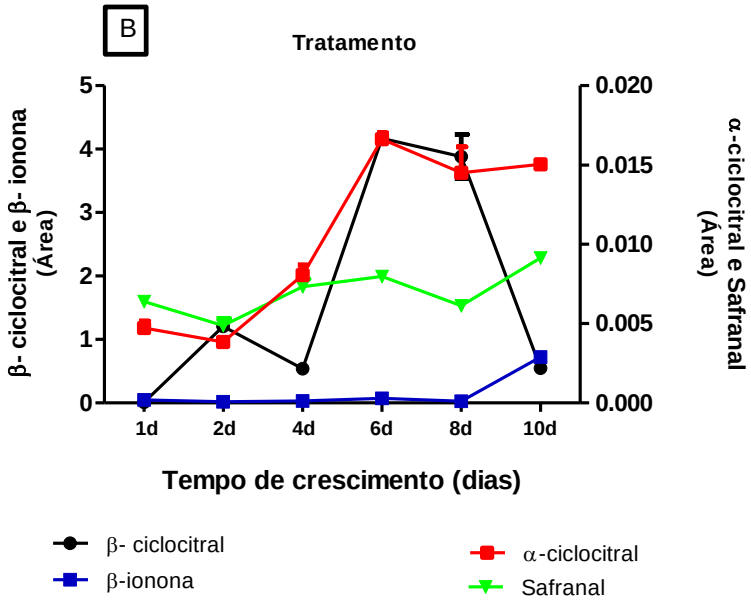
Tabela 4: Dados obtidos por GC/MS de compostos orgânicos voláteis de *M. aeruginosa*

N°	Tempo de retenção (minutos)	m/z	Identificação
1	7,85	91	α-ciclocitral
2	8,808	107	Safranal
3	9,06	137	β-ciclocitral
4	11,509	177	β-ionone

Pela integração dos picos cromatográficos obtidos e utilização das áreas obtidas, pôde-se comparar quantitativamente a produção dos compostos encontrados. A produção destes compostos presentes na linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 01, expostas a exsudatos de *M. aeruginosa* LTPNA 08 e na condição controle, está representada na Figura 62.

Figura 62: Perfil estatístico da produção de compostos orgânicos voláteis após adição de exsudatos ao longo de 10 dias. A- crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 (não toxigênica); B- crescimento com exsudatos obtidos da linhagem toxigênica (LTPNA 08) com meio ASM-1 corrigido e células de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3) das áreas normalizadas obtidas da integração dos picos cromatográficos.

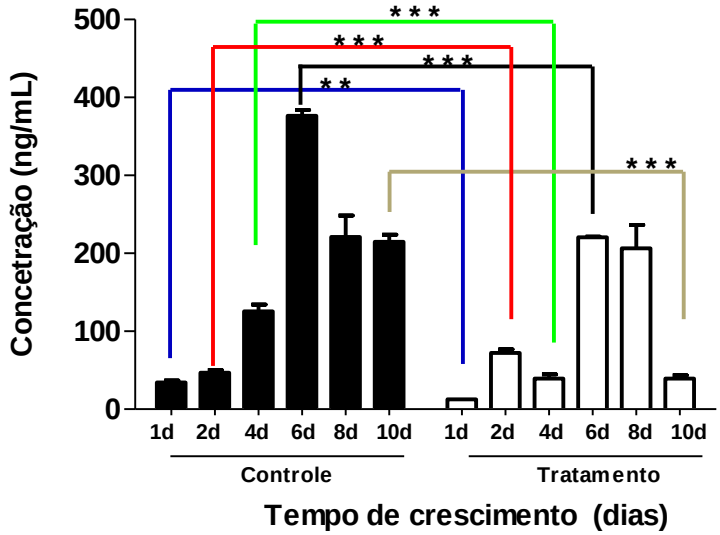




Pela análise dos gráficos, que representam o perfil de COVs de LTPNA 01, pode-se observar que os quatro compostos encontrados foram detectados em todos os tempos de crescimento com diferentes concentrações entre os grupos Controle e Tratamento. Observa-se ainda, que o composto β-ciclocitral apresentou maior produção em todos os tempos nas condições controle e tratamento, com maior produção no tempo 6 (sexto dia após adição de exsudatos) para os dois grupos. A produção dos COVs detectados ao longo do experimento, foram normalizados (área absoluta dos picos integrados / área ido padrão interno) e apenas os compostos β -ciclocitral e β -ionona apresentam curva de calibração (os outros dois não haviam sido detectados antes, impossibilitando aquisição de padrão comercial da substância). Apesar dos compostos safranal e α-ciclocitral não terem sido confirmados através da análise com padrões comerciais dos compostos, a identidade foi obtida pela comparação do espectro de massas com espectros de referência disponíveis na biblioteca NIST 08.

Ao comparar a produção de β-ciclocitral entre as condições controle e tratamento, foi possível observar diferenças significativas, atingindo valores de concentração mais altos em alguns tempos do grupo controle. Após 24horas da adição dos exsudatos, já possível observar diferenças significativas ($P<0,01$) na produção de β-ciclocitral no tempo 1 (Figura 63). Diferentemente ocorreu com o tempo 2, quando notou-se que a produção do composto β-ciclocitral, foi superior na condição tratamento com diferenças significativas entre as condições ($P<0,001$). Neste tempo de crescimento, observou-se morte celular, indicando que a adição de exsudatos, favoreceu a lise das células, liberando uma maior concentração desse composto para o meio (Figura 63). Já no tempo 4, a taxa de produção de β-ciclocitral voltou a ser superior na condição controle, com significativas diferenças ($P<0,001$) entre as condições. Observou-se ainda, que a concentração na condição controle foi menor que a comparada na mesma condição no tempo 2, entretanto, no tempo 4 as células de *M. aeruginosa* já haviam se reestabelecido (figura 60), apresentando um número maior de organismos.

Figura 63: Produção de β-ciclocitral ao longo de 10 dias: A: Controle - crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 (não toxigênica); B:Tratamento-crescimento com exsudatos obtidos de linhagem toxigênica (LTPNA 08) com meio ASM-1 corrigido e células de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Test-T *=P<0,05, ** =P<0,01; *** P<0,001).



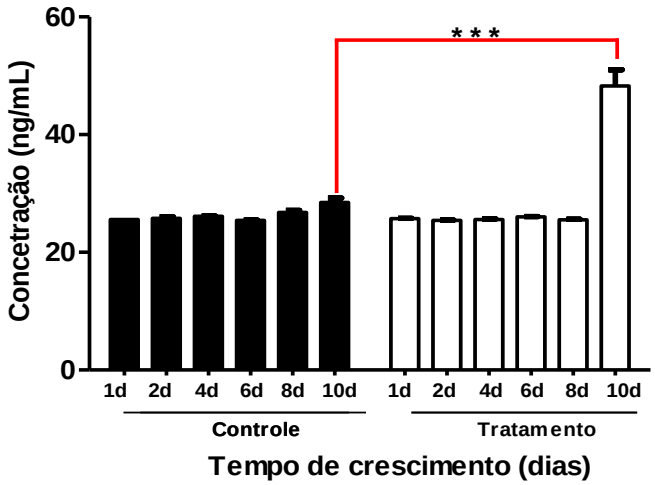
A produção de β-ciclocitral nos tempos 6, 8 e 10 foram superiores na condição controle, com diferenças estatisticamente significativas (P<0,001), para todos, exceto para o tempo 8, que não houve diferenças entre controle e tratamento. Na condição tratamento, a partir do tempo 6, foi possível observar que as taxas de produção de β-ciclocitral (P<0,001), passaram a ser elevadas, se equiparando a taxa de produção das encontradas no controle no tempo 8. Entretanto, os valores sofreram decréscimo no tempo 10, muito embora os organismos estivessem em fase de crescimento exponencial (Figura 63).

O β-ciclocitral é freqüentemente encontrado em águas eutrofizadas, e é o COV dominante de todas as espécies de *Microcystis* (Jüttner et al., 2010; Ozaki et al., 2008). Existem relatos na literatura que o β-ciclocitral derivado de *Microcystis* tem atividade lítica contra a própria *Microcystis*, mas possui uma atividade inibidora mais forte contra outras cianobactérias e algas, sugerindo que os COVs desempenham um papel importante na ecologia dos ambientes

aquáticos. O β-ciclocitral está envolvido na formação de cor azul causada pela lise de cianobactérias em ambientes naturais. Este produto químico foi confirmado como originado por *Microcystis* enquanto exibia atividade lítica contra a própria *Microcystis*, mas não para outras algas. Entre os compostos produzidos por cianobactérias, apenas o β-ciclocitral causa uma mudança de cor característica de verde para azul (formação de cor azul) nas culturas durante o processo de lise (Arii et al. 2015).

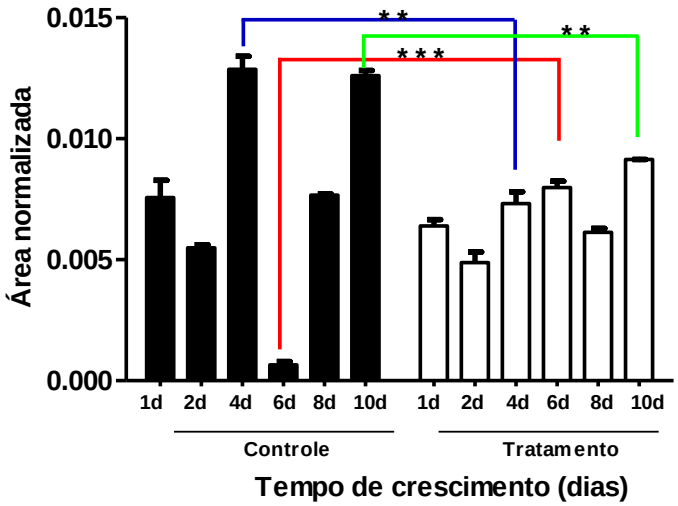
O composto β-ionona foi o segundo composto com maior produção em suas concentrações ao longo do período estudado. Apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa nos tempos iniciais na presença de exsudatos entre as condições controle e tratamento ($P>0,05$), ocorreu aumento de produção de β-ionona no tempo 10 ($P<0,001$), período em que as células encontravam-se no estágio exponencial (Figura 64).

Figura 64: Produção de β-ionona ao longo de 10 dias: Controle - crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 (não toxigênica); Tratamento-crescimento com exsudatos obtidos de linhagem toxigênica (LTPNA 08) com meio ASM-1 corrigido e células de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Test-T *=P<0,05, ** =P<0,01; *** P<0,001).



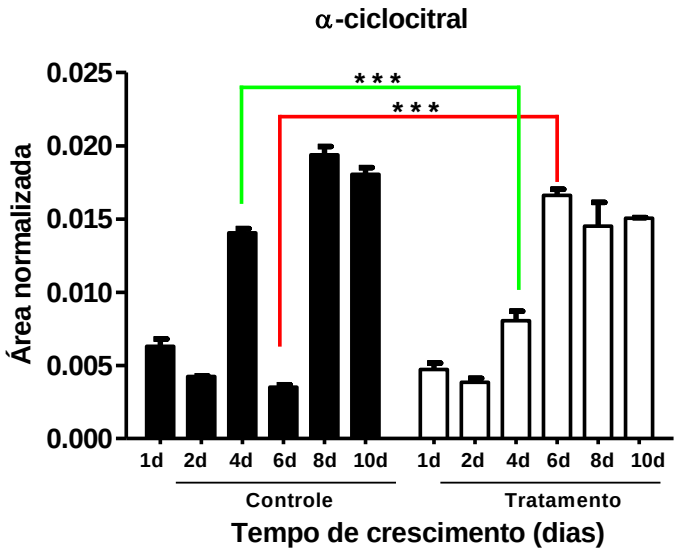
Na avaliação do perfil de produção do Safranal foi observada uma baixa concentração nas condições controle e tratamento, com diferenças significativas nos tempos 4 (P<0,01) e 6 (P<0,001). O composto apresentou uma queda em suas concentrações no tempo 6, na condição controle e uma elevada produção na condição tratamento. Nos períodos subsequentes as produções voltaram a ficar elevadas com diferenças significativas apenas no tempo 10 (P<0,001) (Figura 65).

Figura 65: Produção de Safranal ao longo de 10 dias: Controle - crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 (não toxigênica); Tratamento-crescimento com exsudatos obtidos de linhagem toxigênica (LTPNA 08) com meio ASM-1 corrigido e células de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Test-T *=P<0,05, ** =P<0,01; *** P<0,001).



A variação de produção do composto α-ciclocitral não foi significativa entre os tempos iniciais (1 e 2) quando comparado com a condição controle. Diferenças significativas só foram observadas nos tempos 4 e 6 (P<0,001) (Figura 66).

Figura 66: Produção de α-ciclocitral ao longo de 10 dias: Controle - crescimento convencional com meio ASM-1 e células de LTPNA 01 (não toxigênica); Tratamento-crescimento com exsudatos obtidos de linhagem toxigênica (LTPNA 08) com meio ASM-1 corrigido e células de LTPNA 01. Os dados são média mais desvio padrão (n=3). Test-T *=P<0,05, ** =P<0,01; *** P<0,001).



Foi possível observar, pelos dados apresentados nos gráficos, que a adição de exsudatos de *M. aeruginosa* LTPNA 08, reduziu significativamente as taxas de crescimento de LTPNA 01, fato que pode ter contribuído para que a produção dos COVs também fosse reduzida na condição tratamento nos diferentes tempos de crescimento, sugerindo que os COVs podem realmente agir como produtos químicos alelopáticos, inibindo ou estimulando o crescimento de *M. aeruginosa* LTPNA 01.

5. CONCLUSÕES

- Estabeleceu-se metodologias analíticas adequadas para extrair compostos orgânicos voláteis: geosmina (trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol), MIB (2-methylisoborneol) β-ciclocitral, e β-Ionona produzidos em diferentes tempos de crescimento de *M. aeruginosa*.

- Das espécies de cianobactérias investigadas, as linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e LTPNA 08 (produtora de toxinas) foram comprovadas como sendo produtoras em ampla escala, dos compostos β-ciclocitral e a β-ionona.

- A produção dos compostos β-ciclocitral e β-ionona está relacionada com o tempo de crescimento das células de cianobactérias.

- A elevada concentração do composto β-ciclocitral nas amostras de LTPNA 01 e 08 nos diferentes tempos de crescimento estudados são decorrentes da biossíntese de β-caroteno realizada por *Microcystis*.

- O acréscimo de um composto volátil (β-ionona) às culturas de *M. aeruginosa* LTPNA 01 e 08, pode ter influenciado na produção do composto de β-ciclocitral em diferentes tempos de crescimento.

- A intensidade 250 μmol.fótons.$m^{-2}s^{-1}$ favoreceu o crescimento da linhagem LTPNA 08 (produtora de toxinas) e morte celular linhagem LTPNA 01.

- Houve relação negativa entre o aumento da irradiância e a produção do composto β- ciclocitral pelas células mantidas sob a maior irradiância.

- A produção dos compostos α- ciclocitral, β- ciclocitral e β- ionona, nas linhagens LTPNA 01 (não produtora de toxinas) e LTPNA 08 (produtora de toxinas) variou ao longo de 24 horas, com maior produção no período em que culturas não estavam recebendo luz

- As concentrações do composto β- ciclocitral encontradas nas linhagens LTPNA 01 e 08 foram maiores quando comparadas às concentrações encontradas para os compostos α- ciclocitral e β-ionona ao longo de todas as amostragens.

Houve maior produção dos compostos em dados referentes às amostras da linhagem não toxigênicas (LTPNA 01) que às amostras pertencentes à linhagem produtora de toxinas (LTPNA 08).

A adição de exsudatos favoreceu morte celular e redução na produção de COVs 24 horas após adição de exsudatos pertencentes à linhagem de *M. aeruginosa* toxigênica LTPNA 08.

Sendo assim, pode-se inferir que a produção dos COVs pode sofrer alterações qualitativas e quantitativas dependendo do estímulo ambiental presente, tanto por interações bióticas (com outros organismos e ritmo circadiano), quanto por fatores abióticos (intensidade luminosa).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sperling Mv (2005) Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; UFMG.
2. Sperling EV (1992) DETERMINATION OF THE SETTLING VELOCITY OF PHOSPHORUS IN AN AERATED LAKE. Water Science and Technology 26: 1973-1979.
3. Braga B (2005) Introdução à engenharia ambiental. São Paulo (SP): Pearson Prentice Hall.
4. Mota S (2003) Introducão à engenharia ambiental. [Rio de Janeiro: ABES.
5. Correll DL (1998) The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. Journal of Environmental Quality 27: 261-266.
6. Bianchi TS, Engelhaupt E, Westman P, Andren T, Rolff C, et al. (2000) Cyanobacterial blooms in the Baltic Sea: Natural or human-induced? Limnology and Oceanography 45: 716-726.
7. Esteves FdA (1988) Fundamentos de limnologia. Rio de Janeiro: Interciencia/FINEP.
8. Tundisi JG, Matsumura-Tundisi T (2008) Biodiversity in the Neotropics: ecological, economic and social values. Brazilian Journal of Biology 68: 913-915.
9. Codd GA, Unesco, International Hydrological Programme I-V (2005) CYANONET : a global network for cyanobacterial bloom and toxin risk management : initial situation assessment and recommendations. Paris: International Hydrological Programme of UNESCO.
10. Chorus I, Bartram J (1999) Toxic cyanobacteria in water : a guide to their public health consequences, monitoring, and management. London; New York: E & FN Spon.
11. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Journal of General Microbiology Journal of General Microbiology 111: 1-61.
12. Whitton BA, Potts M (2000) The ecology of cyanobacteria : their diversity in time and space. Dordrecht; Boston: Kluwer Academic.
13. Herrero A, Muro-Pastor AM, Flores E (2001) Nitrogen Control in Cyanobacteria. Journal of Bacteriology Journal of Bacteriology 183: 411-425.
14. Carmichael WW (1997) The Cyanotoxins. Advances in botanical research 27: 211.
15. Calijuri MdC, Alves Dos Santos AC, Adriani Alves MS (2006) Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. Sao Paulo: RiMa.
16. Ferrao-Filho AS, Molica R, Azevedo SMFO (2009) Ecologia, ecofisiologia e toxicologia de cianobactérias. Oecol Bras Oecologia Brasiliensis 13: 225-228.

17. Huszar VLM, Silva LHS, Marinho M, Domingos P, Sant'Anna CL (2000) Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. Hydrobiologia 424: 67-77.
18. Reynolds CS, Cambridge University P (2006) The ecology of phytoplankton. Cambridge: Cambridge University Press.
19. Chorus I (2007) Assessment of the health threat through "water blooms" in toxic cyanobacteria in bathing water. Gesundheitswesen 69: 176-176.
20. Nicholson BC, Steffensen DA, Australian Centre for Water Quality R. Toxic cyanobacteria : current status of research and management : proceedings of an international workshop, Adelaide, Australia, March 22-26 1994 1994; Salisbury, S. Aust. Australian Centre for Water Quality Research.
21. Repka S, Koivula M, Harjunpä V, Rouhiainen L, Sivonen K (2004) Effects of phosphate and light on growth of and bioactive peptide production by the Cyanobacterium anabaena strain 90 and its anabaenopeptilide mutant. Applied and environmental microbiology 70: 4551-4560.
22. Gomes AMA, Azevedo SMFO, de Oliveira ACP (2009) Efeito de diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido e bactérias na degradação de microcistinas (Cianotoxina). Oecol Bras Oecologia Brasiliensis 13: 402-412.
23. Hudnell KH (2008) Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Advances in Experimental Medicine and Biology, Volume 619. Springer.
24. Carmichael WW, Beasley V, Bunner DL, Eloff JN, Falconer I, et al. (1988) NAMING OF CYCLIC HEPTAPEPTIDE TOXINS OF CYANOBACTERIA (BLUE-GREEN-ALGAE). Toxicon 26: 971-973.
25. KUJBIDA PR, Vania ; PINTO, Ernani editor (2008
) Cianobactérias e Microalgas Tóxicas em Ambientes Aquáticos. São Paulo. 225-240 p.
26. Smith JL, Boyer GL, Zimba PV (2008) A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. Aquaculture 280: 5-20.
27. Fujii K, Sivonen K, Nakano T, Harada K-i (2002) Structural elucidation of cyanobacterial peptides encoded by peptide synthetase gene in Anabaena species. Tetrahedron Tetrahedron 58: 6863-6871.
28. Kisand V, Tammert H (2000) Bacterioplankton strategies for leucine and glucose uptake after a cyanobacterial bloom in an eutrophic shallow lake. Soil Biology and Biochemistry Soil Biology and Biochemistry 32: 1965-1972.
29. Ikawa M, Sasner J, Haney J (2001) Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga Chlorella pyrenoidosa growth. Hydrobiologia 443: 19-22.
30. Puddu A, Zoppini A, Fazi S, Rosati M, Amalfitano S, et al. (2003) Bacterial uptake of DOM released from P-limited phytoplankton. Fems Microbiology Ecology 46: 257-268.
31. Cybis LF (2006) Manual para estudo de cianobactérias planctônicas em mananciais de abastecimento público : caso da represa Lomba do

Sabão e lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Porto Alegre (RS): ABES.
32. Liu JF, Tao Y, Sun J, Jiang GB (2011) Development of polypropylene glycol coated hollow fiber membranes as passive sampler for field equilibrium sampling of odorous compounds in environmental waters. Analytical Methods 3: 696-702.
33. Li L, Wan N, Gan NQ, Xia BD, Song LR (2007) Annual dynamics and origins of the odorous compounds in the pilot experimental area of Lake Dianchi, China. Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research 55: 43-50.
34. Carmichael WW (1992) CYANOBACTERIA SECONDARY METABOLITES - THE CYANOTOXINS. Journal of Applied Bacteriology 72: 445-459.
35. Esquenazi E, Coates C, Simmons L, Gonzalez D, Gerwick WH, et al. (2008) Visualizing the spatial distribution of secondary metabolites produced by marine cyanobacteria and sponges via MALDI-TOF imaging. Molecular Biosystems 4: 562-570.
36. Gademann K, Portmann C (2008) Secondary metabolites from cyanobacteria: Complex structures and powerful bioactivities. Current Organic Chemistry 12: 326-341.
37. Young JC, Clesceri LS, Kamhawy SM (2005) Changes in the biochemical oxygen demand procedure in the 21st edition of Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Water Environment Research 77: 404-410.
38. Pabby A, Prasanna R, Nayak S, Singh PK (2003) Physiological characterization of the cultured and freshly isolated endosymbionts from different species of Azolla. Plant Physiology and Biochemistry 41: 73-79.
39. Lauderdale CV, Aldrich HC, Lindner AS (2004) Isolation and characterization of a bacterium capable of removing taste- and odor-causing 2-methylisoborneol from water. Water Research 38: 4135-4142.
40. Suffet IH, Khiari D, Bruchet A (1999) The drinking water taste and odor wheel for the millennium: Beyond geosmin and 2-methylisoborneol. Water Science and Technology 40: 1-13.
41. Juttner F, Watson SB, von Elert E, Koster O (2010) beta-Cyclocitral, a Grazer Defence Signal Unique to the Cyanobacterium Microcystis. Journal of Chemical Ecology 36: 1387-1397.
42. Ozaki K, Ohta A, Iwata C, Horikawa A, Tsuji K, et al. (2008) Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds. Chemosphere 71: 1531-1538.
43. Fujise D, Tsuji K, Fukushima N, Kawai K, Harada Ki (2010) Analytical aspects of cyanobacterial volatile organic compounds for investigation of their production behavior. Journal of Chromatography A 1217: 6122-6125.
44. Harada KI, Ozaki K, Tsuzuki S, Kato H, Hasegawa M, et al. (2009) Blue Color Formation of Cyanobacteria with beta-Cyclocitral. Journal of Chemical Ecology 35: 1295-1301.
45. Izaguirre G, Wolfe, Roy L., Means, Edward G. n.d. (1988) Degradation of 2-Methylisoborneol by Aquatic Bacteria.

46. Yurkowski M, Tabachek J-AL (1980) Geosmin and 2-Methylisoborneol Implicated as a Cause of Muddy Odor and Flavor in Commercial Fish from Cedar Lake, Manitoba. Can J Fish Aquat Sci Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 37: 1449-1450.
47. Rosen AA, Mashini, C.I., Safferman, R.S. (1970) Recent developments in the chemistry of odour in water: The cause od earthy - musty odour. . Water treatment and examination 19.
48. Piet GJ, Zoeteman, B.C.J., Kraayeveld, A.J.A. (1972) Earthy smelling substances in surface waters of the netherlands. . Water treatment and examination 21: 281-286.
49. Yagi M, Kajino M, Matsuo U, Ashitani K, Kita T, et al. (1983) ODOR PROBLEMS IN LAKE BIWA. Water Science and Technology 15: 311-321.
50. Suffet IHM, Corado A, Chou D, McGuire MJ, Butterworth S (1996) AWWA taste and odor survey. Journal American Water Works Association 88: 168-180.
51. Filho F (1996) Otimização da aplicação do carvão ativado em pó no tratamento de água visando a redução de compostos orgânicos causadores de odor em águas de abastecimento. Engenharia Sanitária e Ambiental 1: 131-143.
52. Joe WH, Choi IC, Baek YA, Choi YJ, Park GS, et al. (2007) Advanced treatment for taste and odour control in drinking water: case study of a pilot scale plant in Seoul, Korea. Water Science and Technology 55: 111-116.
53. Huang WJ, Lai CH, Cheng YL (2007) Evaluation of extracellular products and mutagenicity in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. The Science of the total environment 377: 214-223.
54. Gross E (2003) Allelopathy of Aquatic Autotrophs. Konstanz: Bibliothek der Universität Konstanz.
55. LEGRAND CR, K.; GRANÉLI, E.; FISTAROL, G. O. (2003) Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects. International Phycological Society.
56. Braun E, Bachofen R (2004) Homoserine-lactones and microcystin in cyanobacterial assemblages in Swiss lakes. Hydrobiologia 522: 1-3.
57. Kearns KD, Hunter MD (2001) Toxin-producing Anabaena flos-aquae induces settling of Chlamydomonas reinhardtii, a competing motile alga. Microbial Ecology 42: 80-86.
58. Kobaisy M, Tellez MR, Webber CL, Dayan FE, Schrader KK, et al. (2001) Phytotoxic and Fungitoxic Activities of the Essential Oil of Kenaf (Hibiscus cannabinus L.) Leaves and Its Composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 3768-3771.
59. Reigosa M, Sanchez-Moreiras A, Gonzalez L (1999) Ecophysiological Approach in Allelopathy. Critical Reviews in Plant Sciences 18: 577-608.
60. Dionigi CPL, J. E.; McFarland; Johnsen, P.B. (1993) Evaluation of the effects of geosmina and 2-metihylisoborneol on the histidine dependence of TA98 and TA100 Salamonellatyphimurian tester trains. Water Resources 27: 1615-1618.

61. Hockelmann C, Moens T, Juttner F (2004) Odor compounds from cyanobacterial biofilms acting as attractants and repellents for free-living nematodes. Limnology and Oceanography 49: 1809-1819.
62. Mochida K (2009) Evaluation of the Cytotoxicity of Geosmin and 2-Methylisoborneol Using Cultured Human, Monkey, and Dog Cells. Biocontrol Science 14: 35-38.
63. Ho L, Hoefel D, Bock F, Saint CP, Newcombe G (2007) Biodegradation rates of 2-methylisoborneol (MIB) and geosmin through sand filters and in bioreactors. Chemosphere 66: 2210-2218.
64. Watson SB, Brownlee B, Satchwill T, Hargesheimer EE (2000) Quantitative analysis of trace levels of geosmin and MIB in source and drinking water using headspace SPME. Water Research 34: 2818-2828.
65. Gorecki T, Yu XM, Pawliszyn J (1999) Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. Analyst 124: 643-649.
66. Pawliszyn J (1997) Solid phase microextraction: Theory and practice. . New York ; Toronto: J. Wiley.
67. Pastorelli S, Torri L, Rodriguez A, Valzacchi S, Limbo S, et al. (2007) Solid-phase micro-extraction (SPME-GC) and sensors as rapid methods for monitoring lipid oxidation in nuts. Food Additives & Contaminants: Part A 24: 1219-1225.
68. Valente ALP, Augusto F (2000) Microextração por fase sólida. Química Nova 23: 523-530.
69. Eisert R, Pawliszyn J, Barinshteyn G, Chambers D (1998) Design of an automated analysis system for the determination of organic compounds in continuous air stream using solid-phase microextraction. Analytical Communications 35: 187-190.
70. Tundisi JG, Tundisi TM (2008) Limnologia. São Paulo (SP): Oficina de Textos.
71. American Public Health A, Eaton AD, American Water Works A, Water Environment F (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, D.C.: APHA-AWWA-WEF.
72. UTHERMÖHL H (1958) Perfeccionamento del método quantitativo de fitoplancton. Association Internacional de Limnología Teórica y Aplicada. Comité de Métodos Limnológicos 9: 50
73. MARGALEF R (1983) Limnologíon. Omega: Barcelona.
74. MACHA M., FRITZ J. S. (200) Solid-phase trapping of solutes for futher chromatographic or electrophoretic analysis
75. ROS J (1979) Prácticas de ecologia. Omega, Barcelona.
76. Anagnostidis K, Komárek Jí (1988) Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - Oscillatoriales. Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes 50-53: 327-472.
76. GORHAM PRM, J.R.; HAMMER, V.T.; KIM, W.K. (1964) Isolation and culture of toxic strain of Anabaena flos-aquae. . International Association of theorical and applied limnology Proceedings 15: 794-804. .
77. Carneiro RL, dos Santos MEV, Pacheco ABF, Azevedo SMFdOe (2009) Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in Cylindrospermopsis raciborskii

(Cyanobacteria). Journal of Plankton Research Journal of Plankton Research 31: 481-488.

7. ANEXOS

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 7757612/1 - Simone Vieira da Silva

Email:	simone_vieirasds@usp.br
Data de Nascimento:	12/10/1985
Cédula de Identidade:	RG - 000831909 - RO
Local de Nascimento:	Estado do Amazonas
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel e Licenciada em Biologia - Universidade Católica Dom Bosco - Mato Grosso do Sul - Brasil - 2008
Mestrado:	Mestre em Saneamento Ambiental em Recursos Hidricos (1) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Mato Grosso do Sul - Brasil - 2012

Curso:	Doutorado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	04/12/2012
Início da Contagem de Prazo:	04/12/2012
Data Limite para o Depósito:	05/09/2017
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 04/12/2012 até o presente. Email: ernani@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 04/12/2012
Licença(s) Maternidade:	155 dias Período de 04/02/2016 até 07/07/2016
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 08/05/2017 até 05/09/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 27/02/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 04/12/2012 Licença Maternidade em 04/02/2016 Prorrogação em 05/04/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017
Impresso em: 04/09/2017 13:26:14

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 7757612/1 - Simone Vieira da Silva

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5803-3/1	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	04/03/2013	17/03/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5802-3/2	Tópicos Avançados em Toxicologia I	05/03/2013	17/06/2013	15	1	90	A	N	Concluída
FBA5728-3/7	Aprimoramento Didático	19/03/2013	15/04/2013	60	4	87	A	N	Concluída
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0520 Análises Toxicológicas, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2)	01/08/2013	10/12/2013	-	3	-	-	-	-
BIE5705-5/1	Ecologia de Reservatórios (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	05/08/2013	25/11/2013	90	6	80	A	N	Concluída
FBC5784-3/3	Tópicos Avançados em Toxicologia II	06/08/2013	18/11/2013	15	1	90	A	N	Concluída
FBF5805-1/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2013	17/09/2013	45	3	80	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	20
Estágios:			
Total:	10	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 1.077, de 31.08.2012..

2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão Coordenadora de Programa, em Sessão de 04/02/2014.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 04/09/2017 13:26:14

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

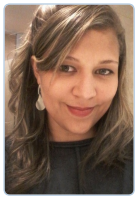
9141 - 7757612/1 - Simone Vieira da Silva

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
453826	Ernani Pinto Junior	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017
Impresso em: 04/09/2017 13:26:14

Currículo Lattes

Imprimir currículo



Simone Vieira da Silva

Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/6107028165710637

Última atualização do currículo em 04/09/2017

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Biologia pela Universidade Católica Dom Bosco (2007), capacitação em Hidrometria pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (2009), mestrado em Tecnologias Ambientais pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (2012). Tem experiência na área de Microbiologia do solo e da Água, Hidrometria, Limnologia, atuando principalmente nos seguintes temas: Ficologia - Cianobactérias e Qualidade da água.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Simone Vieira da Silva

Filiação Nacirzo dos Reis da Silva e Antônia Vieira da Silva

Nascimento 12/10/1985 - Humaitá/AM - Brasil

Carteira de Identidade 831909 SSP - RO - 16/07/2002

CPF 016.738.931-98

Endereço residencial Avenida Nossa Senhora da Assunção - n 647
Vila Butantã - São Paulo
05359001, SP - Brasil
Telefone: 011 966315885

Endereço profissional Universidade de São Paulo
Avenida Professor Lineu Prestes
Butantã - São Paulo
05508000, SP - Brasil
Telefone: 11 966315885

Endereço eletrônico
E-mail para contato : simone_vieirasds@usp.br
E-mail alternativo simonevieirasds@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2012 Doutorado em Ciências Farmacêuticas.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Prospecção de Compostos Orgânicos Voláteis produzidos por cianobactérias e seus efeitos na autorregulação fisiológica de Microcystis sp.

Orientador: Ernani Pinto Junior
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Palavras-chave: metabólitos secundários, Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)

2010 - 2012 Mestrado em Tecnologias Ambientais.
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Brasil
Título: Identificação e Avaliação da Toxicidade de Cianobactérias do Lago do Amor e da Represa de Abastecimento Guariroba (Campo Grande, MS), Ano de obtenção: 2012

Orientador: William Marcos da Silva
Co-orientador: Ronaldo Leal Carneiro
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Palavras-chave: Limnologia, Cianobactérias
Áreas do conhecimento : Botânica,Ecologia,Microbiologia
Setores de atividade : Água, esgoto, atividades de gestão de resíduos e descontaminação, Educação

2004 - 2007 Graduação em Biologia.
Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, Campo Grande, Brasil
Título: Fungos Micorrizicos Arbusculares associados a Campomanesia pubescebs (Guavira)
Orientador: Cesar Heraclides Behling Miranda

Formação complementar

2008 - 2009 Curso de Capacitaçao em Hidrometria. . (Carga horária: 1800h).
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Brasil
Palavras-chave: Limnologia, Hidrometria, Hidrologia

2004 - 2007 Estágio Curricular. . (Carga horária: 2880h).
Embrapa Gado de Corte, CNPGC, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2004 - 2004 Estágio extra-curriculr no Biotério da UCDB. . (Carga horária: 80h).
Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, Campo Grande, Brasil
Palavras-chave: bioterio

Áreas de atuação

1. Microbiologia

2. Ecologia
3. Agronomia
4. Zoologia
5. Botânica
6. Engenharia Sanitária

Producão

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **SILVA, S. V.**; SILVA, W. M.; CARNEIRO, R. L.
Diversidade de cianobactérias no período chuvoso em três ambientes no Estado de Mato Grosso do Sul In: XIII Congresso Nacional de Limnologia, 2011, Natal, RN.
Congresso Nacional de Limnologia CBL Natal 2011. , 2011. v.XIII.

2. **SILVA, S. V.**; CAPRONI, AL; Cesar Heraclides Belhing Miranda; MACEDO, MCM
Propágulos infectivos de Fungos Micorrízicos arbusculares em Integração Lavoura-Pecuária In: Terceira Jornada Cientifica da Embrapa Gado de Corte, 2007, Campo Grande.
Terceira Jornada Cientifica da Embrapa Gado de Corte. , 2007. v.v.III.
Palavras-chave: Glomus macrocarpum, indices de diversidade.
Áreas do conhecimento : Agronomia,Microbiologia,Ecologia
Setores de atividade : Agricultura, Pecuária, Silvicultura, Exploração Florestal

3. **SILVA, S. V.**; CAPRONI, AL; Cesar Heraclides Belhing Miranda; MACEDO, MCM; Adriana Figueira França
Diversidade de espécies de fungos micorrízicos arbusculares e nematóides em sistemas produtivos de integração lavoura e pecuária In: II Encontro Estadual de Biologia de Mato Grosso do Sul- ENEBIO-MS, 2006, 2006, Campo Grande,MS.
II Encontro Estadual de Biologia de Mato Grosso do Sul- ENEBIO-MS, 2006. , 2006. v.v.II.
Palavras-chave: pastagem degradada, Glomus macrocarpum, fixação biológica, micorrizas
Áreas do conhecimento : Agronomia,Ecologia,Zoologia
Setores de atividade : Agricultura, Pecuária, Silvicultura, Exploração Florestal, Outro

4. **SILVA, S. V.**; CAPRONI, AL; Cesar Heraclides Belhing Miranda; MACEDO, MCM
Fungos micorrizicos arbusculares em sistema de integração lavoura e pecuária In: Segunda Jornada Cientifica da Embrapa Gado de Corte, 2006, Campo Grande , MS.
Anais em CDROM.. , 2006. v.v.I.

5. MIRANDA, CHB; MACEDO, MCM; CAPRONI, AL; PALMA, DT; **SILVA, S. V.**; Souza, TSF
Adubação nitrogenada na cultivar de soja BRS133 inoculada com Bradyrhizobium japonicum Comercial In: Encontro Naciolnal de Inovação Científica para o Homem do Século XXI, 2005, Campo Grande-MS.
Encontro Naciolnal de Inovação Científica para o Homem do Século XXI - IV ENPIC. , 2005. v.1.
Palavras-chave: cerrados, ferlizantes, fixação biológica
Áreas do conhecimento : Agronomia,Zootecnia,Recursos Florestais e Engenharia Florestal
Setores de atividade : Agricultura, Pecuária, Silvicultura, Exploração Florestal, Produção Vegetal

6. **SILVA, S. V.**; CAPRONI, AL; MIRANDA, CHB; PALMA, DT; Souza, TSF
Colonização de raízes de gramíneas por fungos micorrízicos arbusculares. In: ENIBIO, 2005, Dourados-MS.
ENEBIO. , 2005. v.1.
Palavras-chave: Esporos, micorrizas
Áreas do conhecimento : Microbiologia,Zoologia,Botânica
Setores de atividade : Agricultura, Pecuária, Silvicultura, Exploração Florestal, Produção Vegetal

7. **SILVA, S. V.**; Souza, TSF; CAPRONI, AL; MIRANDA, CHB
Distribuição de Esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Solo de Cerrado Nativo e sob diferentes sistemas de integração lavoura/pecuária In: 16° encontro de Biólogos do CRBIO-1, 2005, Campo Grande-MS.
16° encontro de Biólogos do CRBIO-1. , 2005. v.1.
Palavras-chave: Esporos, indices de diversidade., micorrizas, pastagem degradada
Áreas do conhecimento : Ecologia,Agronomia,Zootecnia
Setores de atividade : Agricultura, Pecuária, Silvicultura, Exploração Florestal

8. CAPRONI, AL; **SILVA, S. V.**; MIRANDA, CHB
DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLOS SOB SISTEMAS DE PASTAGENS In: 1ªJornada Cientifica, 2005, Campo Grande.
1ªJornada Cientifica. , 2005. v.1.

9. **SILVA, S. V.**; CAPRONI, AL; MIRANDA, CHB; Souza, TSF; PALMA, DT
Fungos micorrízicos arbusculares associados a Guavira (Campomanesia pubescens (DC.) O.Berg) In: Encontro Naciolnal de Inovação Científica para o Homem do Século XXI, 2005, Campo Grande- MS.
Encontro Naciolnal de Inovação Científica para o Homem do Século XXI -IV ENPIC. , 2005. v.1.
Palavras-chave: micorrizas, Esporos, indices de diversidade., pastagem degradada
Áreas do conhecimento : Botânica,Microbiologia,Ecologia
Setores de atividade : Agricultura, Pecuária, Silvicultura, Exploração Florestal, Produção Vegetal

10. Souza, TSF; **SILVA, S. V.**; CAPRONI, AL; MIRANDA, CHB
Fungos micorrízicos arbusculares como bioindicadores de sustentabilidade de solos dos cerrados In: 16° encontro de Biólogos do CRBIO-1, 2005, Campo Grande-MS.
16° encontro de Biólogos do CRBIO-1. , 2005. v.1.
Palavras-chave: indices de diversidade., micorrizas, Esporos
Áreas do conhecimento : Botânica,Ecologia,Agronomia
Setores de atividade : Agricultura, Pecuária, Silvicultura, Exploração Florestal, Produção Vegetal

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. Cesar Heraclides Belhing Miranda; Neide Garcia Cardoso; **SILVA, S. V.**; Ronaldo Araújo Marques; Odevalde de Almeida
Lodo primário de curtume como fonte de nutrientes para Brachiaria brizantha e Panicum maximum In: 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2009, Maringá, PR.
SBZ 2009. , 2009.
Palavras-chave: co-produtos, fertilizantes, meio-ambiente, nutrição de plantas, qualidade de forrageiras
Áreas do conhecimento : Agronomia,Bioquímica,Botânica
Setores de atividade : Agricultura, Pecuária, Silvicultura e Exploração Florestal

2. **SILVA, S. V.**; CAPRONI, AL; Cesar Heraclides Belhing Miranda
Diversidade de espécies de fungos micorrízicos arbusculares sob sistemas de exploração agrícola e pecuária no estado de Mato Grosso do Sul In: XXVII REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS; XI REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS; IX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO; VI REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO., 2006, Bonito, MS.
Dourados: Embrapa Agro Oeste, 2006.. , 2006. v.v.I...

3. Adriana Figueira França; CAPRONI, AL; BERBARA, R. L. L; **SILVA, S. V.**; Cesar Heraclides Belhing Miranda; MACEDO, MCM
Diversidade de nematofauna em um sistema de integração lavoura/pecuária em Campo Grande/MS In: XXVII REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS; XI REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS; IX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO; VI REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2006, BONITO, MS.
FERTIBIO 2006, BONITO. Dourados: Embrapa Agro Oeste, 2006, 2006. v.v.I.
Palavras-chave: nematoides, cerrados

Áreas do conhecimento : Zoologia,Ecologia,Microbiologia
Setores de atividade : Agricultura, Pecuária, Silvicultura, Exploração Florestal

Produção artística/cultural

Artes Cênicas

1. **SILVA, S. V.**; Karen; Melloto; HOTTA, L.
Evento: **O menino e ri**, 2005. Local Evento: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Cidade do evento: Campo Grande, MS. País: Brasil. Instituição promotora: Universidade Catolica Dom Bosco. Duração: 30. Tipo de evento: Outro.

Atividade dos autores: Encenação. Home-page: CRBio-1.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **24º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP (SIICUSP)**, 2016. (Simpósio)
AVALIAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR DUAS LINHAGENS DE CIANOBACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES BRASILEIROS E CULTIVADAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS♂.
2. **Desenvolvimento de métodos em CGMS**, 2013. (Outra)
.
3. **Operação de Software MassHunter - LCMS**, 2013. (Outra)
.
4. **Reunião Anual- Sociedade Brasileira de Química**, 2013. (Outra)
.
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica da SP**, 2013. (Simpósio)
Pré-concentração e Detecção de compostos orgânicos voláteis produzidos por cianobactérias através da microextração em fase sólida (SPME)..
6. **Workshop de capacitação de pesquisadores em métodos estatísticos multivariados**, 2013. (Outra)
.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIV CBL (Congresso Brasileiro de Limnologia)**, 2013. (Congresso)
Análise de compostos orgânicos voláteis produzidos por Microcystis Aeruginosa usando a microextração em fase sólida por headspace combinada com cromatografia gasosa (SPME-CG).
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIV Congresso Brasileiro de Limnologia**, 2013. (Congresso)
Variações no crescimento, formação de heterócitos e produção de pigmentos em uma linhagem de S. torques-reginae (CYANOBACTERIA) em diferentes condições de nitrogênio.
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIV Congresso Brasileiro de Limnologia**, 2013. (Congresso)
Influência da intensidade luminosa sobre o crescimento de uma linhagem de Sphaerospermopsis torques-reginae (CYANOBATERIA) produtora de anatoxina-a (S).
10. Apresentação Oral no(a) **46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2009. (Congresso)
Lodo primário de curtume como fonte de nutrientes para Brachiaria brizantha e Panicum maximum.
11. Apresentação Oral no(a) **3ª Jornada Cientifica da Embrapa Gado de Corte**, 2007. (Outra)
Propágulos de fungos micorrízicos arbusculares em integração lavoura-pecuária.
12. **Curso Básico de Estatistica Experimental com ênfase em Controle de Qualidade**, 2007. (Outra)
.
13. **Mini-curso: Corte de Carnes para Preparo de Churrasco**, 2007. (Outra)
.
14. **Treinamento em Biossegurança**, 2007. (Outra)
.
15. Apresentação Oral no(a) **2ª Jornada Cientifica da Embrapa Gado de Corte**, 2006. (Outra)
Fungos Micorrizicos Arbusculares em Sistema de Integração Lavoura e Pecuária.
16. **II Encontro Estadual de Biologia de Mato Grosso do Sul**, 2006. (Encontro)
.
17. **16° Encontro de Biologos do CRBio-1**, 2005. (Congresso)
.
18. Apresentação Oral no(a) **1ª jornada científica da Embrapa Gado de Corte**, 2005. (Outra)
1ª jornada científica da Embrapa Gado de Corte.
Palavras-chave: Esporos, micorrizas, pastagem degradada
Áreas do conhecimento : Agronomia,Zootecnia,Microbiologia
Setores de atividade : Agricultura, Pecuária, Silvicultura, Exploração Florestal, Produção Vegetal
19. Apresentação Oral no(a) **Distribuição de fungos micorrízicos arbusculares em solos sob sistemas de pastagens.**, 2005. (Outra)
1ª Jornada Cientifica da Embrapa Gardo de Corte.
20. **Estratégias de Sustentabilidade de Rede Aguapé**, 2005. (Seminário)
.
21. **I Seminário de Educaçõa do Curso de Biologia**, 2005. (Seminário)
.
22. **Mini- curso Introdução à Biologia Molecular e Extração de DNA no I ENEBIO-MS, Encontro Estadual de Biologia de Mato Grosso do Sul,**, 2005. (Seminário)
.
23. **Mini-curso: Biologia e Ecologia de Cavernas. I ENEBIO-MS, Encontro Estadual de Biologia de Mato Grosso do Sul.**, 2005. (Encontro)
.
24. **Projeto de Estruturação**, 2005. (Seminário)
.
25. **II Seminário de Pesquisas do curso de Biologia**, 2004. (Seminário)
.
26. **Mini- curso: "Biologia Molecular Aplicada ai Diagnostico de Leucemias" " Seminários Avançados em Biologia Molecular**, 2004. (Seminário)
.

Organização de evento

1. **SILVA, S. V.**; PICOLO, L.; SOTORIVA, L.D; HOTTA, L.
Funciomamento do CRAS e COmbate ao Tráfico de Animais Silvestres, 2006. (Outro, Organização de evento)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos	13
Apresentações de trabalhos (Congresso)	2
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	1
Apresentações de trabalhos (Outra)	4

Eventos

Participações em eventos (congresso)	5
Participações em eventos (seminário)	6
Participações em eventos (simpósio)	2
Participações em eventos (encontro)	2
Participações em eventos (outra)	11
Organização de evento (outro)	1

Produção artística/cultural

Artes Cênicas(Teatral)	1

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 04/09/2017 às 13:36:36.