

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**JOSÉ ROBERTO MARQUES SILVA**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO IMAZAMOX NO  
CONTROLE DE MICROCYSTIS AERUGINOSA E NA  
PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS**

BAURU  
2011

**JOSÉ ROBERTO MARQUES SILVA**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO IMAZAMOX NO  
CONTROLE DE MICROCYSTIS AERUGINOSA E NA  
PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Química, sob a orientação do Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini, e a co-orientação da Prof. Dr. Marcia Aparecida Zeferino Garcia.

BAURU  
2011

S5864a	<p data-bbox="548 1320 883 1350">Silva, José Roberto Marques</p> <p data-bbox="548 1381 1279 1499">Avaliação da eficiência do imazamox no controle de microcystis aureginosa e na produção de microcistinas / José Roberto Marques Silva -- 2011. 42f.: il.</p> <p data-bbox="548 1533 1279 1619">Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini Co-orientadora: Profa. Dra. Marcia Aparecida Zeferino Garcia</p> <p data-bbox="548 1652 1279 1713">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="548 1747 1279 1829">1. Cianobacterias. 2. Toxina. 3. Microcistina. I. Velini, Edivaldo Domingues. II. Garcia, Marcia Aparecida Zeferino. III. Título.</p>
--------	---

**JOSÉ ROBERTO MARQUES SILVA**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO IMAZAMOX NO CONTROLE DE  
MICROCYSTIS AERUGINOSA E NA PRODUÇÃO DE  
MICROCISTINAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Química, sob a orientação da Prof. Dr<sup>a</sup>. Márcia Aparecida Zeferino Garcia

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Aparecida Zeferino Garcia  
Universidade Sagrado Coração

---

Prof<sup>a</sup>. Ms. Setsuko Sato  
Universidade Sagrado Coração

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Cerino Coutinho  
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 15 de Dezembro 2011

Dedico este trabalho,

à minha família, pelo apoio e,  
incentivo

à minha noiva Fernanda pela,  
paciência e compreensão,

e a Deus que sempre me iluminou  
durante mais uma jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, que sempre me iluminou, me deu muita energia pra vencer todas as etapas vivenciadas durante essa jornada e estar sempre ao meu lado

Agradeço a minha família, por tudo que fizeram por mim, pela base obtida através deles, foi de fundamental importância para seguir adiante nesta carreira universitária.

A minha querida noiva Fernanda, pela paciência, apoio, amor, carinho e compreensão, que teve nos momentos difíceis de nossas vidas em que passamos, mas que sempre acreditou, para que possamos ter um futuro melhor na constituição de nossa família.

Agradeço também ao meu chefe Prof. Dr. Edivaldo Vellini, pelo incentivo, credibilidade depositada na minha formação.

A todos os professores pelos conhecimentos passados para nos durante o curso, aonde sem eles não chegaríamos a lugar nenhum.

E a todos meus amigos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

"Uma pessoa inteligente resolve um problema, um sábio o previne."

(Albert Einstein)

## RESUMO

Em muitos lagos eutrofizados, cianobactérias formam florações com alta toxicidade em função da produção de toxinas. Os problemas mais importantes relacionados a cianobactérias devem-se a florações com produção de microcistina, um peptídeo cíclico que pode apresentar diferentes configurações. O gene que codifica a produção de microcistina está restrito a cianobactérias e os principais gêneros a portá-lo são *Anabaena*, *Microcystis* e *Planktonthrix*. A expressão do gene e, conseqüentemente, a acumulação do seu produto que é a microcistina, é variável em diferentes gêneros, espécies e linhagens de cianobactérias, além de ser altamente influenciado pelo ambiente. Desse modo, a presença de organismos com potencial produção de toxinas não é suficiente para garantir que a toxina está presente na água. O problema se torna ainda mais complexo quando se considera que há um total de 64 diferentes tipos de microcistinas já identificados, sendo possível que alguma nova configuração ainda venha a ser descoberta. Com isso esse estudo visou desenvolver procedimentos de laboratório para a quantificação de cianobactérias, e também avaliar o potencial do uso de herbicidas inibidores da Aceto-Lactato-Sintase no controle da produção dos aminoácidos necessários à produção de microcistina e, conseqüentemente, da própria toxina, e através dos resultados obtidos nos experimentos realizados no laboratório da Unesp em Botucatu-SP, mostrou que o imazamox inibiu o acúmulo de leucina e isoleucina, mas não reduziu o acúmulo na produção da toxina.

**Palavras-chave:** Cianobacterias. Toxina. Microcistina.

## ABSTRACT

In many eutrophic lakes, cyanobacteria form blooms with high toxicity due to the production of toxins. The most important problems related to cyanobacteria blooms are due to the production of microcystin, a cyclic peptide that can have different settings. The gene encoding the microcystin production of cyanobacteria is restricted to the major genres and the part it is *Anabaena*, *Microcystis* and *Planktonthrix*. The gene expression and, consequently, the accumulation of its product that is the microcystin, is variable in different genera, species and strains of cyanobacteria, besides being highly influenced by the environment. Thus, the presence of organisms with the potential to produce toxins is not sufficient to ensure that the toxin is present in the water. The problem becomes even more complex when one considers that there are a total of 64 different microcystins have been identified, it is possible that some new configuration will yet be discovered. Therefore this study aimed to develop laboratory procedures for the quantification of cyanobacteria, and also evaluate the potential use of herbicides inhibitors Aceto-lactate synthase in controlling the production of amino acids necessary for the production of microcystin and, consequently, the toxin itself, and by the results obtained in experiments in the laboratory of UNESP in Botucatu-SP, showed that imazamox inhibited the accumulation of leucine and isoleucine, but did not reduce the accumulation of toxin production.

**Keywords:** Cyanobacteria. Toxin. Microcystin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Lago eutrofizado.....	<b>10</b>
<b>Figura 2</b> – Estrutura de hepatotoxinas produzidas por cianobactérias. A nodularina é um peptídeo com cinco aminoácidos no qual a L-arginina pode ser substituída por uma homoarginina (nodularina-Har) ou por uma valina (motuporina). A microcistina é um heptapeptídeo cíclico com dois aminoácidos variáveis (X e Y, na figura). A isoforma mais comum é a microcistina LR com leucina e arginina nas duas posições, respectivamente .....	<b>14</b>
<b>Figura 3</b> – Fórmula estrutural do imazamox.....	<b>16</b>
<b>Figura 4</b> – Rota de síntese de aminoácidos aromáticos.....	<b>17</b>
<b>Figura 5</b> – Ensaio preliminar de crescimento de <i>Microcystis aeruginosa</i> sob o efeito de diferentes concentrações de Imazamox.....	<b>24</b>
<b>Figura 6</b> – Cromatograma de clorofila, obtido na concentração 50µg/L.....	<b>26</b>
<b>Figura 7</b> – Cromatograma de microcistina, obtido na concentração 250µg/L.....	<b>28</b>
<b>Figura 8</b> – Cromatograma de Leucina e Isoleucina, obtido na concentração 31,25µg/L.....	<b>28</b>
<b>Figura 9</b> – Cromatograma de imazamox, obtido na concentração de 31,25µg/L.....	<b>28</b>
<b>Figura 10</b> – Concentrações finais de imazamox em função das concentrações iniciais do herbicida.....	<b>30</b>
<b>Figura 11</b> – Concentrações finais de imazamox (expressas em porcentagem das concentrações iniciais) em função das concentrações iniciais do herbicida.....	<b>30</b>

<b>Figura 12</b> – Teores de clorofila alfa nas amostras em função das concentrações iniciais do herbicida. Coletas realizadas aos 28 dias após o início do estudo.....	<b>31</b>
<b>Figura 13</b> – Relação entre teores de clorofila alfa e de microcistina LR nas amostras.....	<b>32</b>
<b>Figura 14</b> – Concentrações do complexo leucina+isoleucina nas amostras, em função das concentrações iniciais de imazamox.....	<b>33</b>
<b>Figura 15</b> – Concentrações do complexo leucina+isoleucina nas amostras, em função das concentrações iniciais de imazamox. Dados padronizados pelos teores de clorofila alfa.....	<b>34</b>
<b>Figura 16</b> – Concentrações de microcistina LR nas amostras, em função das concentrações iniciais de imazamox.....	<b>35</b>
<b>Figura 17</b> – Concentrações de microcistina LR nas amostras, em função das concentrações iniciais de imazamox. Dados padronizados pelos teores de clorofila alfa.....	<b>35</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1 CIANOBACTÉRIAS E SUA OCORRÊNCIA.....	11
1.2 CARACTERÍSTICAS DAS MICROCISTINAS.....	13
1.3 AÇÃO DE HERBICIDAS INIBIDORES DA ACETO LACTATO SINTASE (ALS) - IMAZAMOX.....	16
1.4 PROCEDIMENTOS PARA DETECTAR E QUANTIFICAR CIANOBACTÉRIAS E SUAS TOXINAS.....	18
1.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	19
1.6 COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS.....	19
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 MATERIAIS.....	22
3.2 MÉTODOS.....	22
3.2.1 ESTUDOS PRELIMINARES.....	22
3.2.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE IMAZAMOX SOBRE O CRESCIMENTO DE MICROCYSTIS AERUGINOSA EM MEIO DE CULTIVO.....	23
3.2.3 OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA ALPHA.....	23
3.3 OBTENÇÃO E CULTIVO DOS MICRORGANISMOS E CONCENTRAÇÕES DE IMAZAMOX UTILIZADAS.....	25
3.3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA ALFA PARA ESTIMATIVA DE CRESCIMENTO.....	25
3.3.2 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA MICROCISTINAS LR, RR, YR E LA, DOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA LEUCINA, ISOLEUCINA E VALINA PRESENTES NAS AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO DO IMAZAMOX NO FINAL DO EXPERIMENTO.....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Este estudo foi desenvolvido considerando a importância dos problemas com eutrofização de coleções superficiais de água no Brasil. As principais causas da eutrofização como mostra na figura 1, são as atividades agrícolas e o lançamento de esgotos residenciais e industriais em rios e reservatórios. A melhora das práticas agrícolas tem reduzido os impactos destas atividades sobre os ecossistemas aquáticos, mas ainda há um longo caminho até que a agricultura possa ser considerada isenta de efeitos sobre estes ambientes.



Figura 1: Lago eutrofizado  
Fonte: Ernesto Augustus (2011)

Em termos de lançamento de esgotos, a grande maioria dos municípios vem buscando a implantação de sistemas primários e secundários de tratamento, mas os custos do tratamento terciário têm se mostrado proibitivos nos dias atuais. O tratamento primário e secundário reduz substancialmente os problemas associados ao lançamento de esgotos, mas não os eliminam. Especificamente quanto à cianobactérias, grandes quantidades de nutrientes (em sua forma livre após os tratamentos primário e secundário) continuarão disponíveis para serem absorvidas e suportarem o crescimento destes organismos.

Nos dias atuais, o monitoramento da presença de cianobactérias e microcistinas na água revela-se fundamental para garantir a segurança das populações que a consomem. Estas toxinas também têm amplos efeitos ambientais, podendo promover a intoxicação e morte de peixes, aves e vários outros tipos de organismos. As microcistinas são consideradas extremamente tóxicas, mas os seus efeitos genotóxicos ainda não foram adequadamente caracterizados, sendo possível

que estas toxinas também estejam associadas a danos do DNA e à ocorrência de mutações, que podem, por sua vez, promover doenças como o câncer, tanto em humanos como em animais domésticos e silvestres.

### 1.1 CIANOBACTÉRIAS E SUA OCORRÊNCIA.

As cianofíceas, popularmente designadas como algas azuis, por apresentar cor verde-azulada quando vivas e examinadas ao microscópio, ou mais apropriadamente chamadas de cianobactérias, visto que são desprovidas de núcleo e estruturas definidas, constituem um grupo importante de organismos procariontes. Fazem parte integrante da comunidade de algas, produtoras de matéria orgânica, encontradas nos mais diferentes tipos de ambientes aquáticos continentais e marinhos, terrestres, salobras podendo ser registrada a sua presença em locais com condições extremas como neve, deserto e fontes termais.

Segundo Souza (2006), a grande maioria das espécies de cianofíceas/cianobactérias (cerca de 2400 espécies) é de água doce, fazendo parte da comunidade planctônica, presente na coluna de água, como também da comunidade perifítica, aderida a substratos, na maior parte das vezes na região litorânea. Sua distribuição na escala espacial não se limita apenas ao eixo vertical, mas engloba também a dimensão horizontal. A ocorrência das cianobactérias varia na escala temporal; em lagos de zonas temperadas, predominam no verão.

Morfologicamente, podem ser considerados como organismos microscópicos, mas, às vezes, formam massas macroscópicas aderidas ao substrato (por ex. plantas aquáticas superiores; troncos de árvore “paliteiros” em represas) ou, flutuantes na superfície da água. O talo das cianobactérias pode ser unicelular, colonial ou filamentosa, com ou sem ramificações e externamente podem ser envolvidas por envelope mucilaginoso (cianobactérias coccoides) ou bainha mucilaginosa (as demais) (AZEVEDO; SANT’ANA, 2006). Algumas espécies apresentam no interior de seu protoplasma aerótopos (vesículas gasosas), que lhes permitem “flutuar” na água quando as condições ambientais são apropriadas (ausência de turbulência na água, durante os períodos de “calmaria”).

As cianobactérias apresentam-se geralmente pouco numerosas em ambientes oligotróficos – pouco produtivos. A sua importância (ecológica e humana) aumenta muito nos ecossistemas eutrofizados. Estes são sistemas caracterizados como ambientes bastante produtivos. As causas determinantes da eutrofização incluem fatores externos e internos aos próprios sistemas. Nos primeiros, deve ser incluída, sobretudo a descarga excessiva de esgotos e de despejos agrícolas (adubos) que determina um enriquecimento nutritivo das águas dos lagos, rios e represas (TUNDISI, 2003; HENRY et al., 2004). Outras fontes – fontes não pontuais ou difusas – têm também participação na adição de nutrientes aos ecossistemas aquáticos, mas em taxas reduzidas. A longo prazo, a adição de nutrientes à água, mesmo em cargas reduzidas, pode causar eutrofização no sistema, como observado no Lago das Garças, São Paulo, que recebeu descargas provenientes de Jardim Zoológico desde a sua instalação. (BICUDO et al., 2002).

Entre os fatores internos que podem acelerar a eutrofização das águas dos lagos e reservatórios, incluem-se os fluxos de nutrientes do sedimento/água (MOZETTO et al., 2001) e por excreção e translocação de seus organismos residentes, como zooplâncton (PINTO-COELHO; GRECO, 1999), peixes (PERSON, 1997; SCHAUS et al., 1997) e invertebrados bentônicos (COVICH et al., 1999; VANNI, 2002). Essas transferências de nutrientes do sedimento para água de fundo dos lagos e reservatórios e por processos ativos da biota constituem o que se denomina de cargas internas dos sistemas. A importância de quironomídeos nas cargas internas de um pequeno reservatório da cidade de São Paulo foi descrita recentemente (HENRY; SANTOS, [20--?]) e, a remoção mecânica de macrófitas flutuantes no mesmo reservatório, teve como consequência uma aceleração do processo de eutrofização, com a anoxia no fundo e liberação de fosfato (BICUDO et al., 2006). Esta medida aparentemente salutar na restauração do sistema, resultou numa mudança do estado trófico do sistema, de uma condição eutrófica para uma situação de hipereutrofia.

A introdução maciça de nutrientes para a água propicia o desenvolvimento de florações (“blooms”) de cianobactérias em lagos, açudes e represas. As florações ocorrem quando as densidades populacionais, geralmente limitadas a poucas espécies, estão extremamente elevadas. Segundo Souza (2006), a floração é

caracterizada quando a concentração de células é  $\geq 20000$  células.mL<sup>-1</sup>, ou apresenta um biovolume  $\geq 2\text{mm}^3$ .L<sup>-1</sup>, ou ainda quando o teor de clorofila-a (pigmento fotossintético) é superior a 10mg.m<sup>-3</sup>.

Quando esta situação é atingida, as cianobactérias podem causar danos à saúde pública, conferindo gosto e odor desagradáveis à água e até a produção de toxinas. Segundo Souza (2006), os gêneros *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Pseudoanabaena*, *Anabaena* e *Aphanizomenon* causam um gosto /odor de capim, terra, bolor e pesticida. Segundo Carvalho (2006), as toxinas liberadas pelas cianobactérias, quando de sua senescência ou por ação de algicidas, pertencem a três classes químicas distintas e por sua ação farmacológica são caracterizadas como hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas. Entre as primeiras (hepatotoxinas), devem ser incluídas as microcistinas liberadas por espécies de *Microcystis* como *Microcystis aeruginosa*, como também por outras espécies de *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Synechocystis*, *Aphanocapsa* e *Oscillatoria*; as nodularinas (provenientes das espécies de *Nodularia*, em especial *Nodularia spumigena*) e a cilindropermopsina (originadas da *Cylindropermopsis raciborskii*, *Umezakia natans* e de *Aphanizomenon ovalisporum*). Em relação às neurotoxinas, são produzidas pelas espécies de *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Cylindropermopsis* e *Trichodesmium*. Finalmente, entre as dermatotoxinas, inserem-se as cianotoxinas liberadas pelos gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Anacystis*.

## 1.2 CARACTERÍSTICAS DAS MICROCISTINAS

As microcistinas são um grupo de hepatotoxinas heptapeptídicas (com sete aminoácidos) produzidos por vários gêneros de cianobactérias, com destaque para o gênero *Microcystis* e, mais especificamente, para a espécie *Microcystis aeruginosa*. Park et al. (2001) cita a existência de 64 tipos de microcistinas; segundo Sigma / Aldrich (2006) já foram identificadas mais de 75 variantes desta toxina, havendo o predomínio das microcistinas identificadas como LR, RR, LA e YR. A variabilidade das microcistinas resulta da presença de diferentes aminoácidos em duas posições (X e Y) sendo que a forma predominante é a microcistina-LR com os aminoácidos

leucina e arginina nas duas posições, respectivamente (MOFFIT et al., 2004). A nomenclatura segue o padrão de uma letra para a designação dos aminoácidos. Por exemplo, a microcistina-RR é a que tem arginina nas duas posições variáveis. Na posição X predomina a presença de Leucina (L), Arginina (R) ou tirosina (Y) mas Alanina (A), Homotyrosina (Hty), Fenilalanina (F), Homofenilalanina (Hph), Sulfóxido de Metionina (M(O)) e Triptofano (W) também são encontrados nesta posição (Luukkainen et al., 1993). Ainda segundo os autores, na segunda posição variável predominam a Arginina (R) e Alanina (A), mas o ácido amino-isobutírico (Aba), a Homoarginina (Har) e o sulfóxido de Metionina também podem ser encontrados, como mostra na figura 2.

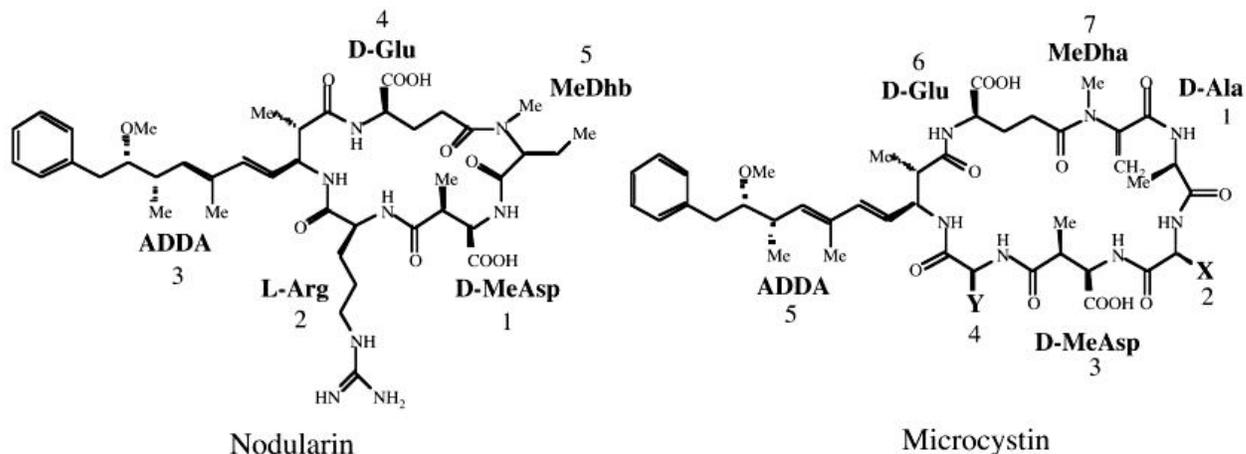


Figura 2: Estrutura de hepatotoxinas produzidas por cianobactérias. A nodularina é um peptídeo com cinco aminoácidos no qual a L-arginina pode ser substituída por uma homoarginina (nodularina-Har) ou por uma valina (motuporina). A microcistina é um heptapeptídeo cíclico com dois aminoácidos variáveis (X e Y, na figura). A isoforma mais comum é a microcistina LR com leucina e arginina nas duas posições, respectivamente.

Fonte: MOFFIT et al. (2004).

A variação do potencial tóxico de diferentes linhagens de *Microcystis* pode estar associada a variações na produção total e nas proporções entre os diferentes tipos de toxinas. Características do ambiente também podem afetar a produção e as proporções entre as concentrações das microcistinas em cianobactérias, conforme observado nos trabalhos de Sivonen (1990), Luukkainen et al. (1993), Rantala et al. (2004) e Kurmayer et al. (2005). Como as variantes da toxina podem apresentar ações complementares em termos de toxicidade e genotoxicidade, é relevante

conhecer os efeitos das isolados das diferentes formas da toxina, mas é fundamental avaliar os efeitos das diferentes variantes de modo combinado.

Até o momento são escassas as informações sobre o potencial toxicogenético de microcistinas. São exemplos os trabalhos de Mankiewicz et al. (2002), Li et al. (2004), Zhan et al. (2004), Bouaicha et al. (2005). A análise conjunta dos trabalhos indica que as microcistinas têm importante potencial toxicogenético tanto para organismos procariontes quanto eucariontes. Destaca-se que Mankiewicz et al. (2002) observaram maior potencial toxicogenético para extratos de cianobactérias do que para as toxinas, indicando a ação conjunta com outros compostos não identificados (provavelmente outras formas da toxina). As observações são de grande relevância tanto em termos de segurança para o consumo de humanos e de animais domésticos quanto em termos de efeitos ambientais, pois a desestabilização do material genético pode implicar na ocorrência tanto de doenças quanto de mutações com importantes efeitos no equilíbrio entre populações em coleções de águas superficiais.

Quanto à toxicidade das microcistinas, há um grande número de informações disponíveis destacando-se os trabalhos de Carmichael (1992), Carmichael (1994), Fischer et al. (2000), Gupta et al. (2003), Hooser et al. (1989), Kaya (1996), Lei e Song (2005), Lovell et al. (1989), Nishiwaki-Matsushima (1991), Råbergh et al. (1991), Shirai et al. (1991), Solter et al. (1998), Tencalla et al. (1997), Yoshida et al. (1997). A ação das microcistinas está relacionada à inibição da fosfatase que, por sua vez, é fundamental para produção de filamentos de actina e para a integridade do citoesqueleto celular. A alta afinidade com fosfatases tem permitido o uso de ensaios bioquímicos que permitem avaliar a atividade desta enzima como uma importante ferramenta para detectar a presença de microcistinas em amostras de água. Os resultados obtidos nos diferentes trabalhos são variáveis em função da espécie indicadora e da metodologia utilizada, mas em geral, as microcistinas apresentam elevada toxicidade (com a LD50 podendo chegar a apenas 15-20ug/kg), colocando-as entre as substâncias mais tóxicas já identificadas. As microcistinas são milhares de vezes mais tóxicas do que praticamente todos os agrotóxicos comerciais no Brasil.

Isto mostra que em ambientes eutrofizados, é necessário não somente um monitoramento biológico quantitativo (expresso em termos de concentração de células, biovolume ou conteúdo de clorofila-a) como também se revela importante conhecer a composição qualitativa da comunidade de cianobactérias, para identificar o seu grau de toxicidade potencial.

### 1.3 AÇÃO DE HERBICIDAS INIBIDORES DA ACETO LACTATO SINTASE (ALS) - IMAZAMOX

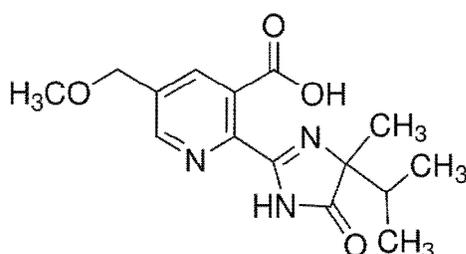


Figura 3: Fórmula estrutural do Imazamox  
Fonte: Sigma-Aldrich

Os herbicidas atuam sobre sistemas enzimáticos ou proteínas específicas das plantas alterando sua funcionalidade. O imazamox tem como seu sítio de ação a Aceto lactato sintase. Informações completas sobre este mecanismo de ação e sobre os herbicidas que nele atuam são descritos por vários autores, destacando-se Mousdale e Coggins (1991), Hess (1993), Hess (1997b) e Hess e Bridges (2002).

A enzima Aceto-lactato-sintase (ALS) é sítio de ação de sulfonil-uréias, imidazolinonas e outros grupos de herbicidas, atua na rota de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, como amostrado na figura 4.

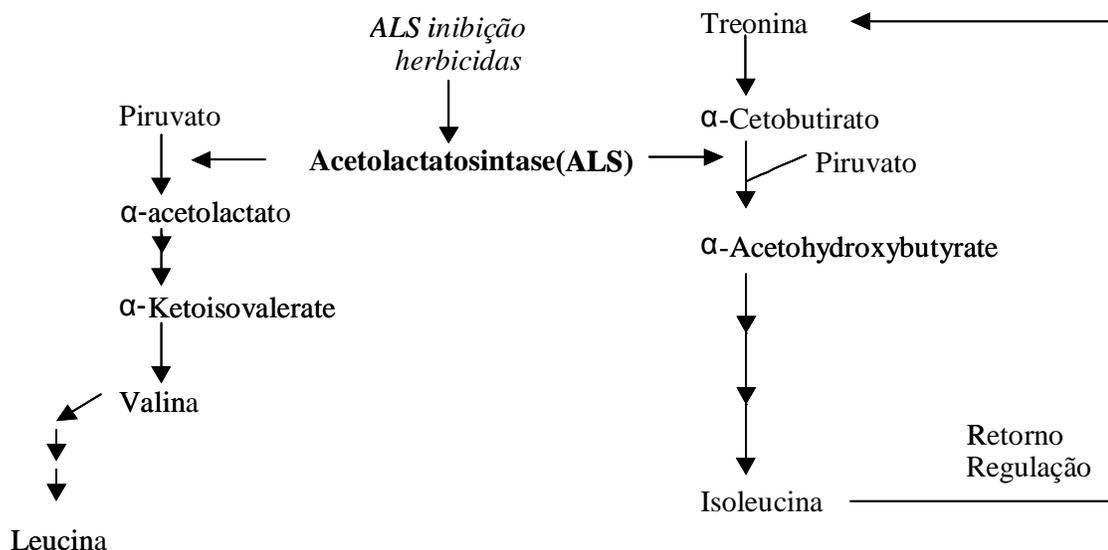


Figura 4 – Rota de síntese de aminoácidos aromáticos.  
 Fonte: Mousdale e Coggins (1991 apud HESS, 1993, p.x)

Segundo os autores citados, a ALS caracteriza-se pela grande variabilidade, sendo possível o desenvolvimento de herbicidas com capacidade de diferenciar e selecionar entre as plantas com elevado grau de similaridade (por exemplo, controle de plantas daninhas dicotiledôneas em culturas dicotiledôneas ou plantas daninhas gramíneas em culturas gramíneas). A grande diversidade do sistema enzimático, associada ao amplo uso, dos herbicidas que nele atuam, fez com que este mecanismo de ação se tornasse o responsável pelo maior número de ocorrências de espécies de plantas daninhas com resistência a herbicidas.

A enzima ALS, é amplamente estudada, tendo sido seqüenciada a partir de várias espécies vegetais suscetíveis ou resistentes a herbicidas que nela atuam. As seqüências de nucleotídeos que conferem resistência, inicialmente presentes em baixas freqüências em populações de plantas daninhas que desenvolveram resistência, são as mesmas encontradas em genótipos de plantas cultivadas igualmente tolerantes aos herbicidas.

Hess (1997b) cita que as causas mais frequentes de resistência a herbicidas inibidores da ALS são a substituição da prolina por serina, arginina, leucina, isoleucina, alanina, histidina, glutamina ou treonina.

#### 1.4 PROCEDIMENTOS PARA DETECTAR E QUANTIFICAR CIANOBACTÉRIAS E SUAS TOXINAS

Há uma variedade de métodos utilizados para a identificação e quantificação de cianobactérias, suas toxinas ou transcritos dos genes que estão associados à produção destes peptídeos. Para identificar e quantificar cianobactérias, a metodologia mais utilizada é a inspeção das amostras em microscópio. Avaliadores treinados podem identificar diferentes linhagens de uma mesma espécie, com distintos potenciais de produção de toxinas. Praticamente todos os trabalhos com a avaliação do potencial de produção de microcistinas fazem uma caracterização inicial das amostras de água através da contagem do número de células ou da avaliação do volume de indivíduos presentes, sendo exemplos os trabalhos de Vaitomaa et al. (2003), Mbedia et al. (2005), Via-Ordorika et al. (2004), Furukawa et al. (2006) e Shirai et al. (1991). A inspeção inicial é indispensável para identificar as espécies produtoras de toxinas que se encontram nas amostras, pois o gene que codifica a síntese de microcistinas está presente em várias espécies e gêneros de cianobactérias. Contudo, a capacidade de produzir toxinas não é uma característica genotípica, mas sim fenotípica (KAEBERNICK et al., 2000; SIVONEN, 1990), impossibilitando o uso das identificações e contagens, isoladamente, como critérios para decidir sobre a segurança no consumo da água.

Em geral as amostras são submetidas a contagens em microscópio invertido usando câmara de sedimentação ou de Utermöhl em campos aleatórios (AGUJARO, 2006). Como as cianobactérias apresentam grande diversidade morfológica (célula, colônia, filamento), o critério usado é unidade de contagem, o organismo. Para as cianobactérias, unicelulares, o organismo é a célula, e para as multicelulares, a colônia ou filamento.

No caso de florações e de acordo com a Portaria 518 (BRASIL, 2004) e CONAMA 357 (BRASIL, 2005), o número de células deve ser contado, visto a possibilidade de termos cianobactérias potencialmente tóxicas. A densidade de cada espécie de cianobactéria é expressa em número de organismos/ml ou células/ml. A seguir, é calculada a densidade relativa (%) de cada população de cianobactérias e, em relação à comunidade de algas na amostra. Para esta finalidade, os indivíduos

das espécies não pertencentes à Classe Cyanophyceae serão contados sem preocupação de fazer a contagem a nível populacional.

Para maior precisão na caracterização das espécies presentes, uma amostra integrada em cada local e época de coleta pode ser feita por arraste do fundo (limite da zona eufótica) até a superfície, de uma rede com 20µm de malha, conforme recomendação de Carvalho (2006). Esta mesma rede é arrastada horizontalmente por deslocamento de barco. Após coleta, as amostras são preservadas em formol 2% até contagem em microscópio e identificação utilizando as chaves de identificação de Sant'Ana et al. (2005) e Sant'Ana e Azevedo (2006).

## 1.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As microcistinas podem ser identificadas e quantificadas pelo uso de cromatografia em fase líquida (VAITOMAA et al., 2003; VIA-ORDORIKI et al. 2004; FURUKAWA et al., 2006; SHIRAI et al. 1991; HAWKINS et al., 2005). Há diferenças entre as metodologias utilizadas nos diferentes trabalhos, mas as melhores opções correspondem ao uso de ultra-som para rompimento das células das cianobactérias, seguida da concentração em cartuchos de extração em fase sólida de octadecil ou C18. A massa de octadecil é ajustada ao volume de solução a ser processado para que a porcentagem de recuperação seja alta. Há diferentes opções para a constituição da fase móvel. A detecção, em geral é feita pela absorção de luz ultravioleta (detectores de UV operando em um único comprimento de onda ou detectores de arranjo de diodos) ou por espectrometria de massas.

## 1.6 COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS

Em termos de comparações entre métodos para identificar e quantificar cianobactérias e microcistinas, destaca-se o trabalho de Hawkins et al.(2005). Os autores conduziram um amplo estudo em que compararam a contagem em microscópio, a inibição da fosfatase, testes toxicológicos em ratos, imunoenaios (Elisa), a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e a quantificação por cromatografia em fase líquida (detecção por absorção de luz ultravioleta ou por

espectrometria de massas) para classificar 53 amostras de água quanto à propriedade para consumo. Os testes toxicológicos em ratos foram pouco sensíveis e demandaram períodos muito longos para obtenção de resultados tornando o uso da metodologia inviável segundo a análise dos autores. Os procedimentos mais sensíveis foram a contagem em microscópio e a quantificação de transcritos correspondentes aos genes para a produção de microcistinas utilizando a técnica de PCR; estes dois métodos também foram os de menores custos. O imunoensaio foi intermediário em termos de sensibilidade, custos e consumo de tempo para realização das análises. Contudo, os autores consideraram a cromatografia em fase líquida associada à espectrometria de massas o método de melhor desempenho para a classificação de águas quanto à sua propriedade para consumo. Este método apresentou os maiores custos e a maior demanda de tempo de trabalho, mas recebeu a melhor avaliação geral (a partir de um conjunto de sete características) com pontuação bastante superior em relação aos demais. A segunda melhor opção apresentada pelos autores foi a cromatografia em fase líquida com detecção por absorção de luz em ultravioleta. Os autores concluem que a cromatografia em fase líquida deve ser considerada como a metodologia padrão para identificação da presença de microcistinas. Outras metodologias, como contagens e estudos de expressão, podem ser associadas a esta técnica para avaliar os riscos futuros de contaminação. Deve ser destacado que as análises cromatográficas realizadas por Hawkins et al. (2005) consideraram um volume de amostras de apenas 50ml fazendo com que o limite de detecção do método fosse de 0,5ug/L (próximo ao limite estabelecido nas legislações nacional e internacional).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do imazamox no controle de cianobactérias e suas toxinas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Verificar se o imazamox interfere na ALS de *Microcystis aeruginosa* e reduz o crescimento da cianobactéria.
- II. Verificar se o imazamox interfere na ALS de *Microcystis aeruginosa* e reduz a produção de microcistina pela cianobactéria.
- III. Verificar se o imazamox reduz a produção de leucina, um dos aminoácidos necessários à produção da microcistina LR, a variante da toxina de maior ocorrência em ambientes aquáticos eutrofizados.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para execução dos experimentos foram os seguintes:

- Tubos de ensaios;
- Pipetas;
- Micropipetas;
- Metanol;
- Acetona;
- Água miliq;
- Ultrassom – sonificador;
- Meio de cultivo BG11;
- Estufa de fotoperíodo;
- Espectrofotômetro, marca GBC Cintra 40;
- Cromatógrafo Líquido com detector de fluorescência, marca Shimadzu;
- Cromatógrafo líquido massa/massa (LC/MS/MS) 3200 QTRAP, marca Applied.

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 ESTUDOS PRELIMINARES

##### CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

As cepas de *Microcystis aeruginosa*, cedidas gentilmente pelo professor Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, da Universidade Federal de São Carlos-UFSCAR, foram mantidas em meio de cultivo BG11 composto por  $\text{NaNO}_3$  1,5g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,04 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,075 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,036 g/L, ácido Cítrico 0,006 g/L, Citrato de Amônio Férrico 0,006 g/L, EDTA 0,001 g/L,  $\text{NaCO}_3$  0,02 g/L e traços de metais ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  2,86 g/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1,81 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,222 g/L,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,39 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,079 g/L,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  49,4 mg/L) sob condições controladas (26°C e 12 horas de fotoperíodo).

### 3.2.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE IMAZAMOX SOBRE O CRESCIMENTO DE MICROCYSTIS AERUGINOSA EM MEIO DE CULTIVO

Em tubos de ensaio contendo 50 ml de meio de cultivo BG 11 suplementado com as concentrações de Imazamox 100 $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 12  $\mu$ M e 6  $\mu$ M, inoculou-se aproximadamente 10<sup>9</sup> células de cianobacteira a partir de inóculo fresco (com aproximadamente 4 dias de cultivo). Os tubos foram mantidos sob condições controladas a 26°C e 12 horas de fotoperíodo por 28 dias, sendo agitados manualmente diariamente para estimular o crescimento, logo após esse período foi analisada a concentração de clorofila alfa para estimar o crescimento da cianobactéria. O ensaio foi realizado com três repetições.

### 3.2.3 OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA ALPHA

Foram realizadas as leituras de concentração de clorofila alfa, extraída das células com acetona a 90% e analisadas em espectrofotômetro, em 645 e 662 nm. A concentração (em ug/L) foi obtida através da expressão  $Ca = 11.75_{A662} - 2,35_{A645}$ .

Após 28 dias de cultivo pode-se observar o efeito do produto sobre o crescimento das cianobactérias, obtendo-se uma clara resposta de inibição em relação ao controle nas concentrações iguais ou superiores a 25 $\mu$ M, como pode ser observado na tabela 1 e figura 5. Mesmo tratando-se de um estudo preliminar, foi possível observar que as concentrações inibitórias foram muito superiores àquelas cujo uso é viável em condições de campo. Tomando-se por referencial um lago com profundidade de apenas 1m, haveria a necessidade de aplicar 76,25kg/ha de imazamox para alcançar a concentração de 25 $\mu$ M.

Tabela 1: Concentrações médias de clorofila alfa nos tratamentos e porcentagem de inibição.

Tratamento	Clorofila $\alpha$ $\mu\text{g/ml}$ (Inibição %)
Imazamox 100 $\mu\text{M}$ – 30,5mg/L	0 (100)
Imazamox 50 $\mu\text{M}$ – 15,25mg/L	0 (100)
Imazamox 25 $\mu\text{M}$ – 7,625mg/L	0 (100)
Imazamox 12 $\mu\text{M}$ – 3,66mg/L	3,042091 (15,05276)
Imazamox 5 $\mu\text{M}$ – 1,525mg/L	3,237486 (9,59656)
<b>Controle</b>	<b>3,581154 (0)</b>

Fonte: Elaborado pelo autor

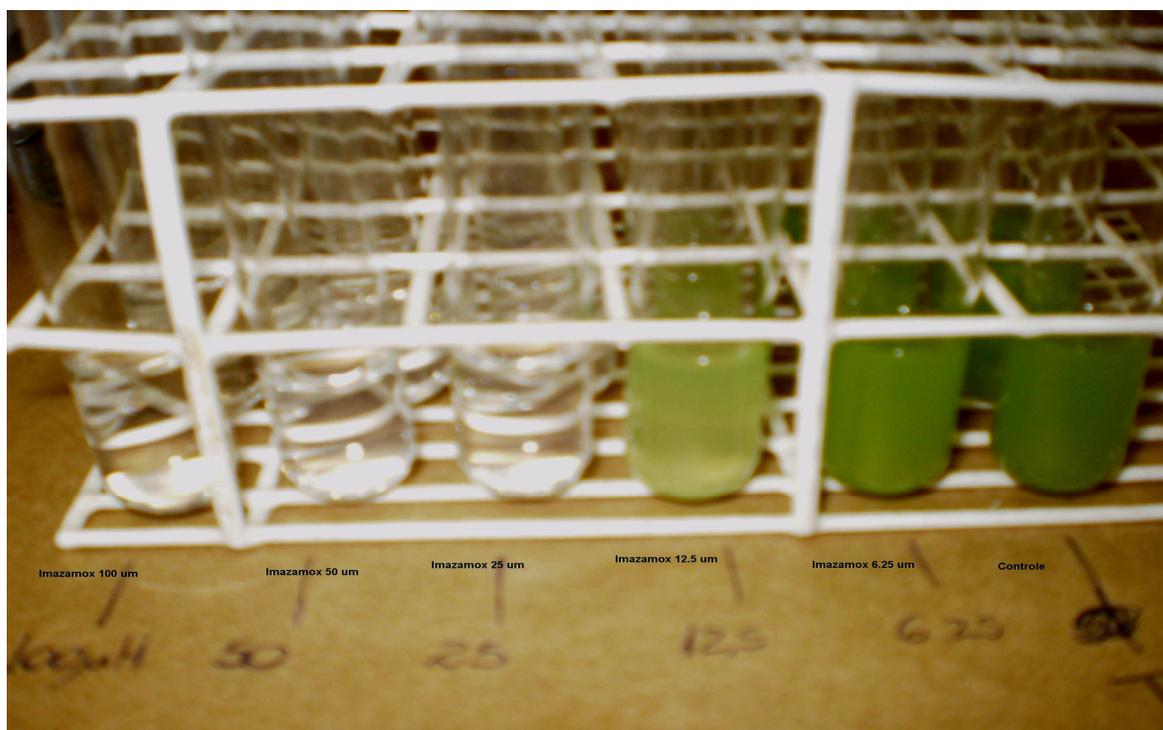


Figura 5 - Ensaio preliminar de crescimento de *Microcystis aeruginosa* sob o efeito de diferentes concentrações de Imazamox.

Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.3 OBTENÇÃO E CULTIVO DOS MICRORGANISMOS E CONCENTRAÇÕES DE IMAZAMOX UTILIZADAS

Foi utilizada a mesma cepa descrita para o ensaio preliminar. A manutenção da colônia para obtenção do inóculo também foi feita segundo os procedimentos já descritos.

Contudo, este estudo distinguiu-se do estudo preliminar em função do cultivo da *Microcystis aeruginosa* durante o teste ter sido feito em água de reservatório. A água coletada na represa de Barra Bonita-SP foi filtrada em filtro de papel de filtragem rápida, para remoção de alguns elementos (terra e outros detritos maiores).

Em seguida, alíquotas de 50 ml foram separadas, suplementadas com Imazamox nas concentrações de 5; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,1 mg/L e mantendo-se um controle sem o produto. Todas as amostras foram inoculadas com aproximadamente  $10^9$  células de cianobactéria a partir de inóculo fresco com 4 dias de cultivo e mantidas sob condições controladas (26°C e 12 horas de fotoperíodo) por 28 dias. Todos os frascos correspondendo às parcelas experimentais foram agitados manualmente diariamente para estimular o crescimento da cianobactéria. O estudo foi conduzido com quatro repetições.

#### 3.3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA ALFA PARA ESTIMATIVA DE CRESCIMENTO

Para a quantificação da clorofila foi desenvolvido um método analítico em um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu, equipado com software Class VP 6.0, bomba quaternária LC 20 AD, degazeificador DGU 20AS, injetor automático SIL 10 AF, forno CTO 10ASVP e detector de fluorescência, operando em comprimentos de onda de excitação a 440nm e emissão a 680nm.

Para as análises cromatográficas foi empregada uma coluna de C18, marca Synergi 2.5 $\mu$  Hydro-RP 100Å, dimensões 50 x 4,6 mm, temperatura ambiente e o volume de injeção foi de 50 $\mu$ l. As análises foram efetuadas em modo isocrático, tendo como fase móvel o solvente metanol. O tempo total de corrida foi de 8 minutos e o tempo de retenção da clorofila de 5,71 minutos, como mostra a figura 6. Foram estabelecidos 6 pontos para a curva de calibração sendo empregada a quantificação em diferentes concentrações dos padrões de clorofila.

A extração da clorofila da amostra foi feita em metanol ( 3 ml de amostra em 10 ml de metanol), 15 minutos de sonicação em ultrassom, e em seguida foi filtrado em filtro Millex HV (Millipore) 0,45 $\mu$ m, com membrana durapore 13 mm, e acondicionados em vial âmbar 9mm (Flow Supply), com 2 mL de capacidade, para posterior quantificação. Nas condições utilizadas o método cromatográfico empregado permitiu a quantificação de concentrações de clorofila iguais ou superiores a 1 $\mu$ g/L (menor concentração utilizada na elaboração da curva de calibração e que produziu cromatograma com relação sinal / ruído superior a 5).

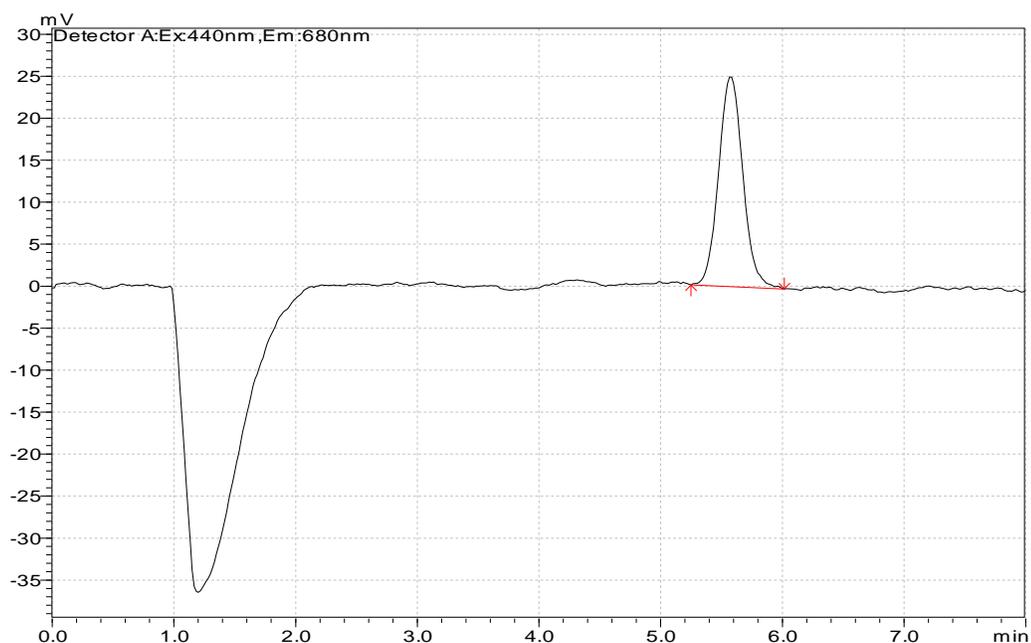


Figura 6 – Cromatograma de clorofila, obtido na concentração 50 $\mu$ g/L.  
Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.3.2 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA MICROCISTINAS LR, RR, YR E LA, DOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA LEUCINA, ISOLEUCINA E VALINA PRESENTES NAS AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO DO IMAZAMOX NO FINAL DO EXPERIMENTO.

A determinação das concentrações das quatro variantes da toxina e do imazamox foi feita através de cromatografia em fase líquida (HPLC), Shimadzu, modelo Proeminence UFLC, que combina análise ultra-rápida e excelente performance de separação, com alta confiabilidade de resultados; equipado com duas bombas LC-20AD, autoinjeter SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A (permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-

20AC (para controle da temperatura da coluna). Acoplado ao HPLC está o espectrômetro de massas 3200 QTRAP (Applied Biosystems), híbrido triplo quadrupolo, onde Q1 conhecido como (pai) e Q3 conhecido como filho, são utilizados como filtros de massa e Q2 é uma célula de colisão onde as moléculas são selecionadas em Q1 fragmentada em Q2 e detectada em Q3 o fragmento.

Para as análises cromatográficas foi empregada uma coluna de C18, marca Synergi 2.5 $\mu$  Hydro-RP 100Å, dimensões 50 x 4,6 mm, temperatura 30°C e o volume de injeção foi de 30 $\mu$ l. As análises foram efetuadas em modo gradiente, tendo como fases móveis os solventes metanol e água, com 5mM acetato de amônio. A proporção entre os solventes tem início com 60:40 (metanol:água), aos 5 minutos chega a 95:5 e mantém até 7 minutos, aos 9 minutos retorna a condição inicial 60:40 (metanol:água). O tempo total de corrida foi de 12 minutos e o tempo de retenção da microcistina LR foi de 6,11 minutos, dos aminoácidos leucina e isoleucina foi de 1,97 minutos e do imazamox foi de 3,6 minutos, como mostra as figuras 7, 8 e 9. Foram estabelecidos 6 pontos para a curva de calibração sendo empregada a quantificação em diferentes concentrações dos padrões de imazamox, aminoácidos e da microcistinas.

As amostras analisadas foram as mesmas extraídas como descrito no item anterior. As cinco substâncias puderam ser detectadas e quantificadas utilizando procedimentos específicos de MRM (monitoramento de múltiplas reações), em concentrações iguais ou superiores a 0,5 $\mu$ g/L (menores concentrações dos compostos utilizadas para elaborar as curvas de calibração e que produziu cromatograma com relação sinal / ruído superior a 5). A alta sensibilidade da metodologia analítica utilizada permitiu a leitura direta das amostras sem a necessidade de concentrá-las.

A análise dos aminoácidos de cadeia ramificada foi feita segundo os procedimentos cromatográficos descritos para o imazamox e para as variantes da microcistina, mas neste caso, o nível de sensibilidade foi muito inferior. O limite de detecção foi de 5 $\mu$ g/L de cada um dos componentes. Também deve ser destacado que não foi possível separar os aminoácidos leucina e isoleucina nas análises realizadas, pois eles apresentaram mesmo tempo de retenção, massa molecular e fragmentos produzidos. Portanto, estes dois aminoácidos foram agrupados na apresentação dos resultados.

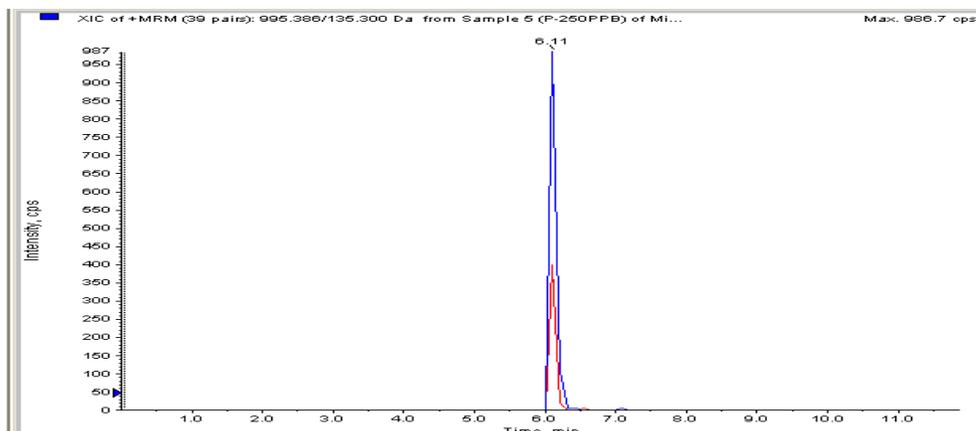


Figura 7 – Cromatograma de microcistina-LR, obtido na concentração 250µg/L.  
Fonte: Elaborado pelo autor

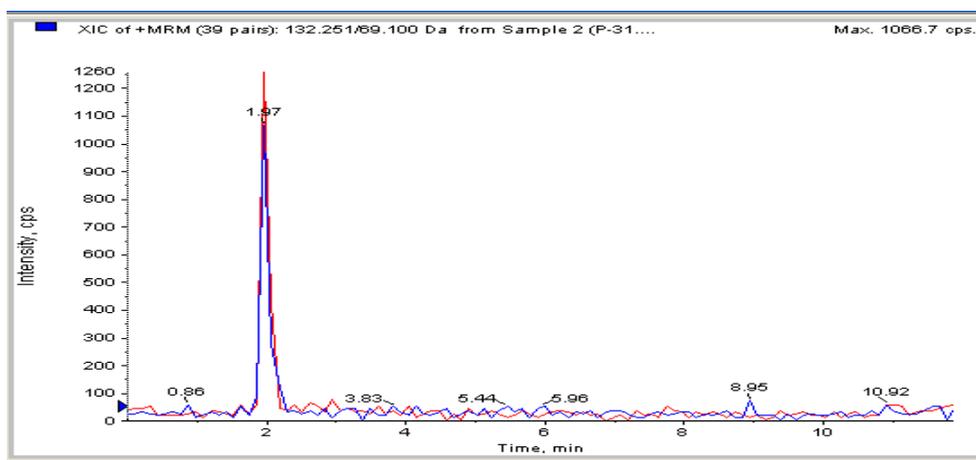


Figura 8 – Cromatograma de Leucina e Isoleucina, obtido na concentração 31,25µg/L.  
Fonte: Elaborado pelo autor

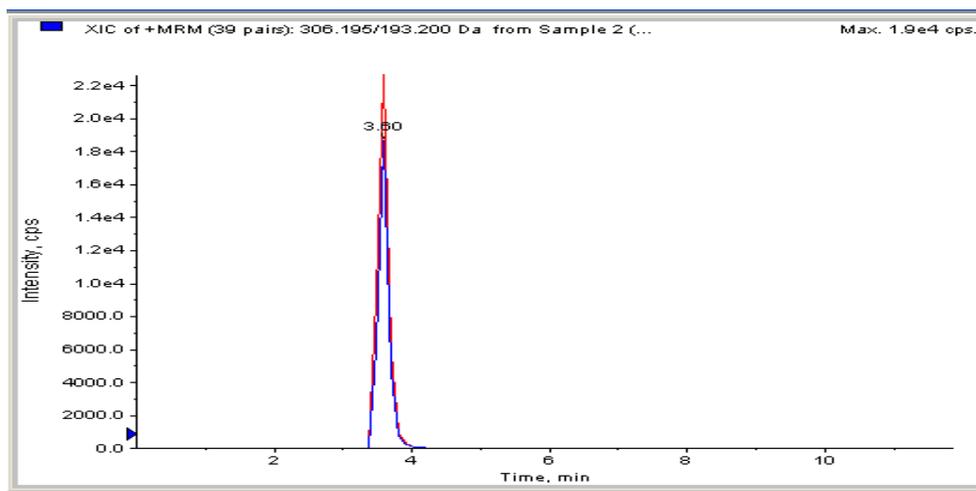


Figura 9 – Cromatograma de imazamox, obtido na concentração 31,25µg/L.  
Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises cromatográficas realizadas, não foram detectadas as seguintes substâncias: valina, microcistina RR, microcistina YR e microcistina LA. Portanto, não são apresentadas informações de concentrações das mesmas. Como mencionado, no caso da leucina e isoleucina, houve a detecção, mas não foi possível a separação dos aminoácidos.

Na Figura 10 é representada a relação entre as concentrações iniciais e finais de imazamox. O gráfico indica que as concentrações finais foram bastante uniformes entre as repetições experimentais e que a elevação dos valores da variável dependente representada nas ordenadas, não ocorre em escala linear indicando um maior metabolismo ou imobilização do imazamox nas maiores concentrações iniciais. Tal comportamento é melhor representado na Figura 11, em que as concentrações finais são representadas em porcentagens das concentrações iniciais. A análise da Figura 11 indica claramente que nas menores concentrações iniciais do herbicida acima de 12% do mesmo permaneceram nos frascos de incubação até o final do ensaio. Na maior concentração o valor remanescente foi inferior a 8%, indicando maior metabolismo ou imobilização do imazamox na maior concentração do mesmo. A identificação do processo envolvido na eliminação do imazamox não pode ser feita neste experimento e demanda estudos adicionais.

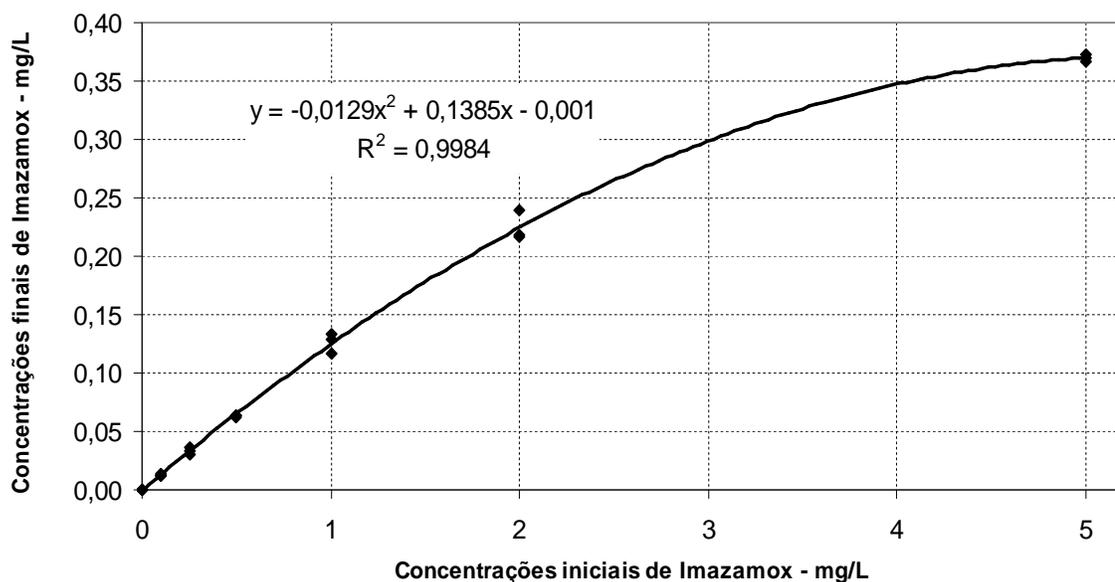


Figura 10 – Concentrações finais de imazamox em função das concentrações iniciais do herbicida.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

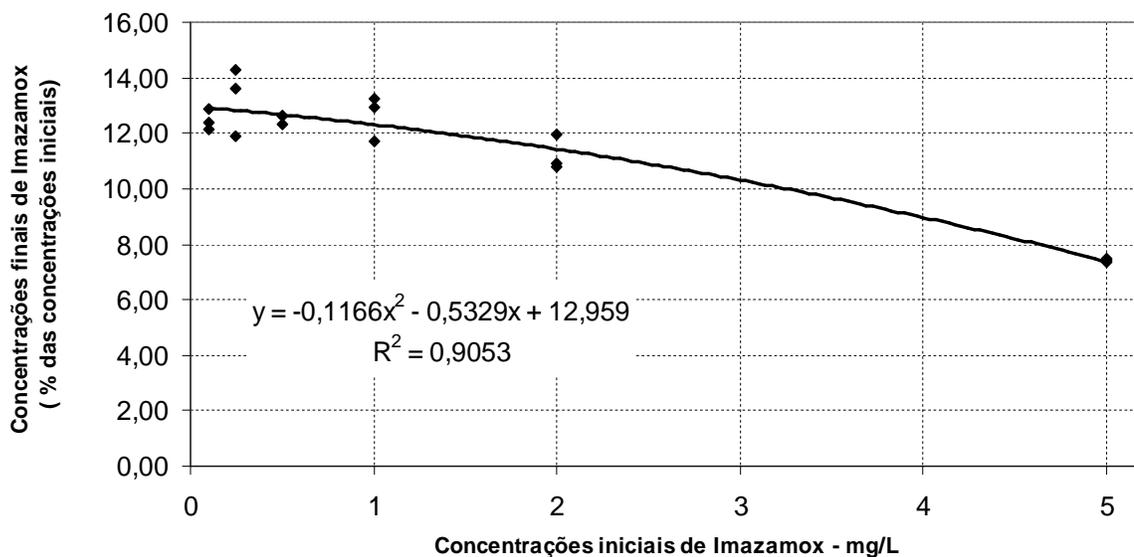


Figura 11 – Concentrações finais de imazamox (expressas em porcentagem das concentrações iniciais) em função das concentrações iniciais do herbicida.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 12 são representados os teores médios de clorofila alfa em função das concentrações iniciais de imazamox. Destaca-se que a avaliação do teor de clorofila alfa é um procedimento preciso e eficaz na indicação da biomassa de cianobactérias.

Para os resultados indicando as concentrações de clorofila alfa, não foi possível encontrar um modelo que representasse adequadamente a relação entre as variáveis e, portanto, são apresentados apenas os valores médios obtidos associados aos seus respectivos intervalos de confiança. A análise da Figura 12 indica que os teores de clorofila alfa foram bastante similares em todos os tratamentos utilizados, havendo a sobreposição dos intervalos de confiança das médias na maioria das comparações possíveis. A ausência de um padrão de comportamento dos resultados em função das concentrações também é indicadora da predominância dos efeitos do acaso. Portanto, a análise das informações de teores de clorofila alfa para todas as concentrações é coerente como observado no estudo preliminar e indica que concentrações de imazamox iguais ou inferiores a 5mg/L não foram capazes de limitar o crescimento da cepa de *Microcystis aeruginosa* utilizada no estudo.

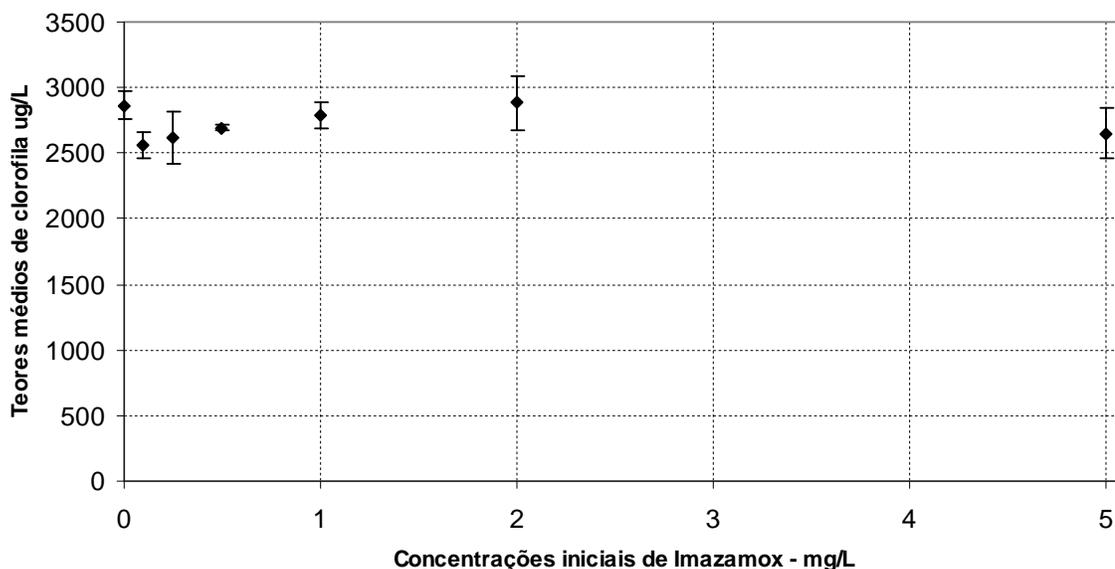


Figura 12 – Teores de clorofila alfa nas amostras em função das concentrações iniciais do herbicida. Coletas realizadas aos 28 dias após o início do estudo. Fonte: Elaborado pelo autor.

Considerando que há uma variação dos teores de clorofila alfa e que esta variação não está associada à concentração de imazamox, optou-se por padronizar e representar os teores de leucina+isoleucina e de microcistina LR em função da biomassa de cianobactérias nas amostras. Neste caso a biomassa foi determinada através do teor de clorofila alfa. Portanto, os teores dos aminoácidos e da toxina

foram padronizados em função dos teores de clorofila alfa. Os gráficos representando as concentrações não padronizadas em função das concentrações iniciais do herbicida também serão apresentados, mas foram preteridos em termos de estabelecimento de conclusões. Para melhor compreensão da relevância do procedimento de padronização, na Figura 13 são relacionados os teores de clorofila alfa e de microcistina LR. Observa-se que os teores de microcistina foram crescentes com os teores de clorofila. Mesmo com coeficiente de determinação de 0,4954 a análise de variâncias foi significativa ao nível de 0,037% de probabilidade ( $F_{\text{regressão}} = 18,66$ ), indicando alta confiabilidade do modelo linear ajustado.

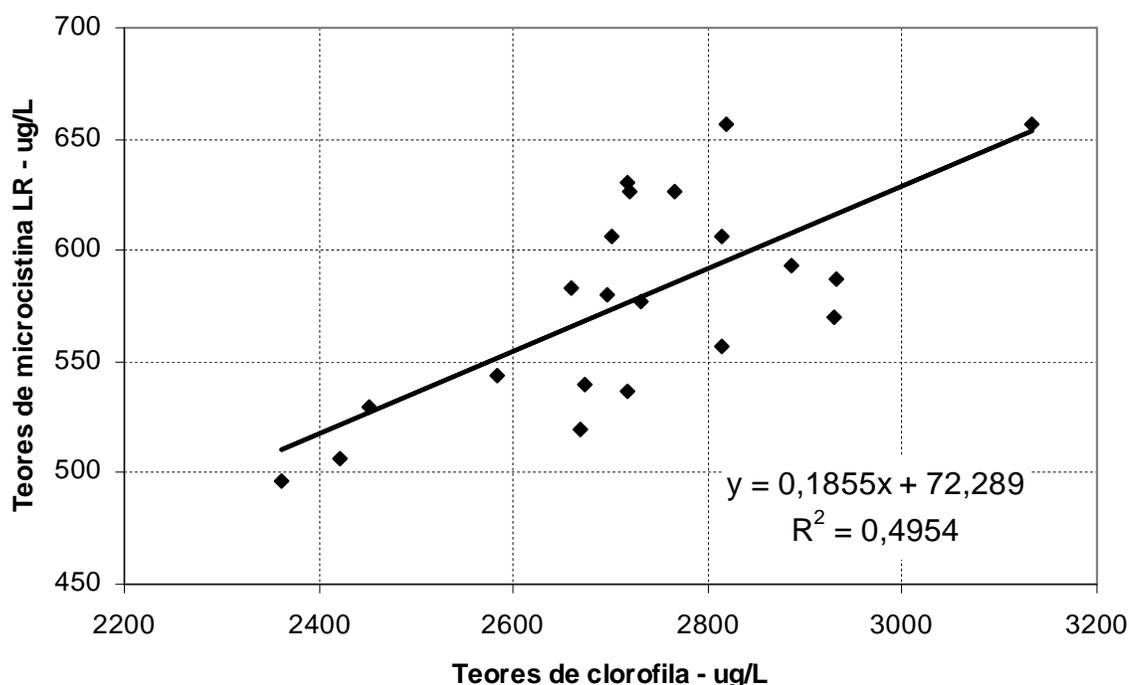


Figura 13 – Relação entre teores de clorofila alfa e de microcistina LR nas amostras.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 14 e 15 são representados os teores do complexo leucina+isoleucina em função das concentrações de imazamox. Na Figura 14 são apresentados os dados originais e na Figura 15 são apresentados os dados padronizados pelas concentrações de clorofila (segundo o procedimento descrito). Observa-se que houve tendência de queda das concentrações destes dois aminoácidos quando o imazamox foi acrescido ao meio de cultivo. O aumento da concentração do herbicida, em geral, implicou em menores teores dos aminoácidos.

Contudo, a elevada variabilidade dos dados, evidenciada pela grande amplitude das barras representando os intervalos de confiança, dificultou o estabelecimento de modelos representando o decréscimo dos teores de leucina+isoleucina em função da concentração do imazamox. Deve ser ressaltado que o método analítico utilizado detecta e quantifica apenas a fração livre dos dois aminoácidos. As unidades que já haviam sido imobilizadas na constituição de proteínas não foram analisadas.

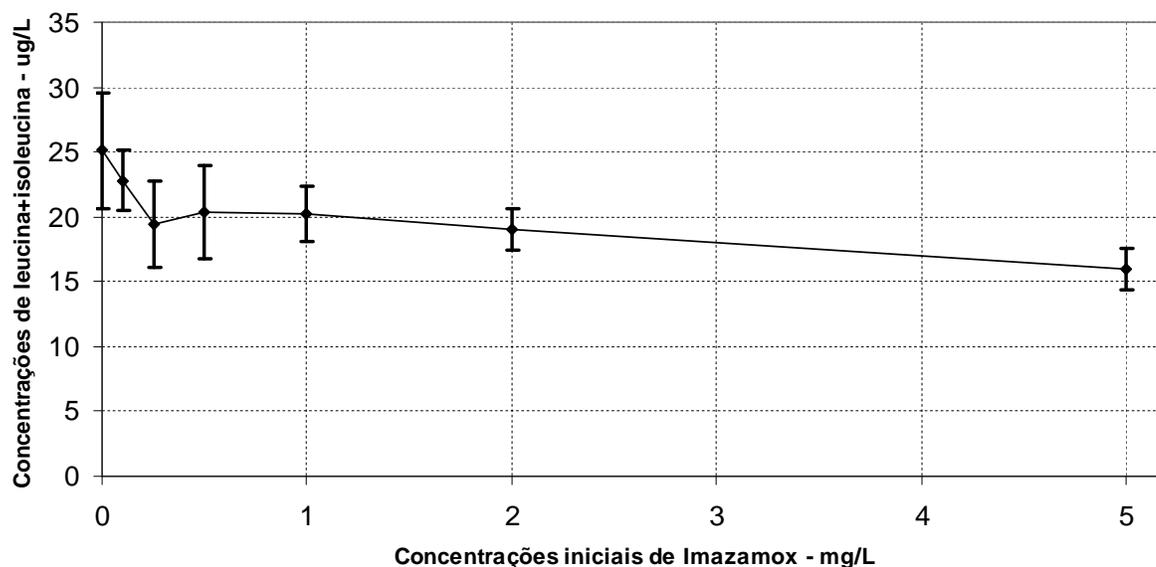


Figura 14 – Concentrações do complexo leucina+isoleucina nas amostras, em função das concentrações iniciais de imazamox.

Fonte: Elaborado pelo autor.

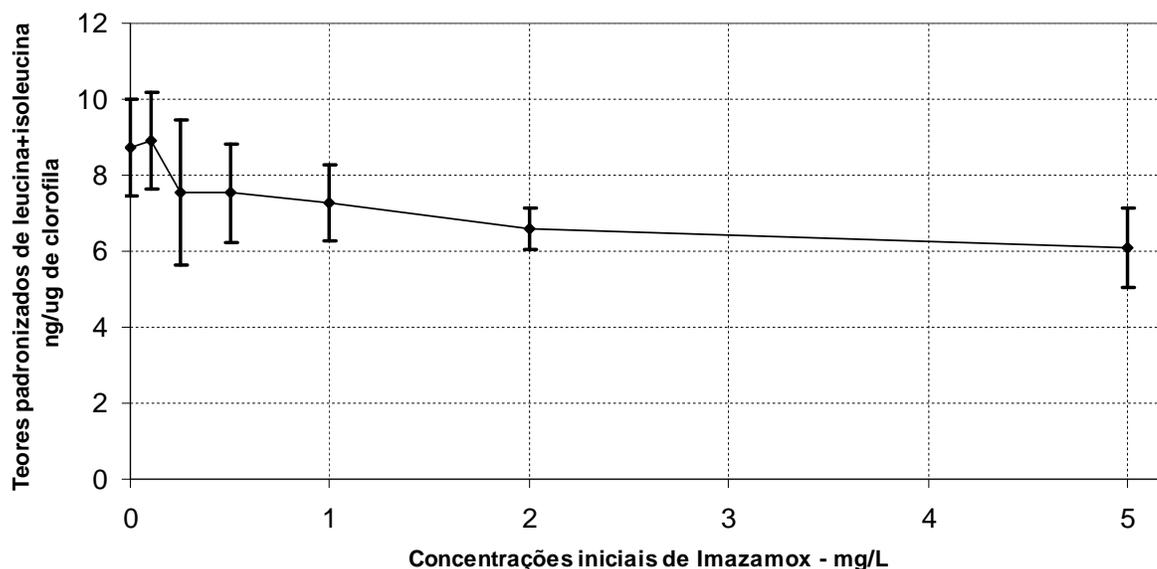


Figura 15 – Concentrações do complexo leucina+isoleucina nas amostras, em função das concentrações iniciais de imazamox. Dados padronizados pelos teores de clorofila alfa. Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas Figura 16 e 17 são representados os teores da microcistina LR em função das concentrações de imazamox. Na Figura 16 são apresentados os dados originais e na Figura 17 são apresentados os dados padronizados pelas concentrações de clorofila (segundo o procedimento descrito). Observa-se que, mesmo com a redução dos teores de leucina+isoleucina livres, não houve redução dos teores de microcistina LR com o acréscimo do imazamox nas concentrações utilizadas. Ou seja, a síntese de microcistina LR foi mantida mesmo com a redução na produção dos aminoácidos leucina+isoleucina provocada pelo imazamox.

Vale ressaltar uma vez mais que as toxinas microcistinas RR, microcistina YR e microcistina LA não foram detectadas nas amostras indicando que a cepa utilizada não foi capaz de produzi-las e acumulá-las nas condições experimentais utilizadas.

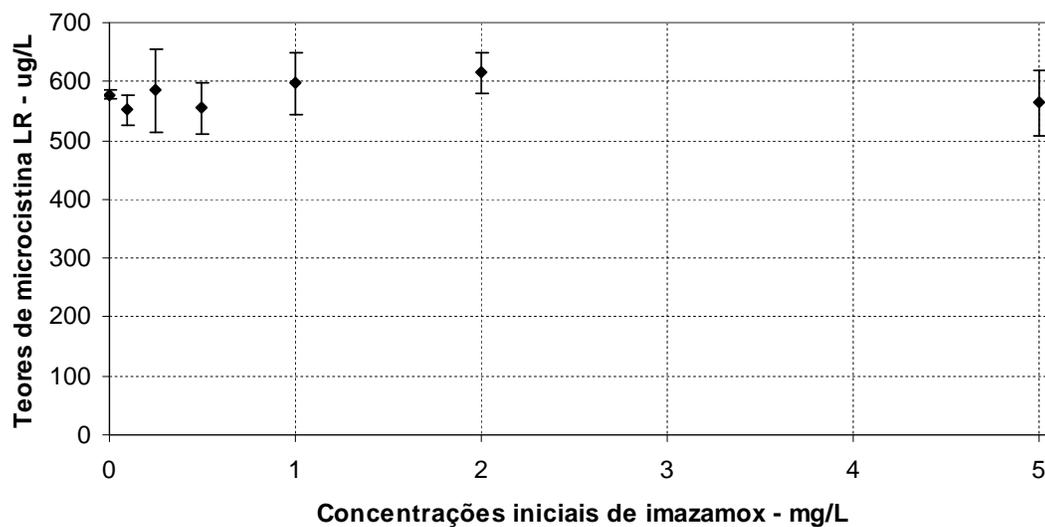


Figura 16 – Concentrações de microcistina LR nas amostras, em função das concentrações iniciais de imazamox.

Fonte: Elaborado pelo autor.

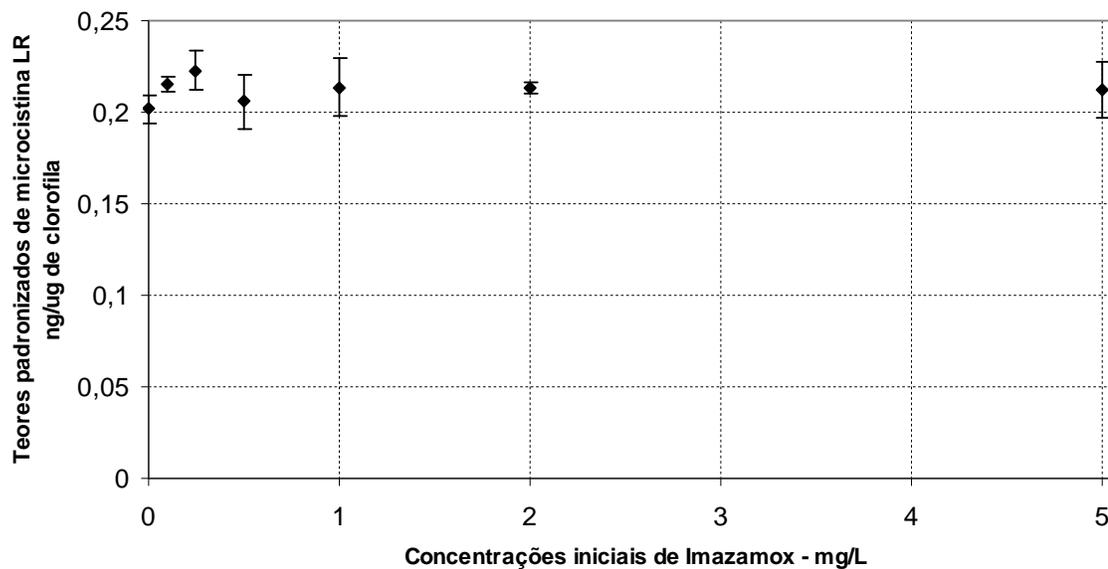


Figura 17 – Concentrações de microcistina LR nas amostras, em função das concentrações iniciais de imazamox. Dados padronizados pelos teores de clorofila alfa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos nos experimentos, observamos que o imazamox inibiu o crescimento da cepa de *Microcystis aeruginosa*, mas em concentrações muito altas, o que não torna viável o uso desse produto no controle das toxinas. Em concentrações entre 0,1 e 5mg/L, o imazamox não reduziu o crescimento de *Microcystis aeruginosa*, apenas retarda o crescimento, mas não o controla.

Para os aminoácidos necessários para a produção de *Microcystis aeruginosa*, os resultados mostraram-se que em concentrações entre 0,1 e 5mg/L, o imazamox reduziu os teores livres do complexo leucina+isoleucina em *Microcystis aeruginosa*, inibindo a produção dos mesmos.

Para a produção e o acúmulo de microcistina LR notou-se que nas concentrações entre 0,1 e 5mg/L o imazamox não reduziu a produção e acúmulo de microcistina LR por *Microcystis aeruginosa*, necessitando concentrações maiores de imazamox, mas o que acaba tornando inviável o seu uso.

## REFERÊNCIAS

AGUJARO, L.F. Métodos de análise. In: SANT'ANA, C. L. et al. (Ed.). **Manual ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência, 2006. p. 27-34. (capítulo de livro)

AZEVEDO, M.T. de P. & SANT'ANA, C.L. Morfologia e reprodução. In: SANT'ANA, C.L. et al. (Ed.). **Manual ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência, 2006. p. 5-8.

BICUDO, D.C. et al. Remoção de *Eichhornia crassipes* em um reservatório tropical raso e suas implicações na classificação trófica: estudo de longa duração no Lago das Garças, São Paulo. In: TUNDISI, J.G., MATSUMURA-TUNDISI, T. & SIDAGIS-GALLI, C.V. (Ed.) **Eutrofização na América do Sul: causas, conseqüências e tecnologias de gerenciamento e controle**. Instituto Internacional de Ecologia, São Carlos, 2006 p. 413-438.

BICUDO, D. C., FORTI, M. C.; BICUDO, C. E. M. (Orgs.). **Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI):** Unidade de Conservação que resiste à urbanização de São Paulo. São Paulo: Editora Secretaria do Meio Ambiente, 2002. (livro)

Bouaicha, N. et al. Genotoxic potential of Microcystin\_LR and nodularin in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo rat liver. **Environmental Toxicology**, v.20, n.3, pp.341-47, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 518 de 25 março de 2004. **ANVISA**, 2004. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/518\\_04.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/518_04.htm)>. Acesso em: 22 nov. 2011. (lei/decreto/portaria de site)

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Resolução CONAMA no. 357 de 17 março de 2005. **CETESB**, 2005. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/servicos/normas/pdf/L5303.pdf>>. Acesso em 15 nov. 2011.

CARMICHAEL, W. W. **Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins (Review)**. J. Appl. Bacteriol. 72, 1992. p. 445–459.

CARMICHAEL, W. W. **The toxins of cyanobacteria**. Sci. Amer. 270,1994. p. 78–86.

CARVALHO, L.R. Cianotoxinas. In: SANT'ANA, C.L. et al. (Ed.). **Manual ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência, 2066. p. 9-19.

COVICH, A.P., PALMER, M.A. & CROWL, T.A. **The role of benthic invertebrate species freshwater ecosystems**. *BioScience*, 49(2): 1999. p.119-127.

FISCHER, W. J. et al. Microcystin-LR Toxicodynamics, Induced Pathology, and Immunohistochemical Localization in Livers of Blue-Green Algae Exposed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicological Sciences** **54**, 2000. P. 365-373

FURUKAWA, K. et al. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria base don microcystin synthetase A gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n.2, pp. 90-96, 2006.

GUPTA N, PANT SC, VIJAYARAGHAVAN R, RAO PV. **Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice**. *Toxicology*. 2003 Jun 30;188(2-3):285-96.

HAWKINS, PETER R. et al. Review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environment. *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA*, v.54, n.8, p.509-518, 2005.

HENRY, R. & SANTOS, C.M. Importance of excretion by *Chironomus* spp. larvae on internal loads of nitrogen and phosphorus in a small eutrophic urban reservoir. *Braz. J. Biology*.

HENRY, R., CARMO, C.F. do & BICUDO, D.C. **Trophic status of a Brazilian urban reservoir and prognosis about the recovery of water quality**. *Acta Limnol. Bras.*, 16(3): 251-262, 2004.

HESS, F.D. Herbicide effects on plant structure, physiology, and biochemistry. In: Altman, J. **Pesticide Interactions in Crop Production Beneficial and Deleterious Effects**. CRC Press, London.1993. 579p.

HESS, F.D., BRIDGES, D. Mode of action of carotenoid biosynthesis inhibitors. In: **Herbicide Action Course**. Purdue University, West Lafayette, p.373-385, 2002.

HESS F.D., **Inhibitors of branched chain amino acid histidine biosynthesis**. In: Herbicide Action Course. Purdue University, West Lafayette, (1997b). p.405-426.

HOOSER, S. B. et al. **Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice**. Vet. Pathol. 26, 1989. p. 246–252.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B.A.; BORNER, T.; DITTMANN, E. Light and the transcriptional response of the Microcystin biosynthesis gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.8, pp. 3387-92, 2000.

KAYA, K. **Toxicology of microcystins**. In Toxic Microcystis (M. Watanabe, K. Harada, W. Carmichael, and H. Fujiki, Eds.),1996. p. 175–202. CRC Press, Boca Raton.

KUMAYER, R.; CHRISTIANSEN, G.; GUMPENBERGER, M.; FASTNER, J. Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. **Microbiology**, v.151, pp.1525-33, 2005.

LEI LM, SONG LR. **Acute toxicity of microcystin-LR in BALB/c mice**. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2005 May;25(5):565-6, 572.

LI, S.; SAKAMOTO, H. et al. Genotoxicity of microcystin\_LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mut. Res., Genet. Toxicol.* **Environ. Mutagen**, v.557, n.1, pp.1-6, 2004.

LOVELL, R. A. et al. Toxicity of intraperitoneal doses of microcystin-LR in two strains of male mice. **J. Env. Pathol. Toxicol. Oncol.** 9, 221–237, 1989.

LUUKKAINEN, R. et al. Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. **Appl Environ Microbiol.** 1993 Jul;59(7):2204-9.

MANKIEWICZ, J. et al. Genotoxicity of cyanobacterial extracts containing microcystins from Polish water reservoirs as determined by SOS chromotest and comet assay. **Environmental toxicology**, vol. 17, n.4, pp.341-50, 2002.

MBEDIA, S.; WELKERB, M.; FASNERC, J.; WIEDNERA, C. Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). **FEMS Microbiology Letters**, v.245, n.2, pp.299-301, 2005.

MOFFITT, M.C. & NEILAN, B.A. Characterization of the nodularium synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n.11, pp.6353-62, 2004.

MOUSDALE, D.M. & COGGINS, J.R. Amino Acid Synthesis. In: Kirkwood, R.C. Target sites for herbicide action. **Premium Press**. New York. 1991. 339 p

MOZETTO, A.A., SILVÉRIO, P.F. & SOARES, A. Estimates of benthic fluxes of nutrients across sediment and water interface (Guarapiranga Reservoir, São Paulo, Brazil). **Sci. Tot. Environ.**, 266 (1-3): 135-142, 2001.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R. et al. Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. **Jpn. J. Cancer Res.** 82, 993–996, 1991

PARK, H. et al. [D-Leu<sup>1</sup>] microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. **Toxicon**, v.39, n.6, pp.1-4, 2001.

PINTO-COELHO, R.M. & GRECO, M.K.B. 1999. The contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and zooplankton to the internal cycling of phosphorus in the eutrophic Pampulha reservoir, **Brazil. Hydrobiologia**, 411: 115-127, 1999.

PERSSON, A. Phosphorus release by fish in relation to external and internal load in a eutrophic lake. **Limnol. Oceanogr.**, 42(3): 577-583, 1997.

RÅBERGH, C. M. I., BYLUND, G., AND ERIKSSON, J. E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquat. Toxicol.** 20, 131–146, 1991.

RANTALA A, FEWER DP, HISBERGUES M, ROUHIAINEN L, VAITOMAA J, BORNER T, SIVONEN K. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2004 Jan 13;101(2):568-73.

SANT'ANA, C.L. & AZEVEDO, M.T. de P. Identificação e ilustração dos principais gêneros. In: SANT'ANA, C.L. (Ed.). **Manual ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**, Rio de Janeiro: Interciência, 2006 p. 35-53.

SANT'ANA, C.L., BRANCO, L.H.Z. & AZEVEDO, M.T. de P. Cyanophyceae/Cyanobacteria. In: BICUDO, C.E. de M. & MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil**. Chave para identificação e descrição. São Carlos: Rima Editora, 2005. p. 19-82.

SCHAUS, M.H. et al. Nitrogen and phosphorus excretion by ditritivorous gizzard shad in a reservoir ecosystem. **Limnol. Oceanogr.** 1997. 42(6): 1386-1397.

SHIRAI M, OHTAKE A, SANO T, MATSUMOTO S, SAKAMOTO T, SATO A, AIDA T, HARADA K, SHIMADA T, SUZUKI M. Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures. **Appl Environ Microbiol.** 1991 April; 57(4): 1241–1245.

Sigma / Aldrich (2006). [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Biochemicals/Enzyme\\_Explorer/Cell\\_Signaling\\_Enzymes/Cyanobacterial\\_Toxins.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Cell_Signaling_Enzymes/Cyanobacterial_Toxins.html).

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

SOLTER, P. F. et al. Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. **Toxicol. Sci.** 44, 87–96, 1998.

SOUZA, R.C.R. Introdução. In: SANT'ANA, C.L., et al, C.R. de (Ed.). **Manual ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro. Interciência, 2006. p. 1-4.

TENCALLA, F., AND DIETRICH, D. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicon** 34, 583–595, 1997.

TUNDISI, J.G. 2003. **Água no século XXI**. Enfrentando a escassez. São Carlos: Rima Editora, 2003. 247p.

VAITOMAA, J. et al. Quantitative real-time PCR for determination of Microcystin synthetase e copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. **Applied and Environmental microbiology**, v.69, n.12, pp.7289-97, 2003.

VIA-ORDORIKI, L. et al. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. In European freshwater bodies: Detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. **System. Appl. Microbiol.** V.27, pp.592-602, 2004.

YOSHIDA, T. et al. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. **Nat. Toxins** 5, 91–95, 1997.

Zhan L. et al. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. **Mutat Res.** 2004 Jan 10;557(1):1-6.