

## Extração e quantificação de toxinas de *Microcystis aeruginosa*

## Extraction and quantification of toxins from *Microcystis aeruginosa*

### RESUMO

Gabriela Prado Fernandes  
[gabprado\\_fernandes@outlook.com](mailto:gabprado_fernandes@outlook.com)  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Thomaz Aurélio Pagioro  
[thomazap@gmail.com](mailto:thomazap@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal,  
Curitiba, Paraná, Brasil

Diversas espécies de cianobactérias vêm sendo catalogadas e estudadas ao longo dos anos. No entanto, as ações antrópicas têm causado um aumento significativo nas florações de cianobactérias tóxicas, prejudicando a qualidade da água e, conseqüentemente, trazendo efeitos negativos tanto para a saúde humana quanto animal. O presente estudo tem como objetivo cultivar em laboratório a espécie *Microcystis aeruginosa* e, a partir disso, realizar a extração e quantificação da microcistina (toxina sintetizada pela espécie). A cepa utilizada para pesquisa foi fornecida pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos. Na primeira etapa do trabalho foram preparados os meios de cultivo e, em seguida, foi realizada a inoculação. Para tanto, o cultivo foi mantido e monitorado. Devido a suspensão de atividades em laboratório como consequência da pandemia do novo coronavírus, pretende-se dar continuidade nas demais etapas do trabalho, que consistem em realizar as coletas para a extração a partir de metodologia determinada e a quantificação das cianotoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

**PALAVRAS-CHAVE:** Qualidade da água. Cianobactérias. Floração.

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

### ABSTRACT

Different species of cyanobacterial have been catalogued and studied over the years. Although, the anthropic actions have caused a significant increase in the blooms of toxic cyanobacteria, harming the quality of water and bringing negative effects for both human and animal health. The present study aims to cultivate the species *Microcystis aeruginosa* in laboratory and perform the extraction and quantification of microcystin (toxin synthesized by the species). The Department of Botany at the Federal University of São Carlos has provided the strain used in the research. In the first stage of the work, the culture media was prepared and then the inoculation was carried out. Therefore, the cultivation was maintained and monitored. Due to the suspension of activities in the laboratory as a consequence of the pandemic of the new coronavirus, it is intended to keep developing the other stages of the work, which consist of performing the collections for extraction using determined methodology and the quantification of cyanotoxins by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

**KEYWORDS:** Water quality. Cyanobacteria. Flowering.



## INTRODUÇÃO

Com demasiada frequência, as bacias de drenagem das águas de lagos, rios, reservatórios e estuários passam por alterações em suas características tróficas devido a interferência de atividades antrópicas. Esse processo é denominado por eutrofização cultural ou artificial, ocorrendo principalmente pelo excesso de nitrogênio e fósforo depositado indevidamente nessas águas (TUNDISI e MATSUMURA-TUNDISI, 1992). Tendo seu primeiro registro fóssil datando aproximadamente 3,5 bilhões de anos, as cianobactérias colonizaram praticamente todos os ecossistemas do planeta. Em virtude de sua história evolutiva extensa, estes microrganismos fotossintetizantes procariontes são normalmente encontrados no plâncton de ambientes tanto de água doce como marinhos. As cianobactérias podem se desenvolver em ambientes extremos devido a sua capacidade de suportar a incidência de raios ultra violetas, elevadas e baixas temperaturas, altas concentrações de elementos potencialmente tóxicos e, até mesmo, baixo nível de oxigênio (WHITTON e POTTS, 2000). A espécie *Microcystis aeruginosa* domina grande parte dos ambientes e é considerada a maior formadora de florações no Brasil (BEYRUTH et al., 1992; TUNDISI e MATSUMURA-TUNDISI, 1992; AGUIAR et al., 1993; FERRÃO-FILHO et al., 2002; MARINHO e HUSZAR, 2002). A morte ou lise celular das cianobactérias traz como consequência a produção de toxinas denominadas microcistinas (MSAGATI et al., 2006). As toxinas são capazes de manter a toxicidade mesmo após a fervura, o que as torna extremamente resistentes (CHEN et al., 1996 apud CARMICHAEL et al., 1992a). Mais de 40 espécies já foram reconhecidas como produtoras de toxinas prejudiciais à saúde pública dentro do filo *Cyanophyta*, sendo estas divididas em 25 gêneros (DI BERNARDO, MINILLO e DANTAS, 2010). A produção de cianotoxinas em ambientes aquáticos tem se tornado um grande problema no que diz respeito às águas para abastecimento público. A presença destas toxinas sintetizadas por cianobactérias na água potável coloca em risco a saúde das pessoas que a consomem, visto que podem causar efeitos prejudiciais ao sistema nervoso e hepático (CHORUS e BARTRAM, 1999). Tornando-se um processo cada vez mais comum no mundo todo, as florações de cianobactérias tóxicas estão se multiplicando por inúmeros corpos d'água (MISHRA e MISHRA, 2014). O que determina se uma floração irá produzir toxinas ou não são as suas condições de crescimento. Sendo assim, não há possibilidade de presumir a toxicidade de uma espécie, mesmo que ela seja relatada como tóxica. À vista disso, a realização de testes que sejam capazes de detectar as cianotoxinas são de suma importância para a prevenção dos riscos relacionados à essas substâncias (CARMICHAEL, 1992b).

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Limnologia, Ecologia e Cromatografia (LLiEC) utilizando-se a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. Baseadas no estudo realizado por Soares, Magalhães e Azevedo (2004), as condições determinadas para o cultivo foram as seguintes: fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro; temperatura de 22°C a 25°C; pH de 7,4; e intensidade luminosa de 2150 lux. Devido à possível toxicidade da cepa, o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) tais como máscaras, luvas e jaleco foram adotados, assim

como os experimentos foram realizados em local isolado, evitando-se possíveis incidentes. As retiradas de amostras foram feitas próximas ao bico de Bunsen, a fim de evitar a contaminação do inóculo. Além disso, para que risco de inalação das células de cultivo não ocorresse pela analista e os demais integrantes do laboratório, foi necessário o uso da câmara de fluxo laminar. Ainda, todos os resíduos produzidos durante o experimento foram devidamente descartados em recipientes plásticos e identificados como tóxicos. O Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos forneceu em 2012 esta cepa (BB005) que, desde então, é mantida, cultivada e utilizada para demais pesquisas. O meio de cultura líquido ASM-1 foi utilizado para o cultivo da *M. aeruginosa* (GORHAM et al., 1964) e sua composição está especificada de acordo com o Quadro 1. Os processos de manutenção da cepa foram realizados mensalmente, de forma a manter a pureza do inóculo. Para preservar a esterilidade do meio de cultura, tubos de ensaio contendo 15 mL do meio ASM-1 e vedados com rolhas de algodão foram levados à autoclave e o tempo necessário foi de 30 minutos a 121°C (AZEVEDO e SANT'ANNA, 2003).

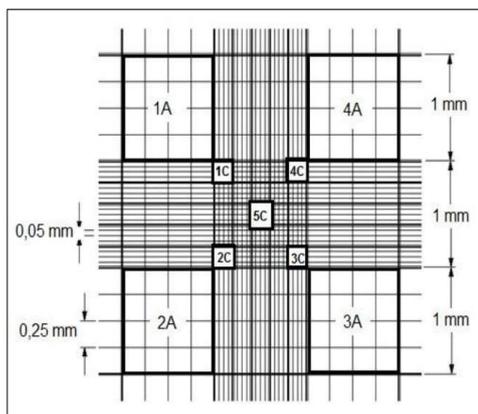
Quadro 1- Composição das soluções-estoque e o volume utilizado para o preparo do meio de cultura ASM-1.

Solução estoque	Nutrientes	Quantidade (g. L <sup>-1</sup> )	Volume para preparo de 1 L de ASM -1
Solução A	NaNO <sub>3</sub>	8,5	20
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,45	
	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	2,05	
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1,45	
Solução B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,7	2
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	17,8	
Solução C	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28,4	0,1
	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	13,9	
	FeCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10,8	
	ZnCl <sub>2</sub>	3,35	
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,19	
	CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,014	
Solução D	EDTA tritriplex	18,6	0,4

Fonte: Autoria própria (2020).

Em diversas etapas do trabalho fez-se necessária a determinação das concentrações celulares, realizadas em câmara de Neubauer (profundidade 0,100 mm), de acordo com a Figura 1.

Figura 1 – Representação dos campos de contagem da câmara de Neubauer, suas direções e sentidos de contagem.



Fonte: SILVEIRA, 2012.

Fundamentado nas dimensões da câmara de Neubauer, para estimar o valor de concentração celular foram utilizadas as Equações 1 ou 2:

$$Y = X_A \times FD \times 10^4 \quad (1)$$

$$Y = X_C \times FD \times 1,6 \times 10^6 \quad (2)$$

Sendo:

y = concentração celular em células x  $ML^{-1}$  ;

XA = média das contagens entre os 4 campos indicados pela letra A;

XC = média das contagens entre os 5 campos indicados pela letra B;

FD = fator utilizado caso alguma diluição for realizada.

A escolha entre as equações 1 ou 2 se dará de acordo com as concentrações celulares, assim como os campos que serão utilizados, sendo respectivamente:

- 1) Para amostras com concentração de até  $[9,99 \times 10^5 \text{ cel x mL}^{-1}]$  os campos utilizados foram os indicados pela letra A;
- 2) Para as amostras com concentração acima de  $[10^6 \text{ cel x mL}^{-1}]$  os campos utilizados foram os indicados pela letra C.

Em virtude da pandemia do novo coronavírus (covid-19), a segunda parte do trabalho não pôde ser executada. Esta consistiria na utilização do método de extração da toxina e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação da microcistina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados, entre os meses de janeiro e março de 2020, testes preliminares para o cultivo das células. Foi possível constatar, através das

observações — como por exemplo, a sua coloração verde pura após alguns dias de inóculo e, ainda, quando os béqueres passaram por agitação nenhuma partícula indesejada foi visualizada —, que todos os cultivos demonstraram um ótimo desenvolvimento conforme o esperado.

Entretanto, tendo em vista a pandemia do novo coronavírus (covid-19), não foi possível ainda prosseguir com as próximas etapas do trabalho — extração e quantificação da microcistina. Dessa forma, espera-se realizá-las em breve.

## CONCLUSÕES

O estudo trata de um assunto de extrema importância devido aos riscos iminentes que a presença da microcistina traz para toda a sociedade e, também, às comunidades aquáticas, interferindo na qualidade da água, principalmente as não atendidas pelos serviços de saneamento. Levando em consideração a possibilidade de serem lesados órgãos como o fígado, a pele e, até mesmo, o sistema nervoso, espera-se que o assunto abordado tenha maior visibilidade e que haja interesse futuro para o desenvolvimento de demais trabalhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação Araucária pelo apoio financeiro e à UTFPR-CT pela disponibilização de laboratório e equipamentos necessários. Um agradecimento especial à minha querida amiga Marcela por toda a ajuda e tempo dispostos e ao Augusto pela paciência e cuidado com os ensinamentos que nos foram passados.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. G.; BODEGA, C. R. R.; AZEVEDO, S. M. F. O. **Microcystis aeruginosa strains isolated from bodies of water in Rio de Janeiro**. *Toxicon*, n. 31, p. 107-108, 1993.

AZEVEDO, M. T. P.; SANT'ANNA, C. L. **Sphaerocavum brasiliense a new planktic genus and species of cyanobacteria from reservoirs os São Paulo state, Brazil**. *Algological Studies*, v. 109, p. 79 – 92, 2003.

BEYRUTH, Z. *et al.* Toxic algae in freshwaters of São Paulo state. P. 53 – 64, 1992. In: MARINO, M. C. *et al.* **Algae and environment: a General Approach**. Sociedade Brasileira de Ficologia/CETESB, São Paulo. 131 p.

CARMICHAEL, W. W. *et al.* *Bacteriol.* 72., 445. 1992 a.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, v. 72, n. 6, p. 445 – 459, 1992 b.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon. 400 p. 1999.

DI BERNARDO, L.; MINILLO, A.; DANTAS, A. D. B. **Florações de algas e de cianobactérias: suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento.** São Carlos: LDiBe Ltda. 2010.

FERRÃO-FILHO, A. S.; DOMINGOS, P. AZEVEDO, S. M. F. O. Influences of a *Microcystis aeruginosa* Kützing bloom on zooplankton populations in Jacarepaguá Lagoon. Rio de Janeiro, Brazil. **Limnologia**, n. 32, p. 295 - 308, 2002.

GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U. T.; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aque* (Lyngb.) De Bréb. Internat. Verein. Theor. Angew. **Limnologia**, v. 15, p. 796 - 804, 1964.

MARINHO, M. M.; HUSZAR, V. L. M. Nitrogen availability and physical conditions as controlling factors of phytoplankton composition and biomass in a tropical reservoir (Southern Brasil). **Archiv für Hydrobiologie**, n. 153, p. 433 – 468, 2002.

MISHRA, S.; MISHRA, D. R. A novel remote sensing algorithm to quantify phycocyanin in cyanobacterial algal blooms. **Environmental Research Letters**, v. 9, 9p. 2014.

SOARES, R. M.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichidae) 111 under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 70, n. 1, p. 1 – 10, 2004.

MSAGATI, T. A. M. et al. Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. **Aquatic toxicology**, v. 78, p. 382, 2006.

SILVEIRA, A. L. Avaliação do efeito inibitório de extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* Kützing. Dissertação de mestrado (Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2012.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Eutrophication of lakes and reservoirs: A comparative analysis, case studies, perspectives. P. 1 – 33, 1992. In: MARINO, M. C. et al. **Algae and Environment: a General Approach.** Sociedade Brasileira de Ficologia/CETESB, São Paulo. 131p.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. **Kluwer Academic**, 2000.