



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

JARDECICLEIA PATRICIA DA SILVA CABRAL

**CIANOTOXINAS EM OSTRAS E EM ÁGUAS DE
CULTIVO DA COSTA NORTE DO BRASIL**

BELÉM

2016

JARDECICLEIA PATRICIA DA SILVA CABRAL

**CIANOTOXINAS EM OSTRAS E EM ÁGUAS DE
CULTIVO DA COSTA NORTE DO BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR :

Dra. Maria Paula Cruz Schneider

BELÉM

2016

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Cabral, Jardecicleia Patricia da Silva
Cianotoxinas em ostras e em águas de cultivo da Costa Norte do
Brasil / Jardecicleia Patricia da Silva Cabral; Orientadora, Maria
Paula Cruz Schneider. - 2016.
61 f. : il.
Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia, Belém, 2016.

1.Cianobactérias - Pará. 2. Cianotoxinas - Pará. 3.Ostras –
consumo.4. Toxicologia ambiental. I. Schneider, Maria Paula Cruz,
orientadora. II. Título.

CDD – 22 ed. 579.39098115

JARDECICLEIA PATRICIA DA SILVA CABRAL

**CIANOTOXINAS EM OSTRAS E EM ÁGUAS DE CULTIVO DA
COSTA NORTE DO BRASIL**

Data da apresentação: 31/08/2016

Belém (PA)

BANCA EXAMINADORA :

Nome do professor orientador

UFPA – Dra. Maria Paula Cruz Schneider

Nome do Membro 1

UFPA – Dra. Luciana Pereira Xavier

Nome do Membro 2

IEC – Dr. Marcelo de Oliveira Lima

Nome do Membro 3

UNIFAP – Dra. Sílvia Maria Mathes Faustino

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que mais um sonho se concretizasse em minha vida.

À minha família pelo apoio incondicional.

À Dr^a. Maria Paula Schneider por me receber em seu grupo de pesquisa e fornecer os meios necessários para que este trabalho fosse realizado.

À Mariana Pureza pela inestimável ajuda na escrita do trabalho, pelos ensinamentos sobre práticas em laboratório e análises de bioinformática e estatística.

À Roberta Rezende por nortear o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa para a Qualificação.

À minha colega de mestrado Sônia Robledo por se tornar uma “irmã” ao longo dessa trajetória através de sua amizade, companheirismo e incentivo em todos os aspectos.

À amiga Denise Pamplona pela parceria nas disciplinas do curso, pela ajuda para conseguir orientadora e pelas conversas com boas risadas que deixavam a rotina mais leve.

À doutoranda Tatiana Maia pelas palavras de incentivo e otimismo nos momentos de angústia e de incerteza.

Aos colegas do Laboratório de Genômica e Biotecnologia da UFPA Carmem Laura, Davi César, Giulia Lima, Lucas e Vagner pela colaboração e pelo bom ambiente de trabalho criado.

Ao Dr. Marcelo Lima por disponibilizar os laboratórios da Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas (IEC) para realização de análises cromatográficas.

Ao pesquisador Francisco Arimateia do IEC pelo suporte nas coletas, pelo auxílio na realização das análises cromatográficas e pela paciência ao ensinar.

À pesquisadora Elane Cunha do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA) pelos ensinamentos sobre identificação morfológica e contagem de cianobactérias, e pela realização do ensaio de ELISA para a minha pesquisa.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da UFPA pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Amparo de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

À Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA) pelo auxílio financeiro.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho.

Meu muito obrigada!!!

Enganosa é a graça, e vã, a formosura,
mas a mulher que teme ao Senhor,
essa será louvada.

(Pr. 31.30)

RESUMO

Cianobactérias são organismos procarióticos fotossintetizantes e em condições favoráveis ao seu crescimento podem formar florações. Também são capazes de produzir cianotoxinas, metabólitos secundários que possuem efeito tóxico para organismos eucarióticos inclusive o homem. Como parte do fitoplâncton as cianobactérias participam das cadeias alimentares, sendo assim a ingestão de moluscos que tenham se alimentado continuamente de cianobactérias tóxicas e acumulado as toxinas em seus tecidos gera a possibilidade de transferência para o homem através de seu consumo trazendo sérios riscos à sua saúde. Ainda são escassos estudos sobre a contaminação (por cianotoxinas) de moluscos destinados ao consumo humano. Logo, este estudo consistiu em verificar a ocorrência de cianotoxinas em águas de cultivo e no tecido de ostras destinadas ao consumo humano. As coletas de água e de ostras foram realizadas em cultivos de dois municípios localizados no nordeste do Pará. A pesquisa por cianotoxinas foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC. As cianobactérias presentes na água, as isoladas e as cultivadas a partir das conchas das ostras foram identificadas. Não foram detectadas microcistinas e saxitoxinas nas amostras de água e nos extratos de ostras de ambos locais de cultivo. Contudo, foram identificados três gêneros de cianobactérias – *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* e *Phormidium*, em Curuçá e três gêneros de cianobactérias em São Caetano de Odivelas – *Aphanothece*, *Oscillatoria* e *Phormidium*, todos conhecidos por conter espécies tóxicas. Foi detectada a presença de saxitoxinas em extratos de culturas de cianobactérias a partir das conchas das ostras de ambos os locais de cultivo, indicando a presença de espécies tóxicas apesar da ausência de floração. Neste estudo, verificou-se que os locais de cultivo de ostras encontram-se adequadas para o consumo, livres de contaminação por microcistinas e saxitoxinas, no entanto, se faz necessária a implantação de uma legislação específica e o monitoramento desses cultivos a fim de assegurar a saúde dos consumidores.

Palavras-chave: Cianotoxinas. Ostras. Consumo humano.

ABSTRACT

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotic organisms and under conditions favorable to their growth can form blooms. They are also capable of producing cyanotoxins, secondary metabolites that have a toxic effect on eukaryotic organisms including man. As part of phytoplankton the cyanobacteria participate in the food chains, thus the ingestion of shellfish, that have been continuously fed toxic cyanobacteria and accumulated the toxins in their tissues generates the possibility of transfer to the man through their consumption bringing serious risks to their health. There is still very little research on the contamination (by cyanotoxins) of shellfish intended for human consumption. Therefore, this study was to verify the occurrence of cyanotoxins in culture waters and in the tissue of oysters destined for human consumption. The water and oyster samples were collected from two municipalities located in the northeast of Pará. The cyanotoxins research was performed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The cyanobacteria present in the water, isolated and cultured from oyster shells were identified. No microcystins and saxitoxins were detected in water samples and oyster extracts from both growing sites. However, three genera of cyanobacteria - *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* and *Phormidium* were identified in Curuçá and three genera of cyanobacteria in São Caetano de Odivelas - *Aphanothece*, *Oscillatoria* and *Phormidium*, all known to contain toxic species. The presence of saxitoxins in extracts from cyanobacterial cultures was detected from the oyster shells of both growing sites, indicating the presence of toxic species despite the absence of bloom. In this study, it was verified that the cultivation of oyster sites are suitable for consumption, free of contamination by microcystins and saxitoxins, however, it is necessary to implement specific legislation and the monitoring of these crops in order to ensure consumer health.

Key words: Cyanotoxins. Oysters. Human consumption.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química das microcistinas. Estrutura geral: Ciclo-(D-Ala ¹ -X ² -D-MeAsp ³ -Z ⁴ -Adda ⁵ -D-Glu ⁶ -Mdha ⁷). R ₁ , R ₂ : locais de possíveis metilações.....	20
Figura 2: Anatomia da ostra.....	23
Figura 3: Mapa evidenciando os municípios nos quais se realizaram as coletas.....	26
Figura 4: Criadouro de ostras em Lauro Sodré, Curu�a (I), Perer� de Fátima (II) e Alto Perer� de Fátima (III), São Caetano de Odivelas.....	27
Figura 5: Travesseiros de cultivo.....	28
Figura 6: Coletores artificiais de sementes.....	29
Figura 7: Ostras <i>Crassostrea sp.</i>	31
Figura 8: Fluxograma da pesquisa.....	31
Figura 9: Fluxograma do processo.....	33
Figura 10: Curva analítica obtida para o kit de ELISA utilizado na quantifica�o de saxitoxinas.....	39
Figura 11: Fotografias de gêneros de cianobactérias identificados por microscopia �tica. Escala de 10�m.....	41, 42
Figura 12: Morfotipo 1. Lauro Sodré, Curu�a-PA. Escala de 10�m.....	43
Figura 13: Morfotipo 2. Lauro Sodré, Curu�a-PA. Escala de 10�m.....	43
Figura 14: Morfotipo 1. São Caetano de Odivelas-PA. Escala de 10�m.....	44
Figura 15: Morfotipo 1. São Caetano de Odivelas-PA. Escala de 10�m.....	44
Figura 16: (II) Produto da amplifica�o para o gene 16S rRNA de cultura a partir de conchas de ostras. (I) Marcador 1Kb plus DNA <i>Ladder</i> (Promega) (fragmentos de 250bp a 10kb).....	44
Figura 17: Cromatograma dos padrões de microcistinas RR, YR e LR e respectivos tempos de reten�o.....	47
Figura 18: Cromatograma resultante da análise de HPLC para o extrato de ostra.....	47
Quadro 1: Características Gerais das Cianotoxinas.....	19
Quadro 2: Estrutura química geral de Saxitoxinas e exemplo de 12 variantes.....	22
Quadro 3: Amostragem de água para cada técnica de análise.....	30

Quadro 4: Características das sequências de maior similaridade com a sequência estudada.....	45, 46
--	--------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos da água, Lauro Sodré, Curuçá – PA; Pererú de Fátima e Alto Pererú de Fátima, São Caetano de Odivelas – PA. 2015.....	40
Tabela 2: Contagem de cianobactérias, Lauro Sodré, Curuçá – PA; Pererú de Fátima e Alto Pererú de Fátima, São Caetano de Odivelas – PA. 2015.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

DAD – *Diode Array Detector*

dcSTX - Decarbamoilsaxitoxina

DNA – *Ácido Desoxirribonucléico*

ELISA – *Enzima-Linked Imuno Sorbent Assay*

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FLD – *Fluorescence Detection*

GTX - Goniautoxina

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

ISO – *International Organization for Standardization*

LPS – *Lipopolissacarídeos*

MC-LA – *Microcistina-LA*

MC-LR – *Microcistina-LR*

MC-RR – *Microcistina-RR*

MC-YR – *Microcistina-YR*

NEO - Neosaxitoxina

OD – *Oxigênio Dissolvido*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pH – *Potencial de Hidrogênio*

PSP - *Paralytic Shellfish Poisons*

rRNA – *Ácido Ribonucléico ribossômico*

SPE – *Solid-Phase Extraction*

STD – *Sólidos Totais Dissolvidos*

STX - Saxitoxina

TDI - *Tolerância Diária Ingerida*

TDS - *Total de Sólidos Dissolvidos*

TFA – *Ácido Trifluoracético*

UV-VIS – *Ultravioleta visível*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	CYANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS.....	18
1.1.1	Microcistinas	20
1.1.2	Saxitoxinas	21
1.2	OSTRAS DE INTERESSE ALIMENTAR.....	22
1.3	OBJETIVOS.....	25
1.3.1	Geral	25
1.3.2	Específicos	25
2	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1	CAMPOS DE COLETAS E SISTEMA DE CULTIVO.....	26
2.2	AMOSTRAGEM.....	30
2.3	ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE CYANOBACTÉRIAS DA ÁGUA	32
2.4	ANÁLISE DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	32
2.5	ISOLAMENTO E CULTIVO DE CYANOBACTÉRIAS	33
2.6	IDENTIFICAÇÃO DE CYANOBACTÉRIAS POR BIOLOGIA MOLECULAR	33
2.7	ANÁLISE DE CIANOTOXINAS EM HPLC	36
2.7.1	Extração e Purificação das Toxinas	36
2.7.2	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (HPLC)	37
2.8	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DE SAXITOXINA	38
3	RESULTADOS	40
3.1	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CLOROFILA A	40
3.2	IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM DE CYANOBACTÉRIAS	41
3.2.1	Identificação Morfológica	41
3.2.2	Identificação por Biologia Molecular	44
3.2.3	Contagem de cianobactérias	46
3.3	ANÁLISE DE CIANOTOXINAS	46
4	DISCUSSÃO	48
4.1	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	48
4.2	IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM DE CYANOBACTÉRIAS	51
4.2.1	Identificação Morfológica	51
4.2.2	Identificação por Biologia Molecular	52

4.2.3	Contagem de cianobactérias	52
5	CONCLUSÃO.....	54
6	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Cianobactérias são componentes naturais do fitoplâncton, encontradas em ambientes marinhos, estuarinos e de água doce. Podem formar florações que atingem elevada biomassa, causando drástica redução nas concentrações de oxigênio, gerando a morte de muitos organismos aquáticos, e alterações na coloração e odor das águas. Quando as florações ocorrem na água utilizada para o abastecimento público, a potencial presença de toxinas (cianotoxinas) pode acarretar riscos à saúde pública (PANOSSO *et al.*, 2007).

As florações surgem principalmente devido ao processo de eutrofização que é o fenômeno caracterizado como aumento da concentração de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio, nos ecossistemas aquáticos (SIQUEIRA; OLIVEIRA-FILHO, 2005; BRANDÃO; DOMINGOS, 2006).

Nas últimas décadas o crescente processo de eutrofização tem causado um aumento na frequência de florações de cianobactérias em reservatórios de abastecimento público, lagos artificiais, lagoas salobras, rios e outros corpos d'água brasileiros. Em várias regiões brasileiras tem sido confirmada a ocorrência de florações tóxicas de cianobactérias em diversos corpos d'água, sendo o gênero *Microcystis* e a cianotoxina microcistina mais frequentemente identificados nessas florações (OLIVEIRA, 2003).

Embora o papel ecológico dessas toxinas no ambiente aquático permaneça sob debate, uma das hipóteses é que elas funcionem como defesa química contra a herbivoria, especialmente contra zooplâncton (FERRÃO-FILHO; KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011). Como parte do fitoplâncton de ecossistemas aquáticos, as cianobactérias participam das cadeias alimentares, sendo parte da dieta de zooplâncton e peixes herbívoros. Contudo, os efeitos da ingestão de células tóxicas dependem da espécie que os ingere, do tipo de toxina produzida e da concentração ingerida. (FERRÃO FILHO, 2009).

Alguns animais aquáticos como os moluscos aparentam ser tolerantes às toxinas de cianobactérias, acumulando-as em seus tecidos sem causar efeitos agudos (VASCONCELOS, 1999). Estudos que induzem a ingestão de cianobactérias tóxicas por moluscos revelam mínima ou nenhuma taxa de mortalidade, demonstrando a relativa imunidade destes bivalves que possuem um mecanismo natural que permite a depuração de diversas cianotoxinas: microcistinas (VASCONCELOS, 1995; AMORIM; VASCONCELOS, 1999; VASCONCELOS; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2007; FERNANDES, 2008), cilindrospermopsinas (SAKER *et al.*, 2004), saxitoxinas (PEREIRA *et al.*, 2004) e anatoxina-

a (OSSWALD *et al.*, 2008). Isto permite a transferência de toxinas ao longo da cadeia alimentar.

A ingestão de peixes e moluscos que tenham se alimentado continuamente de cianobactérias e acumulado as toxinas em seus tecidos gera a possibilidade de bioacumulação e transferência de cianotoxinas para o homem trazendo sérios riscos à sua saúde. Atualmente, a Organização Mundial de Saúde estabelece os valores aceitáveis para ingestão de microcistinas por meio de alimentos contaminados através da Tolerância Diária Ingerida (TDI) de 0,04 µg de microcistinas /kg de peso corporal (SIVONEN; JONES, 1999; CHEN *et al.*, 2009; WHO, 2011).

No Brasil não há legislação que estabeleça limites de ingestão de cianotoxinas através de alimentos contaminados e nem valores aceitáveis em alimentos, mas apenas para a água de abastecimento humano.

A Portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde recomenda o monitoramento de cianotoxinas na água para o consumo humano quando esta apresentar densidade de cianobactérias superior a 20.000 células/mL, ou quando apresentar gêneros tóxicos; e estabelece o valor máximo permitido de 1,0 µg.L⁻¹ de microcistinas ou cilindrospermopsinas e 3,0 µg.L⁻¹ de saxitoxinas na água potável (BRASIL, 2011).

Para águas destinadas à aquicultura a Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente estabelece como padrão de qualidade, dentre vários fatores, a densidade de cianobactérias de até 50.000 células /mL e a não verificação de efeito tóxico crônico a organismos, não citando especificamente cianotoxinas (BRASIL, 2005).

A aquicultura mundial vem se destacando e entre 2000 e 2013 a produção mais que duplicou. A China domina a participação dessa produção, mas os países emergentes se lançam em expandir a atividade com foco na diversificação e exportação de espécies localmente adaptadas (EMBRAPA, 2015).

Segundo a FAO (2016), em 2014 a produção mundial de moluscos foi de 16,1 milhões de toneladas, sendo que o Brasil aparece entre os 25 maiores produtores mundiais em aquíicultura com produção de 22,1 mil toneladas de moluscos.

Atualmente a ostreicultura (cultivo de ostras) ocupa a terceira colocação, juntamente com a mitilicultura (cultivo de mexilhões), com aproximadamente 5% da produção nacional, ficando atrás da piscicultura (cultivo de peixes), e carcinicultura (cultivo de camarão). No Brasil são cultivadas basicamente duas espécies de ostras: ostra do mangue - *Crassostrea rhizophorae* - espécie nativa e ostra-do-Pacífico - *Crassostrea gigas* - espécie exótica (BOSCARDIN, 2008).

No Pará a ostreicultura vem se destacando como um negócio viável para o desenvolvimento das comunidades de pescadores artesanais. A espécie encontrada é a *Crassostrea rhizophorae*, com ocorrência nos municípios de Maracanã, Augusto Corrêa, Salinópolis, Curuçá e São Caetano de Odivelas, os quais já possuem produtores organizados que desenvolvem a atividade. A ostra é comercializada com frequência nas comunidades produtoras, nas praias de Salinópolis, Mosqueiro, Outeiro e Bragança, e tem despertado interesse nos restaurantes da capital, Belém (SEPAq, 2015).

Ainda são escassos estudos sobre a contaminação (por cianotoxinas) de moluscos destinados ao consumo humano. Watanabe e colaboradores (1997) confirmaram a acumulação de microcistinas em mexilhões provenientes do lago Suwa no Japão, pois neste lago ocorrem florações de *Microcystis* todo ano. Este foi o primeiro estudo a relatar a acumulação de microcistinas em mexilhões de água doce coletados a partir de ambiente natural.

1.1 CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

Cianobactérias são organismos procarióticos que fazem parte do domínio Bacteria e são conhecidas por serem capazes de realizar fotossíntese oxigênica (OREN, 2014).

A captação da luz do sol para a realização da fotossíntese é feita através dos pigmentos clorofila *a* e ficobiliproteínas. As quantidades de clorofila e pigmentos acessórios também são responsáveis pela diversidade de cores destes organismos (NELSON; COX, 2002). Isto porque a clorofila é um pigmento verde, e as ficobiliproteínas são um conjunto de pigmentos de colorações diferentes: ficoeritrina de coloração rosa/vermelha, aloficocianina de coloração verde-azulada e ficocianina de coloração azul, sendo este último pigmento relativamente abundante (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Além da diversidade de cores, o grupo de cianobactérias é morfológicamente muito diverso, possuindo formas unicelulares (individuais ou agregadas), formas filamentosas (finas ou grossas, tricomas solitários ou em feixes, com ou sem bainha de mucilagem) e formas ramificadas. Também há formas que contêm células diferenciadas como acinetos e heterócitos (DÍEZ; ININBERGS, 2014).

As cianobactérias possuem características que tornam possível sua sobrevivência em diferentes habitats. A temperatura ótima de crescimento para a maioria é mais elevada do que para algas eucarióticas, incentivando assim o seu sucesso em climas mais quentes. A tolerância à dessecação e estresse hídrico é generalizada e as cianobactérias estão entre os organismos mais bem sucedidas em ambientes altamente salinos. A habilidade para formar vacúolos de gás em algumas espécies permite controlar a flutuabilidade celular, sendo uma vantagem quando a taxa de mistura vertical da coluna de água é relativamente baixa. A capacidade de diversas espécies para fixar Nitrogênio proporciona uma vantagem competitiva quando suas concentrações combinadas são baixas, ocorrendo dentro do heterócito. Muitas espécies de cianobactérias são abundantes em ambientes de alto valor de pH. (WHITTON; POTTS, 2012).

Outra característica importante das cianobactérias é a capacidade de produzir numerosos metabólitos secundários os quais não são essenciais para a sua sobrevivência, mas parecem oferecer alguma vantagem ecológica ou fisiológica para as mesmas, como as cianotoxinas que exibem atividade tóxica para uma gama de organismos eucarióticos inclusive o homem (WOODHOUSE; RAPADAS; NEILAN, 2014).

Considerando o ponto de vista toxicológico, as cianotoxinas são divididas em quatro classes: dermatotoxinas ou irritantes de contato, citotoxinas, hepatotoxinas e neurotoxinas

(PEARSON *et al.*, 2010). E de acordo com sua estrutura química elas são classificadas em três grupos: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos (SIVONEN; JONES, 1999) e são listadas no Quadro 1.

Grupo de Toxina	Órgãos alvo em mamíferos	Gêneros de Cianobactérias produtoras
<i>Peptídeos cíclicos</i>		
Microcistinas	Fígado	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Nostoc, Hapalosiphon, Anabaenopsis.</i>
Nodularina	Fígado	<i>Nodularia</i>
<i>Alcalóides</i>		
Anatoxina-a	Sinapses neurais	<i>Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon</i>
Anatoxina-a(S)	Sinapses neurais	<i>Anabaena</i>
Aplisiatoxinas	Pele	<i>Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix (Oscillatoria)</i>
Cilindrospermopsinas	Fígado, rim	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia</i>
Lingbiatoxina-a	Pele e trato gastrointestinal	<i>Lyngbya</i>
Saxitoxinas	Nervo axônico	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis</i>
<i>Lipopolissacarídeos (LPS)</i>	Irritante potencial; Efeitos em qualquer tecido exposto.	Todos

Quadro 1. Características Gerais das Cianotoxinas.

Fonte: SIVONEN; JONES, 1999, com modificações.

Dentre todas as cianotoxinas duas se destacam pela frequente ocorrência em florações causadas por cianobactérias e seu elevado potencial tóxico podendo ocasionar a morte: microcistina e saxitoxina.

1.1.1 Microcistinas

As microcistinas representam o grupo mundialmente associado a casos de intoxicações, pois a estrutura química dessas cianotoxinas (Figura 1) as tornam moléculas com elevada persistência na água, tolerância à temperaturas elevadas e resistência a oxidação, o que dificulta a sua remoção no tratamento convencional de água para consumo humano (MINILLO *et al.*, 2013).

Estas hepatotoxinas podem levar à morte por hemorragia intra-hepática. Também tem sido demonstrado que estas são potentes inibidores de enzimas fosfatases do tipo 1 e 2A de células eucariontes, sendo reconhecidas como potentes promotores de tumores hepáticos (BRASIL, 2003).

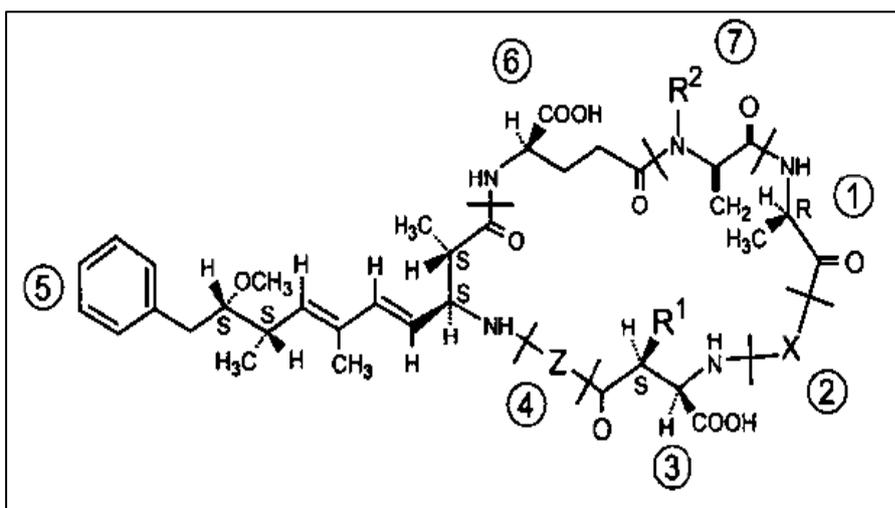


Figura 1. Estrutura química das microcistinas. Estrutura geral: Ciclo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷). R₁, R₂: locais de possíveis metilações.

Fonte: SIVONEN; JONES, 1999.

¹D-alanina;

²X: L-aminoácidos variáveis;

³2- metilamino -2-ácido dehidrobutírico;

⁴Z: L-aminoácidos variáveis;

⁵Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico;

⁶Ácido D-eritro-β-metilaspártico;

⁷N-metildehidroalanina.

Mais de 200 variantes estruturais de microcistinas foram identificadas devido a modificações no anel peptídico, das quais milhares são teoricamente possíveis. A nomenclatura de microcistinas individuais é realizada através da identificação de substituições

de aminoácidos nas posições 2 e 4 do anel peptídico (Figura 1) e utilizando as abreviaturas de uma letra para estes dois aminoácidos como um sufixo. Por exemplo, uma das microcistinas de maior ocorrência e mais tóxica é a microcistina-LR, a qual contém L-leucina (L) e L-arginina (R) nas posições 2 e 4 da estrutura cíclica, respectivamente (METCALF; CODD, 2014).

Para a detecção destas toxinas são utilizadas metodologias baseadas em biologia molecular como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), bioquímica como ELISA (*Enzima-Linked Immuno Sorbent Assay*) e, o mais comumente utilizado, o método físico-químico de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) acoplado a detector UV (ultravioleta) (MOREIRA *et al.*, 2014).

1.1.2 Saxitoxinas

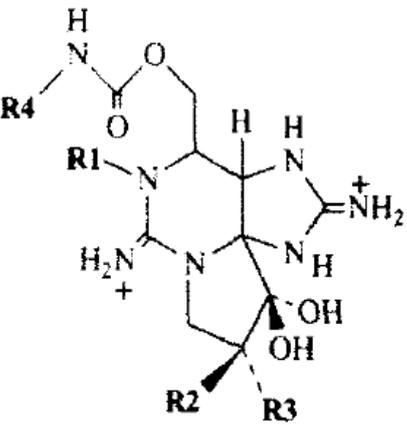
As saxitoxinas são também conhecidas como “toxinas paralisantes de mariscos” (do inglês: *Paralytic Shellfish Poisons - PSP*), tendo sido primeiramente isoladas em dinoflagelados marinhos. As saxitoxinas interferem na comunicação entre os neurônios e as células musculares inibindo a condução nervosa por bloqueio dos canais de sódio (SIVONEN; JONES, 1999).

Normalmente, os íons de sódio atravessam os canais de sódio nos neurônios a fim de que estes transmitam impulsos a outras células. As saxitoxinas bloqueiam os canais impedindo os íons de passar, conseqüentemente as células musculares não recebem estímulo e ficam paralisadas, e quando atingem os músculos respiratórios podem causar a morte por asfixia (CARMICHAEL, 1994).

As saxitoxinas compreendem um grupo com mais de 20 compostos estruturalmente relacionados (METCALF; CODD, 2014). Este grupo de alcalóides carbamatos podem ser não-sulfatados (saxitoxina, neosaxitoxina), com um único grupamento sulfatado (goniautoxina), ou com dois sulfatos (C-toxina) (Quadro 2). Variantes decarbamoil também tem sido identificadas (SIVONEN; JONES, 1999).

O aparecimento de novos grupos de toxina e novos análogos de toxina dentro de um grupo parece ter se intensificado nas últimas décadas. No entanto, os avanços nas técnicas de detecção e identificação podem ter influenciado este aumento aparente. Aliás, a necessidade de lidar com diferentes tipos de amostras (frutos do mar, microalgas e água) gera métodos inovadores na detecção de toxina focados na produção de detecção rápida e sensível. Os métodos oficiais de detecção para saxitoxinas são o método de cromatografia líquida de alta

eficiência HPLC com detector FLD (fluorescência) e o ensaio imunoenzimático ELISA (VILARIÑO *et al.*, 2013).

	SUBSTITUENTES				TOXINAS
	R1	R2	R3	R4	
	H	H	H	H	Saxitoxina (STX)
	H	H	H	SO ₃	B1
	H	H	OSO ₃	H	Goniautoxina 2 (GTX 2)
	H	H	OSO ₃	SO ₃	C1
	H	OSO ₃	H	H	Goniautoxina 3 (GTX 3)
	H	OSO ₃	H	SO ₃	C2
	OH	H	H	H	Neosaxitoxina (NEO)
	OH	H	H	SO ₃	B2
	OH	H	OSO ₃	H	Goniautoxina 1 (GTX 1)
	OH	H	OSO ₃	SO ₃	C3
	OH	OSO ₃	H	H	Goniautoxina 4 (GTX 4)
	OH	OSO ₃	H	SO ₃	C4

Quadro 2. Estrutura química geral de Saxitoxinas e exemplo de 12 variantes.

Fonte: LAWRENCE; SCOTT, 1993, com modificações.

1.2 OSTRAS DE INTERESSE ALIMENTAR

Ostras são moluscos bivalves pertencentes à família Ostreidae (RIOS, 1994) a qual faz parte da classe Bivalvia, anteriormente chamada de Pelecypoda, do filo Mollusca que inclui outros moluscos comuns como mexilhões. Esses bivalves são comumente chamados de “mariscos” e possuem uma característica exclusiva: uma concha formada por duas peças (ou valvas) caucárias, articulada dorsalmente e que envolve todo corpo (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Sua anatomia é descrita na Figura 2.

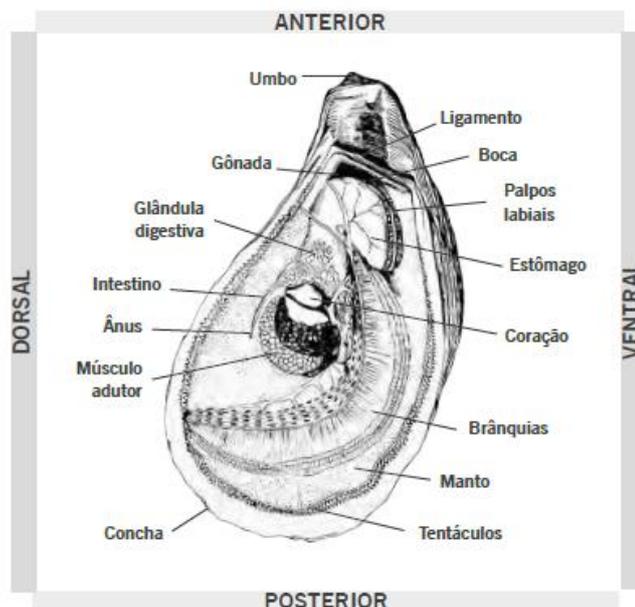


Figura 2. Anatomia da ostra.

Fonte: SEBRAE, 2015.

Dentre as espécies de ostras produzidas, somente três são consideradas importantes do ponto de vista alimentar e viáveis para o cultivo no Brasil: a ostra japonesa *Crassostrea gigas*, a ostra brasileira *Crassostrea brasiliana* e a ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* (PORTELLA, 2005). Segundo Wakamatsu (1973), a ostra é considerada um organismo com alto valor nutritivo devido ao teor de minerais (fósforo, cálcio, ferro e iodo), glicogênio, vitaminas (A, B1, B2, C e D) e proteínas.

As espécies do gênero *Crassostrea* são consideradas eurialinas, euritérmicas e são adaptadas ao ambiente estuarino. As ostras desse gênero possuem uma câmara promial no lado direito do corpo que inverte o fluxo da água exalante, sendo considerada como uma adaptação a ambientes de alta turbidez (SIQUEIRA, 2008).

Partículas em suspensão na água são ingeridas como alimento e provêm de um fluxo de água, que passa através da cavidade do manto, pelas brânquias ciliadas alargadas e pregueadas que funcionam como um filtro, concentrando partículas orgânicas, microalgas e organismos planctônicos (DUÉ, 2010)

As partículas ingeridas podem ser rejeitadas, refluídas pela parte posterior direita das brânquias (na forma de pseudofeces) ou filtradas nas brânquias. Pela ação dos cílios branquiais, estas são conduzidas aos palpos labiais, onde são selecionadas de acordo com o seu tamanho e levadas à boca, digeridas no estômago e absorvidas no intestino, sendo o material rejeitado (fezes) expulso pelo ânus (LENZ, 2008).

As ostras são animais hermafroditas sequenciais, isto é, em um mesmo indivíduo, um período de sua vida pode ser do sexo masculino e depois do sexo feminino. E sua reprodução ocorre a partir da fecundação, com o desenvolvimento embrionário; algumas horas após, forma-se uma larva com o formato “D” chamada véliger ou larva D. Esta passa aproximadamente 15 a 20 dias ao sabor das correntes marinhas. Ao final deste período, as larvas sofrem modificações morfológicas, fixando-se geralmente em uma rocha ou raiz de mangue e, assim que encontram o local ideal, sofrem uma metamorfose e passam a ser chamadas de sementes, ou juvenis, assumindo a forma de um adulto e fixando-se permanentemente ao substrato, onde crescem até atingirem o tamanho comercial (HOSHINO, 2009).

Os moluscos, e em especial os mexilhões (*Mytilus spp*), são organismos comumente utilizados em estudos de poluição aquática, por apresentarem enormes vantagens em relação a outros invertebrados, pois eles têm uma distribuição geográfica ubíqua, são organismos sésseis e filtradores, acumulam rapidamente contaminantes químicos (pesticidas, hidrocarbonetos, metais, toxinas) nos seus órgãos com transformações metabólicas mínimas, refletindo, por isso, de uma forma realista os níveis de contaminação ambiental. Além disso, são consumidos por populações humanas, fato que os torna também alvo de programas de monitorização por parte de instituições ligadas à vigilância sanitária, de modo a evitar situações que ponham em risco a Saúde Humana (VASCONCELOS, 1995).

Apesar de a legislação brasileira estabelecer limites de cianotoxinas para a água destinada ao consumo humano, ainda não tem limites estabelecidos para a água destinada a aquicultura, mas apenas limite de número de células de cianobactérias. Este limite se faz necessário porque além da possibilidade de contaminação humana através da água de abastecimento, há também o risco de contaminação através do consumo de peixes e moluscos provindos de águas contaminadas.

A investigação da presença de toxinas produzidas por cianobactérias é de fundamental importância, pois a contaminação em locais de cultivo de ostras pode trazer riscos tanto para os consumidores locais quanto para a exportação. Por isso, alguns locais de cultivo no Pará devem ser monitorados. Tendo em vista os cultivos de Pererú de Fátima em São Caetano de Odivelas e Lauro Sodré em Curuçá, onde ocorre a reprodução e engorda de ostras e a captação de sementes, além de ser o fornecedor para os outros cultivos paraenses, do Maranhão e Ceará, se faz necessário seu acompanhamento.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Geral

Verificar a ocorrência de cianotoxinas em águas de cultivo e no tecido de ostras destinadas ao consumo humano.

1.3.2 Específicos

- Identificar e quantificar as cianobactérias presentes nas amostras de água dos lugares de coleta;
- Isolar e cultivar cianobactérias presente nas conchas das ostras;
- Detectar e quantificar, quando presentes, cianotoxinas das culturas de cianobactérias a partir das conchas das ostras através de ensaio imunoenzimático (ELISA);
- Verificar e quantificar, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a presença de microcistina e saxitoxina nos extratos das ostras e nas amostras de água coletadas dos locais de cultivo;

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CAMPOS DE COLETAS E SISTEMA DE CULTIVO

Foram realizadas duas coletas em dois municípios do Nordeste do Pará (Figura 3). A primeira coleta foi realizada em setembro de 2015 no cultivo da comunidade Lauro Sodré, no município de Curuçá, com coordenadas geográficas de latitude $00^{\circ} 51' 16,5'' S$ e longitude $047^{\circ} 53' 28,2'' W$ (Figura 4-I). E a segunda coleta foi realizada em novembro de 2015 no município de São Caetano de Odivelas, em dois pontos de cultivo: Pererú de Fátima com coordenadas geográficas de latitude $00^{\circ} 42' 08,9'' S$ e longitude $048^{\circ} 02' 22,8'' W$ (Figura 4-II), e Alto Pererú com coordenadas geográficas de latitude $00^{\circ} 42' 10,3'' S$ e longitude $048^{\circ} 02' 33,2'' W$ (Figura 4-III).

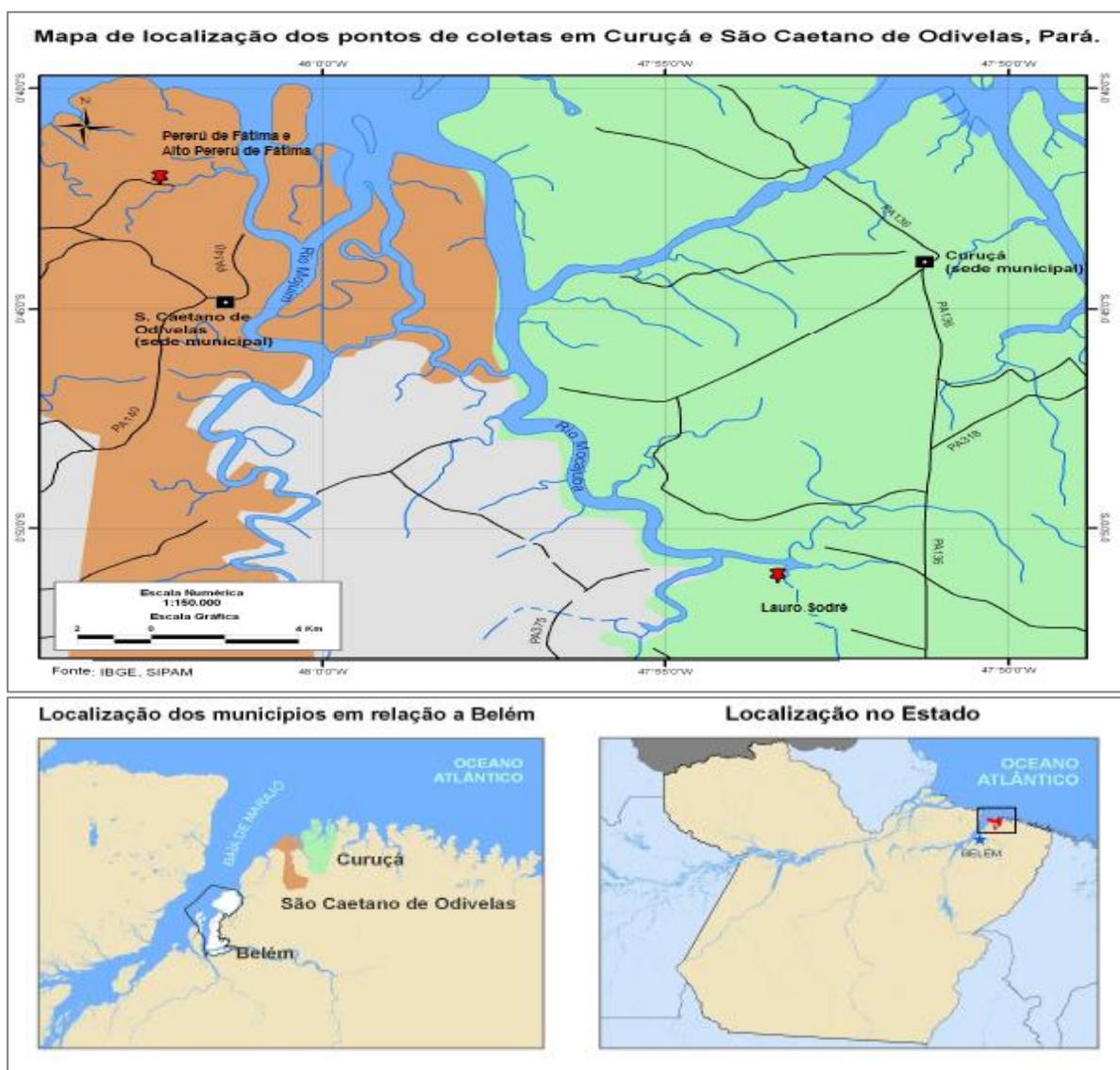


Figura 3 – Mapa evidenciando os municípios nos quais se realizaram as coletas. Fonte: IBGE.

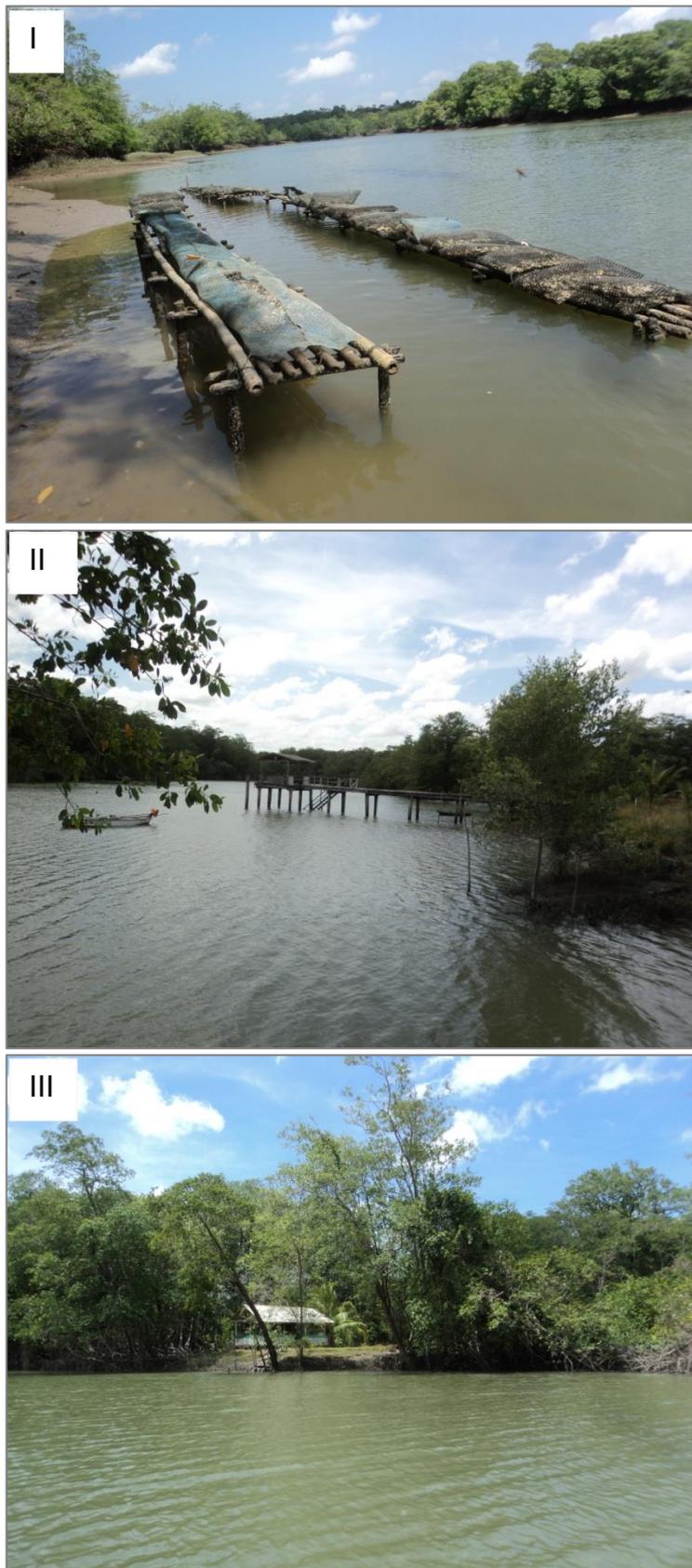


Figura 4 – Criadouro de ostras em Lauro Sodré, Curuçá (I), Pererú de Fátima (II) e Alto Pererú de Fátima (III), São Caetano de Odivelas.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Os dois municípios pertencem à costa de reentrâncias Pará/Maranhão, caracterizando-se por um clima quente, com temperaturas médias mensais acima de 25°C. As marés na região possuem grande amplitude (>4 metros), que geram fortes correntes de enchente e vazante, produzindo muito material em suspensão e gerando um aspecto de turbidez nas águas. A região caracteriza-se também pela presença de manguezais e é rica em moluscos e crustáceos (KIYATAKE, 2011).

O sistema de cultivo utilizado nestes locais é o suspenso fixo, o qual consiste em mesas ou jirais (Figura 4-I) geralmente construídos em madeira, bambus ou qualquer outro material com característica de haste. Esse sistema permite explorar as áreas de variação de maré, sendo indicados para profundidades de até 1,5m. Nas mesas algumas peças são fixas ao substrato, sustentando outras que são mantidas em posição paralela à superfície ou à linha d'água; nestas peças são presos os apetrechos de cultivo onde são colocadas as ostras (HOSHINO, 2009).

As estruturas nas quais as ostras são colocadas para engorda são confeccionadas em telas plásticas ou PVC de diversos tamanhos, geralmente retangulares, medindo 1m x 0,50m e são chamados de travesseiros por que apresentam o formato de um travesseiro. Estes apresentam classificação por tamanho de malha, sendo: berçário (malha de 2mm a 5mm), intermediário (malha de 10mm a 15mm) e final (malha de 20mm a 25mm) (Figura 5) (HOSHINO, 2009).



Figura 5 – Travesseiros de cultivo.

Fonte: HOSHINO, 2009.

A produção de sementes é feita artificialmente utilizando coletores de plástico (Figura 6), após as sementes obterem tamanho adequado (entre 5mm e 10mm) elas são retiradas manualmente dos coletores e realiza-se uma triagem, separando-as por tamanho, para depois transferi-las para as estruturas de cultivo, em densidades específicas para cada material utilizado. Para acompanhar o desenvolvimento das ostras, faz-se necessária a realização de medidas de biometrias mensais, obtendo-se, principalmente dados de altura e largura dos indivíduos para determinar o melhor período de cultivo, bem como a realização de triagens para separação por tamanhos (HOSHINO, 2009).



Figura 6 – Coletores artificiais de sementes.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

A periodicidade de manutenção do cultivo é determinada pela quantidade de incrustantes e predadores nos apetrechos de cultivo, geralmente é sugerido o período quinzenal. A manutenção pode ser realizada manualmente ou mecanizada, sendo que a limpeza manual consiste em retirar as estruturas de acondicionamento das ostras do cultivo e realizar a limpeza manual dos organismos incrustantes, e a limpeza mecanizada é feita por meio de uma moto-bomba, na qual as estruturas de cultivo e as ostras são lavadas por meio de jatos d'água em alta pressão. Também é utilizada a aplicação da técnica do castigo, que consiste em deixar as estruturas fora da água por um período necessário para a eliminação de incrustantes e predadores (HOSHINO, 2009).

2.2 AMOSTRAGEM

A amostragem de água (Quadro 3) foi realizada em três níveis de profundidade determinados com o auxílio de Disco de Secchi, sendo o extrato A igual ao valor da transparência (em cm) da água, o extrato B igual a 1,5x o valor da transparência e o extrato C igual a 2x o valor da transparência. Estes níveis de profundidade estão distribuídos na zona eufótica - cuja extensão é calculada multiplicando-se o valor da transparência pelo fator 3,0 - pois é nesta que se concentram os microrganismos fotossintetizantes como as cianobactérias (BRASIL, 2013).

Técnica	Volume (mL) da amostra no Extrato A	Volume (mL) da amostra no Extrato B	Volume (mL) da amostra no Extrato C
Conservação em Formol	400	-	-
Conservação em Lugol	200	200	200
Quantificação de clorofila <i>a</i>	200	200	200
Análise físico-química	1.000	1.000	1.000
Pesquisa de cianotoxinas	1.000	1.000	1.000

Quadro 2. Amostragem de água para cada técnica de análise.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Parâmetros físico-químicos como Temperatura, Oxigênio Dissolvido (OD), Condutividade, Total de Sólidos Dissolvidos (TDS), Salinidade e pH foram medidos no local com sonda multiparamétrica YSI *Professional Plus*.

Também foram coletadas no mínimo 20 ostras (*Crassostrea sp.*) de tamanho comercializável ($\geq 60\text{mm}$) (Figura 7) em cada ponto de coleta, aleatoriamente. As ostras foram tiradas de suas conchas, trituradas, liofilizadas e conservadas em dessecador com sílica até

posterior extração de metabólitos e análise de cianotoxinas. Algumas conchas foram selecionadas para posterior inoculação em meio de cultivo para cianobactérias.



Figura 7 – Ostras *Crassostrea sp.*

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

A metodologia aplicada foi a mesma para todos os pontos de coleta e está esquematizada na Figura 8.

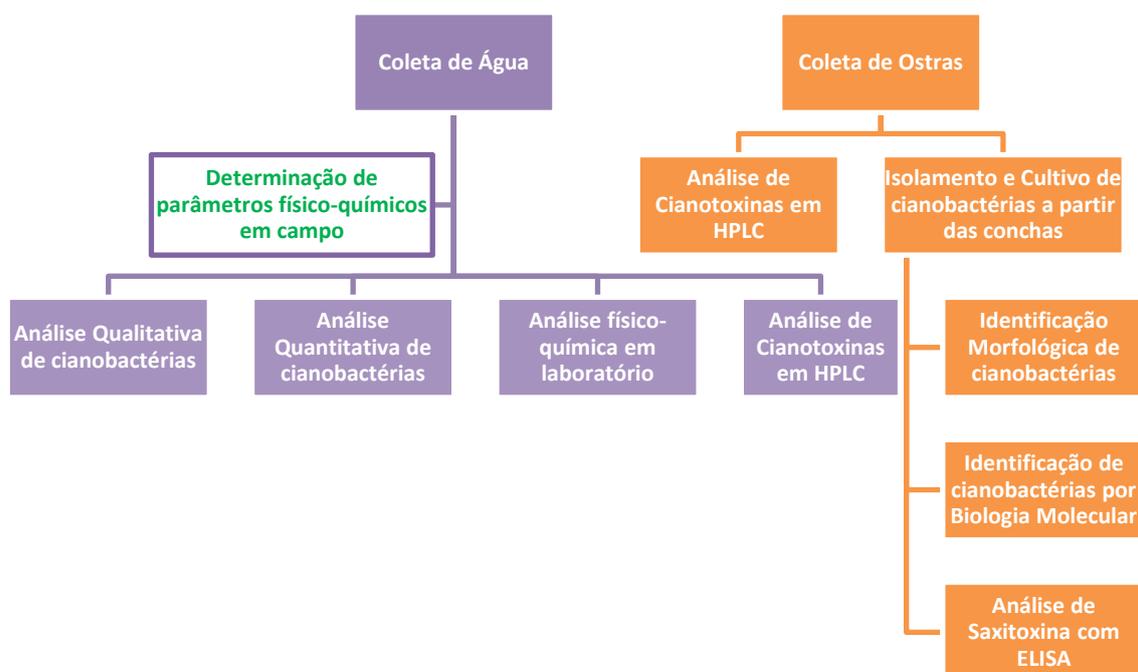


Figura 8. Fluxograma da pesquisa.

Fonte: Elaborado pela autora (2016).

2.3 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE CIANOBACTÉRIAS DA ÁGUA

A análise qualitativa foi realizada a partir de 400 mL de água preservada em formol 4%, sendo 200 mL com auxílio de rede de plâncton de 20 μm e 200 mL com auxílio de rede de plâncton de 64 μm . Foram preparadas 20 lâminas para análise em microscópio óptico (*Nikon Eclipse E200*), e a identificação foi realizada em nível de gênero a partir de características morfológicas de acordo com o sistema de classificação taxonômica de Komárek & Anagnostidis (1999) para a ordem Chroococcales, Komárek & Anagnostidis (2005) para a ordem Oscillatoriales e Komárek (2013) para a ordem Nostocales. Também foi utilizado o artigo de Vaz e colaboradores (2015) para a comparação com espécies/ gêneros novos identificados no Brasil.

Para a análise quantitativa foram transferidas alíquotas de 10 mL das amostras fixadas em lugol para câmaras de sedimentação conforme a técnica de Uthermöhl (1958) para contagem de células de cianobactérias, estas permaneceram sedimentando por 24h. Após o tempo de sedimentação as contagens de cianobactérias foram realizadas em microscópio invertido *Nikon Eclipse TS100*. Na ausência de células de cianobactérias na amostra, foram contados até 100 indivíduos da espécie de microalga dominante, permitindo trabalhar com um valor aceitável de erro de até 20% e intervalo de confiança de 95% (LUND; KIPLING; LE CREN, 1958).

A fim de estimar a biomassa fitoplanctônica foram filtrados separadamente 200 mL de água de cada extrato em pré-filtro de fibra de vidro (porosidade 0,47 μm) à vácuo, o filtrado foi descartado e os filtros foram colocados em tubos cônicos com 10 mL de acetona 90%. Centrifugou-se a 3.000 rpm por 10 minutos e recuperou-se o sobrenadante. A absorbância foi detectada no comprimento de onda para quantificação de clorofila *a* em Espectrofotômetro. Os respectivos valores foram convertidos em $\mu\text{g.L}^{-1}$ de clorofila *a*.

2.4 ANÁLISE DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Também foi coletado 1L de água para análise físico-química posterior em laboratório dos seguintes parâmetros: Turbidez, Nitrito, Nitrato, Nitrogênio Amoniacal e Fósforo Total. A variável turbidez foi determinada por Espectrofotometria de UV-VIS, utilizando o

equipamento DR 2400 da HACH. Para análises das concentrações de nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal e fósforo total as amostras foram filtradas com MILLIPORE® (0,45µm) e em seguida determinadas por Sistema de Cromatografia de Íons modelo ICS DUAL 2000 DIONEX, USA.

2.5 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CIANOBACTÉRIAS

As conchas das ostras foram colocadas em Beckers contendo 500 mL de meio BG-11 (ALLEN, 1968) suplementado com 10 g/L de NaCl e 1 g/L de MgCl₂, à 25°C, com foto período natural de aproximadamente 12/12h. As cianobactérias crescidas nas conchas das ostras foram isoladas partir de um filamento obtido por visualização no microscópio, capturado com pipeta Pasteur, inoculado em 2 mL de meio BG-11 e submetido a intervalo de 12/12h de luz/escuro.

2.6 IDENTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS POR BIOLOGIA MOLECULAR

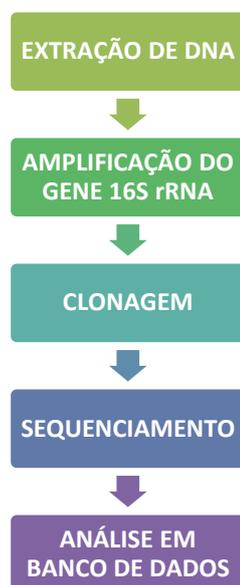


Figura 9. Fluxograma do processo.

Fonte: Elaborado pela autora (2016).

Para a extração de DNA genômico de cianobactérias foi retirada uma alíquota de 1,5 mL de cultura na fase exponencial de crescimento. Mas antes de iniciar a extração foi necessário realizar procedimento de lavagem, a fim de separar as células de cianobactérias

dos microorganismos heterotróficos, assim como eliminar grande quantidade da bainha de mucilagem. Esta consistiu na sonicação da cultura em banho-maria por 20 minutos, seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos. Após isso, o sobrenadante foi descartado e adicionado aos tubos 1,5 mL de Solução SDS 4%. A amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 10.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1,5 mL de NaCl 0,85%, em seguida foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 7.000 rpm por 2 minutos e foi repetido mais duas vezes.

A extração de DNA de cianobactérias foi realizada usando-se os protocolos de Singh e colaboradores (2011) e de Healey e colaboradores (2014), com modificações. Às células lavadas adicionou-se 400 µL de tampão de lise (Ureia 4M; Tris-HCL 0,2 M, pH 7.4; NaCl, 20mM e EDTA 0,2M), pré-aquecido à 55°C, e 50 µL de proteinase K (solução estoque de 20 mg/mL), misturando imediatamente por pipetagem. Incubou-se *overnight* à 55°C em banho seco com agitação à 400 rpm. Posteriormente, os tubos foram agitados em vortex e incubados por mais 30 minutos. Depois adicionou-se 1 mL de tampão de extração de DNA (CTAB 3%; NaCl 1,4M; EDTA 20nM; Tris-HCL 0,1M, pH 8.0; Sarkosyl 1% e Mercaptoetanol 1%) pré-aquecido à 55°C, misturou-se gentilmente por inversão e incubou-se por mais 1 hora, misturando-se cada tubo por inversão (4-5 vezes) a cada 10 minutos.

A seguir, cada tubo foi dividido em duas frações em tubos de 2 mL e a cada tubo foi adicionado 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v), misturou-se vigorosamente os tubos até a aparição de uma emulsão branca, em seguida centrifugou-se à 10.000 rpm por 1 minuto e recuperou-se delicadamente a fase aquosa superior para novos tubos. Adicionou-se a cada tubo 5 µL de RNase (solução estoque de 10 mg/mL) e incubou-se à 37°C durante 30 minutos.

Depois repetiu-se a adição do volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) e os demais passos até a recuperação da fase aquosa superior para novos tubos, então adicionou-se 0,1 volume de tampão acetato de sódio (3M, pH 5.2) e 2 volumes de etanol absoluto pré-refrigerado à -20°C, agitou-se gentilmente e os tubos foram incubados à -20°C por 1 hora.

Os tubos foram centrifugados à 13000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado, adicionou-se a cada tubo 500 µL de etanol 70% pré-refrigerado à -20°C e misturou-se por inversão (3 vezes), centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante. Depois deixou-se o etanol residual evaporar e os *pellets* secos foram eluídos em 30µL de água ultra pura. Finalmente o DNA genômico de cada amostra (duas frações) foi colocado em um único tubo.

A integridade do DNA genômico foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, foi amplificado um fragmento de 1534 pb do gene 16S rRNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores 27F1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1494Rc (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3') (NEILAN et al., 1997).

Nas reações de PCR foram utilizados 2,5 µL de tampão de reação 10x, 0,75 µL de MgCl₂ 50mM, 2,5 µL de cada iniciador 5µM, 0,5µL de mix de dNTPs 10mM, 0,1µL de *Taq* DNA polimerase 5U/µL (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) e 1 µL de DNA para um volume final de 25 µL. O programa seguiu as seguintes condições em equipamento termociclador *GeneAmp Thermal Cycler 9700* (Applied Biosystems™ (ABI), Thermo Fisher Scientific Inc., USA): desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 55°C por 30 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto e 30 segundos, e extensão final a 72°C por 2 minutos. A confirmação da amplificação por PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Em seguida, os produtos de PCR foram clonados utilizando o pCR™ 2.1 - TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) de acordo com protocolo do fabricante. A reação de ligação foi realizada com 1µL de água livre de nucleases, 1µL da PCR fresca, 0,5 µL de *salt solution* e 0,5µL do vetor, e ficou incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a ligação foi diluída em 10 µL de água livre de nucleases e utilizado 2 µL e adicionado a 50 µL de suspensão de células competentes de *Escherichia coli* TOP 10 e eletroporado a 1800V. Depois, foi adicionado 250 µL de meio SOC (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), e incubado a 37°C por 60 minutos, sob agitação. Após esse período, 100 µL da suspensão de células transformadas foi semeada em meio LB sólido com ampicilina e X-Gal, ambos em concentrações finais de 100µg/mL de meio de cultura, e as placas foram incubadas por no mínimo 16 horas a 37°C.

Em seguida, foram coletados 16 clones e crescidos em 100 µL de meio Tartoff-Hoobs (HIMEDIA, Índia) em placa de 96 poços e incubada a 37°C durante 6 horas. Após isso, os clones foram preservados em glicerol 50% e armazenados a -20°C. Para verificar a presença dos amplicons foi realizada PCR de colônia nas seguintes concentrações: 0,5 µL dos clones glicerolizados adicionada a 24,5 µL de reação de PCR (conforme descrito anteriormente), usando os iniciadores M13 F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e M13 R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). As condições de amplificações foram: 95°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 7 minutos.

Após a confirmação da presença dos amplicons, os clones foram submetidos ao processo de extração dos fragmentos de DNA através de miniprecipitação por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Os amplicons extraídos foram submetidos à reação de sequenciamento com o auxílio do kit DYEnamic™ ET DyeTerminator (GE Health Care, EUA), segundo instruções do fabricante, para sequenciar o filamento direto e inverso usando os iniciadores M13F e M13R específico do vetor de clonagem M13. As sequências foram determinadas em sequenciador automático 3730 DNA *Analyzer* (Applied Biosystems, EUA). As sequências do fragmento de 16S rRNA foram alinhadas e corrigidas com o *software* SeqMan Pro (<http://www.dnastar.com/t-seqmanpro.aspx>). A identidade da sequência foi confirmada no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

2.7 ANÁLISE DE CIANOTOXINAS EM HPLC

2.7.1 Extração e Purificação das Toxinas

Para a extração de microcistinas da água, dos filtros e das ostras utilizou-se como referência a ISO 20179: 2005 (2005). As amostras de água foram filtradas através de pré-filtros de fibra de vidro com o auxílio de bomba a vácuo. Os filtros foram congelados a -20°C para posterior extração de metabólitos e na água filtrada foi adicionado 5 mL de metanol 100% por litro e injetada em cartuchos C18 do extrator automático *AutoTrace 280* (Dionex). Após passagem pelo extrator as frações foram coletadas e centrifugados à vácuo a 1.300 rpm à 40°C até que estivessem completamente secos, depois foram ressuspensos em 1mL de metanol 20%, sonicados em banho à 40°C por 10 minutos e em seguida filtrados em filtros de Nylon (0,45 µm) para posterior injeção em HPLC.

Os filtros foram imersos em 10 mL de metanol 75% e ultrassonicados em gelo, em seguida centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos, os sobrenadantes foram recuperados e os *pellets* reextraídos. Os extratos foram centrifugados à vácuo a 1.300 rpm à 40°C até que estivessem completamente secos, depois foram ressuspensos em 1mL de metanol 20%, sonicados em banho à 40°C por 10 minutos e em seguida filtrados em filtros de Nylon (0,45 µm) para posterior injeção em HPLC.

A extração de saxitoxinas da água foi realizada da mesma forma que a extração de microcistinas descrita anteriormente. Mas a extração dos filtros foi feita conforme protocolo de Silvino (2014). Os filtros foram colocados em tubos tipo Falcon com cerca de 10 mL de

HCl 0,1M, em seguida foram levados ao ultrassonicador em gelo por 5 minutos a uma potência de 60Hz. Depois centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi recuperado e filtrado à vácuo com pré-filtro de fibra de vidro (0,47 µm). Em seguida realizou-se a Extração em Fase Sólida (SPE): 1mL de extrato foi percolado em cartucho C18 (Bond Elut®) condicionado (com 6 mL de metanol 100% seguido de 6 mL de água deionizada) e o filtrado descartado, depois a toxina foi eluída com água deionizada e aparada em tubos de vidro para centrifuga.

Para a extração de microcistinas as ostras liofilizadas foram misturadas com metanol 75%, sendo 18 mL de solvente / g de material seco, e sonicadas em gelo durante 2 minutos, em seguida as soluções foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos, 1mL do sobrenadante foi recuperado e os *pellets* reextraídos. Os extratos foram centrifugados à vácuo a 1.300 rpm à 40°C até que estivessem completamente secos, depois foram ressuspensos em 500 µL de metanol 20%, sonicados em banho à 40°C por 5 minutos e em seguida submetidos a extração em fase sólida (SPE): o extrato foi percolado em cartucho C18 (Bond Elut®) condicionado (ativado com 4 mL de metanol 100% seguido de lavagem com 4 mL de água), em seguida 4 mL de metanol 20% foi aplicado ao cartucho e descartado, então a toxina foi eluída e coletada utilizando 1mL de metanol 90% + 0,1% de TFA. Os extratos foram novamente centrifugados à vácuo a 1.300 rpm à 40°C até que estivessem completamente secos, depois foram ressuspensos em 1mL de metanol 20%, sonicados em banho à 40°C por 5 minutos e em seguida injetados em HPLC.

A extração de saxitoxinas nas ostras iniciou-se seguindo o protocolo de Astudillo, Chang-Yen e Barbera-Sánchez (2002). As ostras liofilizadas foram maceradas e misturadas a HCl 0,1M, sendo 10 g para 100 mL de HCl, em Becker de vidro fervidas por 5 minutos, resfriadas em gelo e centrifugada a 4.000 rpm por 12 minutos. A partir do sobrenadante foi iniciada Extração em Fase Sólida (SPE) conforme Vale e Taleb (2005) e os extratos foram conservados a -20°C até preparo para aplicação em HPLC.

2.7.2 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (HPLC)

A análise de microcistinas foram realizadas utilizando uma coluna C18 de cromatografia líquida de fase reversa (250mm x 10mm, 5µm) à temperatura de 40°C em condições isocráticas com fase móvel A 85% (Acetonitrila/TFA 0,05%) e fase móvel B (Água/ TFA 0,05%), com um fluxo de 0,3 mL/minuto, um volume de injeção de 20 µL e um

tempo de corrida de 30 minutos. Utilizou-se um detector de arranjo de diodos (DAD – *Diode Array Detector*) operando a 238nm. Os espectros UV foram comparados com padrões de microcistinas comerciais: MC-LA, MC-LR, MC-RR e MC-YR (Sigma-Aldrich).

Antes de serem injetados no HPLC, os extratos de saxitoxinas foram submetidos ao procedimento chamado Derivatização Pré-Coluna (Oxidação com Peróxido) (LAWRENCE; NIEDZWIADK, 2001) através do qual é realizada a oxidação das toxinas antes de passarem pela coluna cromatográfica para a detecção das mesmas por fluorescência. Este procedimento foi realizado conforme descrito por Turrell, Lacaze e Stobo (2006) e uma alíquota de 25 µL foi analisada em HPLC.

A análise de saxitoxinas foi realizada utilizando uma coluna C18 de cromatografia líquida de fase reversa (4,6mm x 150mm, 5µm) à temperatura de 30°C. As fases móveis (A e B), consistiram em (A) formiato de amônio 0.1M (pH ajustado a $6 \pm 0,1$ com ácido acético 0,1M) e (B) formiato de amônio 0.05 M (pH ajustado a $6 \pm 0,1$ com ácido acético 0,1M) com 5 % de acetonitrila, tendo como gradiente de eluição inicialmente 100 % da fase móvel A, mudando nos primeiros 7.5 minutos de 0 a 20 % da fase móvel B, passando posteriormente, nos 3.5 minutos seguintes, de 20 a 80 % da fase móvel B e terminando nos 2 últimos minutos em 100 % da fase móvel A com uma taxa de fluxo de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. e um tempo de corrida de 14 minutos. O volume de injeção foi de 25 µL. Foi utilizado um Detector de Fluorescência ajustado para os comprimentos de onda de 340nm em excitação e 395 nm em emissão. Os espectros foram comparados com padrões de saxitoxinas comerciais: dc-Sxt-b; GTX 2,3; GTX 5; e Stx-f (Sigma-Aldrich).

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas utilizando um cromatógrafo *Dionex* modelo *Ultimate 3000*.

2.8 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DE SAXITOXINA

As culturas foram submetidas a preparação para ensaio de ELISA quando estas se encontravam na fase de crescimento logarítmico, pois é nesta fase que ocorre a maior produção da toxina (VASCONCELOS, 2015).

Alíquotas de 2 mL de cada cultura foram congeladas a -20°C . Em seguida foram sonicadas, na potência máxima (60 Hz) durante 30 segundos (em gelo), utilizando uma sonda de ultrasons *Sonopuls HD 2200* (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE). Em seguida os extratos foram filtrados por filtros de seringa PVDF hidrofóbico (Analítica) 0.45

µm. Até realização dos testes de ELISA as amostras foram acondicionadas no congelador a -20°C.

A detecção de saxitoxinas por ELISA foi feita apenas para amostras de cultura de cianobactérias, recorrendo ao kit comercial *Saxitoxin Plate Kit* (BEACON Analytical Systems Inc., Saco, ME). O procedimento do ensaio foi efetuado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

A reação após um tempo específico foi parada e a cor avaliada por espectrofotometria a 450 nm.

A calibração deste teste foi feita com base em um controle negativo (0,0ppb de saxitoxina) e 3 concentrações de saxitoxina padrão de 0,02ppb, 0,08ppb e 0,32ppb. A análise dos resultados foi feita recorrendo ao uso do Microsoft® Office Excel, realizando os cálculos fornecidos pelo fabricante. A concentração das amostras foi determinada recorrendo à construção de uma curva de calibração.

Na Figura 10 encontra-se a curva de calibração obtida para a saxitoxina a qual apresentou coeficiente de determinação superior ao recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial os quais recomendam um coeficiente (R) igual ou superior a 0,9931 (BRASIL, 2003) e um valor acima de 0,9032 (INMETRO, 2011), respectivamente, demonstrando que a resposta do método foi linear nos intervalos de concentração empregados neste estudo.

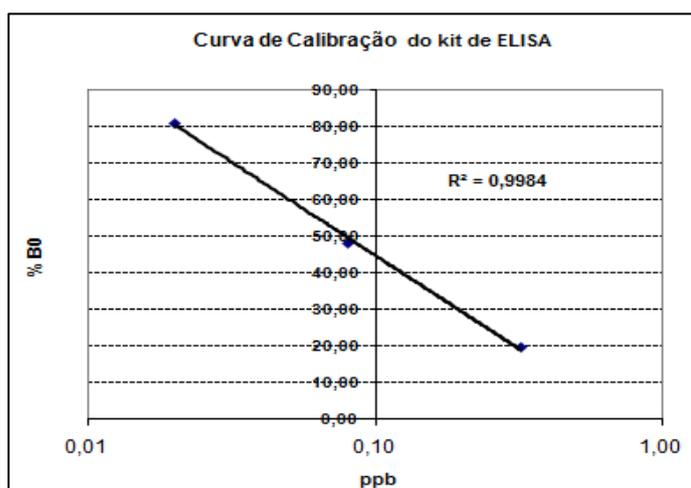


Figura 10. Curva analítica obtida para o kit de ELISA utilizado na quantificação de saxitoxinas.

Fonte: Elaborada pela autora. (2016)

3 RESULTADOS

No corpo d'água de Lauro Sodré a medida de Transparência obtida com Disco de Secchi na preia-mar foi de 60 cm que equivale ao extrato A, o extrato B foi de 90 cm, o extrato C 120 cm e a extensão da zona eufótica foi de 180 cm. Semelhantemente, em Pererú de Fátima a medida de Transparência na preia-mar foi de 92 cm que equivale ao extrato A, o extrato B foi de 138 cm, o extrato C 184 cm e a extensão da zona eufótica igual a 276 cm; e em Alto Pererú de Fátima a medida de Transparência na preia-mar foi de 76 cm que equivale ao extrato A, o extrato B foi de 114 cm, o extrato C 152 cm e a extensão da zona eufótica igual a 228 cm.

3.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CLOROFILA A

Os valores dos parâmetros físicos, químicos e de clorofila *a* determinados em cada extrato a partir da água estão descritos na Tabela 1.

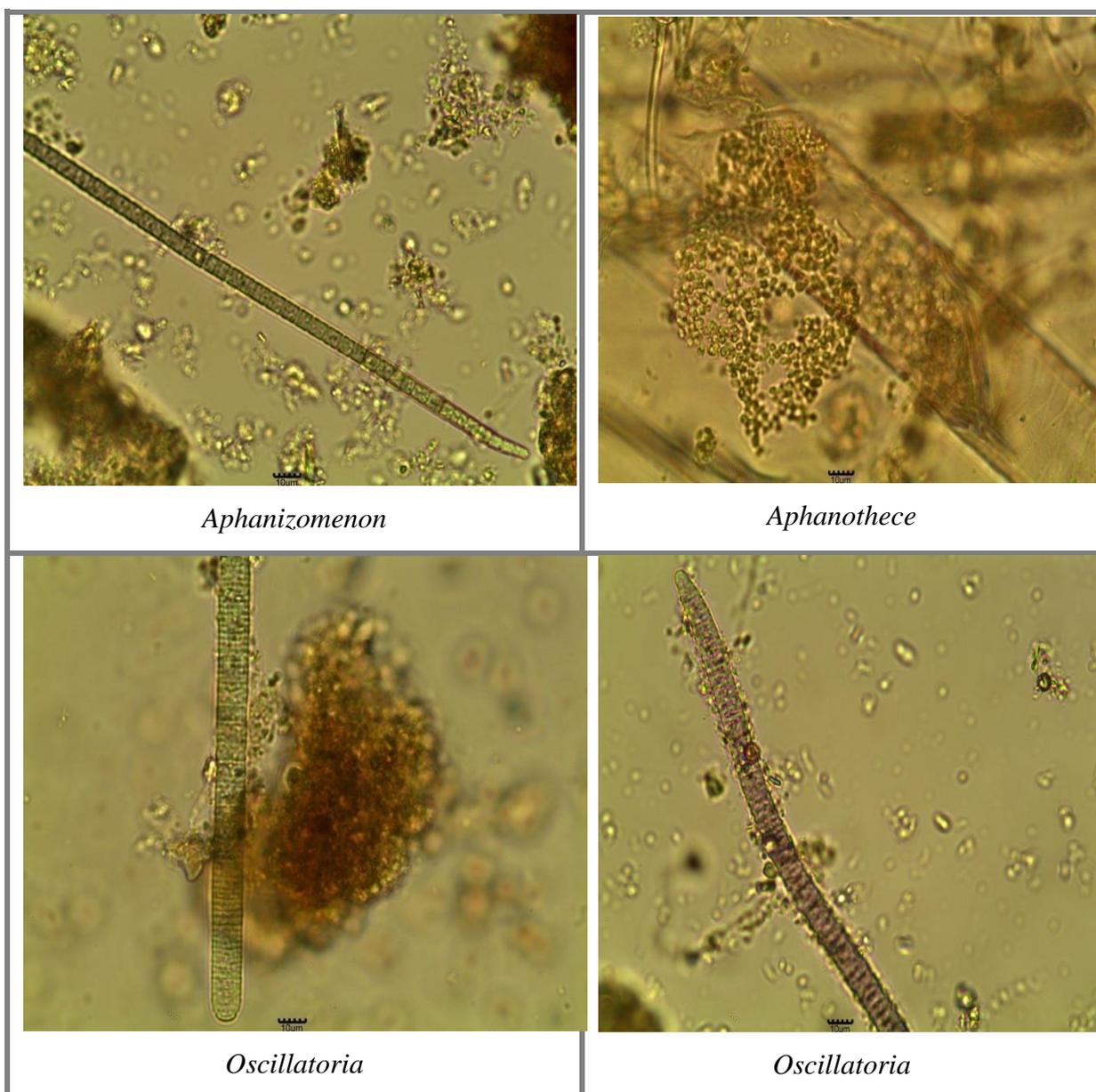
Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água, Lauro Sodré, Curuçá – PA; Pererú de Fátima e Alto Pererú de Fátima, São Caetano de Odivelas – PA. 2015.

Parâmetros	Lauro Sodré			Pererú de Fátima			Alto Pererú de Fátima		
	Extrato A	Extrato B	Extrato C	Extrato A	Extrato B	Extrato C	Extrato A	Extrato B	Extrato C
Temperatura (°C)	29,4	29,5	29,4	29,49	30,16	29,22	29,49	30,16	29,22
OD (ppm)	2	1,9	2	0,32	0,24	0,38	0,3	0,22	0,4
Condutividade (µS/cm)	32888	33279	33515	56490	56930	56020	56560	56100	56033
STD (mg/L)	19708	19935,5	20085	26020	25920	25930	26031	26010	26011
Salinidade (ppt)	18,7	18,9	19,1	34,1	33,93	33,97	33,9	33,61	33,95
pH	6,85	6,8	6,67	7,54	7,37	7,58	7,61	7,31	7,6
Turbidez (UNT)	37,46	42,99	42,74	8	14	13	10	15	16
Nitrito (mg/L)	0,013	0,011	0,009	0,004	0,013	0,01	0,007	0,014	0,012
Nitrato (mg/L)	0,02	<LD	<LD	1,7	1,5	1,5	1,7	1,2	1,4
Nitrogênio Amoniacal (mg/L)	3	3,5	4,25	5,56	5,82	1,4	1,8	1,89	1,1
Fósforo Total (mg/L)	0,08	0,05	0,04	0,05	0,06	0,06	0,02	0,05	0,07
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	6	8,6	3,84	4,9	4,24	1,31	2,05	3,72	2,82

3.2 IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM DE CIANOBACTÉRIAS

3.2.1 Identificação Morfológica

Por observação microscópica das amostras de água concentradas com a rede de plâncton e fixadas em formol quatro gêneros de cianobactérias foram identificados, sendo encontrados em ambos os locais de cultivo os gêneros *Oscillatoria* e *Phormidium* da Ordem Oscillatoriales, o gênero *Aphanizomenon* da Ordem Nostocales foi encontrado apenas em Lauro Sodré e o gênero *Aphanothece* da Ordem Chroococcales encontrado apenas em Alto Pererú de Fátima, sendo todos conhecidos por conter espécies tóxicas. Na figura 11 é possível ver imagens dos gêneros identificados.



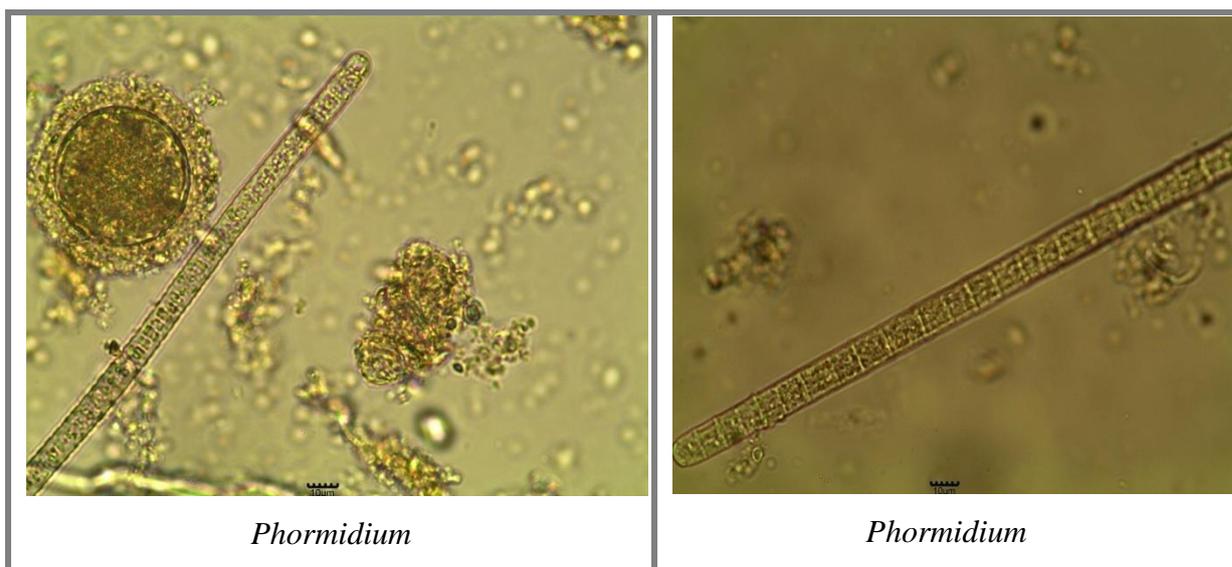


Figura 11 - Fotografias de gêneros de cianobactérias identificados por microscopia óptica. Escala de 10µm.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Nas conchas de Lauro Sodré foram identificados dois morfotipos. O Morfotipo 1 (Figura 12) apresenta tricomas curvos, não atenuados e célula apical com ápice arredondado. Células verde claras, sem granulações e levemente em forma de barril com 1,3 – 1,4 µm de altura e 1,7 – 1,8 µm de largura. Movimento deslizante. Filamentos longos e emaranhados que crescem aderidos a uma superfície de contato: *Pseudanabaena* (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005), *Pantanalinema rosanae* (VAZ, 2015).

Já o Morfotipo 2 (Figura 13) apresenta Tricomas curvos, envoltos por um envelope mucilaginoso firme e transparente, não atenuados, com célula apical de ápice arredondado. Sem mobilidade. Células verde escuras, com conteúdo granular fino e com 3,7 – 5,5 µm de altura e 3,4 – 3,5 µm de largura. Filamentos longos e emaranhados que crescem aderidos a uma superfície de contato: *Phormidium* (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005).



Figura 12 – Morfotipo 1. Lauro Sodré, Curuçá-PA. Escala de 10 μ m.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

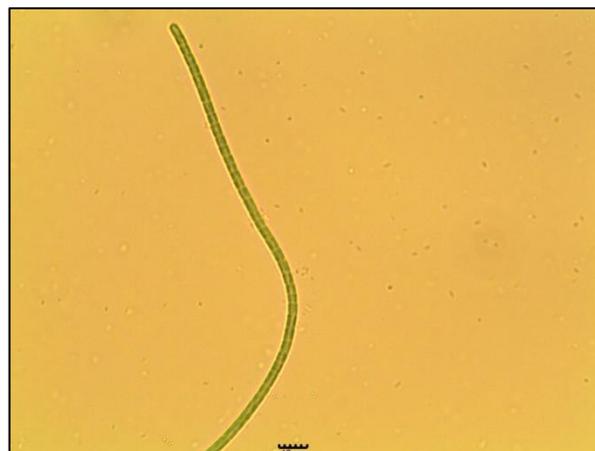


Figura 13 – Morfotipo 2. Lauro Sodré, Curuçá-PA. Escala de 10 μ m.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Nas conchas de São Caetano de Odivelas foram identificados dois morfotipos. O Morfotipo 1 (Figura 14) apresenta tricomas solitários em bainha mucilaginosa fina e transparente, levemente constrictos, não atenuados, com célula apical quadrática ou levemente ovalada. Movimento deslizante. Células com conteúdo claro e homogêneo com 3,8 – 7 μ m de altura e 2,4 – 2,8 μ m de largura: *Pseudanabaena* (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005).

E o Morfotipo 2 (Figura 15) apresenta tricomas solitários envolvidos por uma densa bainha de mucilagem, não atenuados, septos não granulados, sem constrictões com célula apical de ápice arredondado. Sem mobilidade aparente. Células com denso conteúdo granular e com +/- 3,7 μ m de altura e 10,2 – 10,9 μ m de largura. Filamentos longos: *Oscillatoria* (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005).

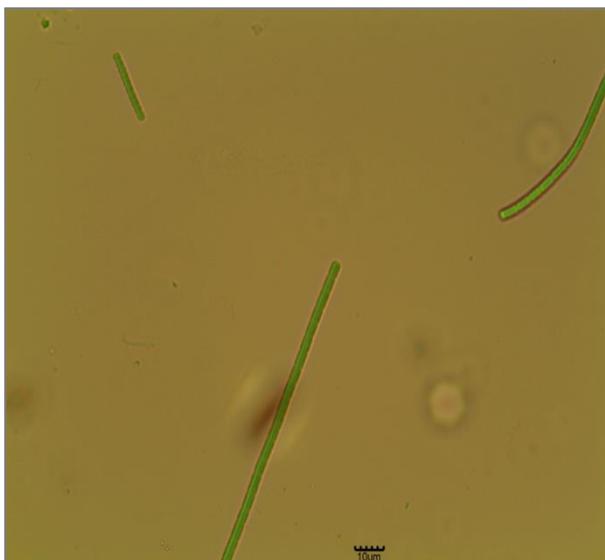


Figura 14 – Morfotipo 1. São Caetano de Odivelas-PA. Escala de 10µm.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).



Figura 15 – Morfotipo 1. São Caetano de Odivelas-PA. Escala de 10µm.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

3.2.2 Identificação por Biologia Molecular

A partir das conchas das ostras de Lauro Sodré foram isoladas duas estirpes (Figuras 12 e 13). Contudo, apenas uma (Figura 12) cresceu o suficiente para que fosse realizada a extração do DNA genômico e posterior amplificação do gene 16S rRNA, cujo resultado por eletroforese após a análise de PCR é mostrada na Figura 16 e resultado da análise de sua sequência em banco de dados encontra-se no Quadro 3.

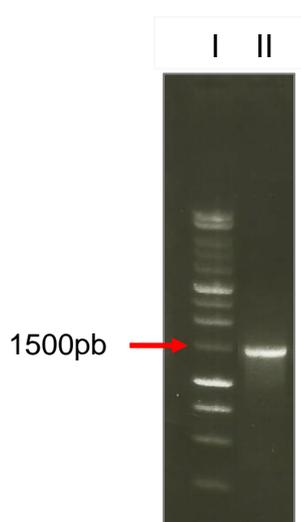


Figura 16. (II) Produto da amplificação para o gene 16S rRNA de cultura a partir de conchas de ostras. (I) Marcador 1Kb plus DNA *Ladder* (Promega) (fragmentos de 250bp a 10kb).

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Código de Acesso	Descrição	Escore Maximo	Escore Total	Cobertura	E Value	Identidade
AB058224. 1	LPP-group MBIC10086 gene for 16S rRNA, partial sequence	1788	1788	94%	0.0	95%
KF246501. 2	Pantanalinema rosanae CENA537 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	96%	0.0	94%
KF246483. 2	Pantanalinema rosanae CENA516 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	96%	0.0	94%
EU255708. 1	Uncultured cyanobacterium clone Mat-CYANO-S10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	94%	0.0	94%
KF246503. 2	Pantanalinema rosanae CENA539 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1766	1766	96%	0.0	94%
HM105583. 2	Pantanalinema rosanae CCIBt1046 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1766	1766	96%	0.0	94%
KF246484. 2	Pantanalinema rosanae CENA517 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1760	1760	96%	0.0	94%

KF246488. 2	Pantanalinema rosaneae CENA521 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1755	1755	96%	0.0	94%
----------------	---	------	------	-----	-----	-----

Quadro 4. Características das sequências de maior similaridade com a sequência estudada.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

3.2.3 Contagem de cianobactérias

A contagem de cianobactérias presentes nas amostras de água está descrita na Tabela 2. Não houve células de cianobactérias nas amostras de Lauro Sodré, sendo contados 100 indivíduos da espécie de microalga dominante como referência.

Tabela 2. Contagem de cianobactérias, Lauro Sodré, Curuçá – PA; Pererú de Fátima e Alto Pererú de Fátima, São Caetano de Odivelas – PA. 2015.

Células /mL	Lauro Sodré	Pererú de Fátima	Alto Pererú de Fátima
Extrato A	100*	121,4	9,7
Extrato B	100*	30,1	21,1
Extrato C	100*	19,9	19,6

*Algas de referência.

3.3 ANÁLISE DE CIANOTOXINAS

Na análise em HPLC não foram detectadas microcistinas e saxitoxinas nos extratos da água, dos filtros e das ostras. A Figura 17 mostra um cromatograma com alguns dos padrões de microcistinas utilizados na pesquisa e a Figura 18 apresenta um exemplo dos resultados negativos para microcistinas em extrato de ostras.

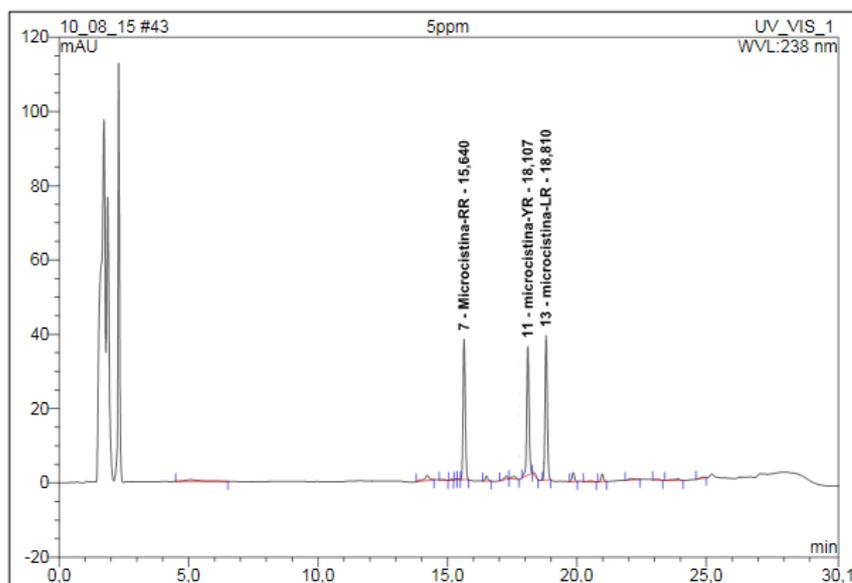


Figura 17. Cromatograma dos padrões de microcistinas RR, YR e LR e respectivos tempos de retenção.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

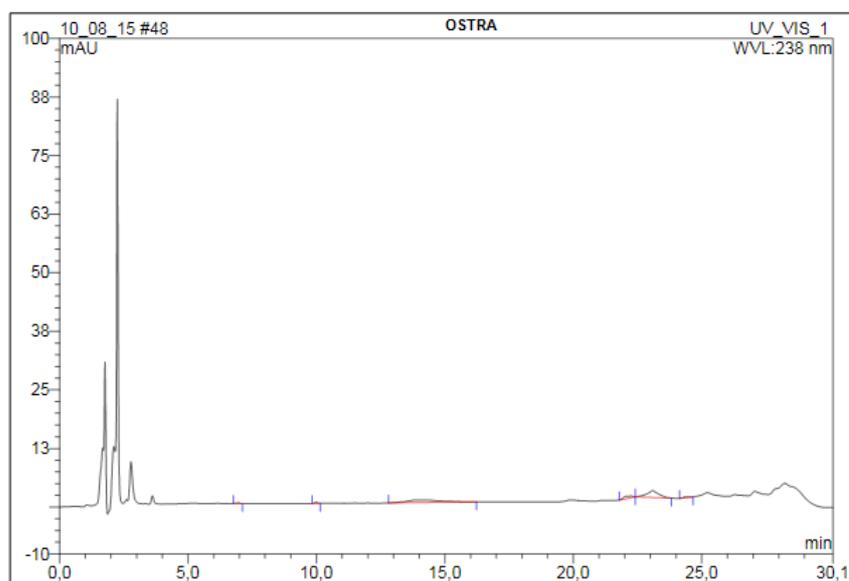


Figura 18. Cromatograma resultante da análise de HPLC para o extrato de ostra.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Através de ELISA nos extratos do Morfotipo 1 (Figura 12) e Morfotipo 2 (Figura 13) a partir de cultura das conchas de Lauro Sodré foi detectado 0,02 ppb de saxitoxina e no extrato a partir de cultura mista das conchas de São Caetano de Odiveias foi detectado 0,03 ppb de saxitoxina.

4 DISCUSSÃO

4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A interação entre fatores físicos, químicos e bióticos determinam a heterogeneidade ambiental, um fator chave determinante da diversidade e padrão de desenvolvimento do fitoplâncton (PAERL *et al.*, 2001).

A maioria das cianobactérias tem taxas de crescimento máximas a temperaturas acima de 25°C, isto explica o fato de ocorrerem florações predominantemente no verão (SIVONEN; JONES, 1999). A temperatura também influencia na produção de diferentes formas químicas de cianotoxinas, Rapala e colaboradores (1997) observaram que à temperaturas abaixo de 25°C *Anabaena spp.* produzem microcistina-LR e à temperaturas elevadas é produzida microcistina-RR.

Neste estudo a temperatura mostrou-se elevada, entre 29 e 30°C (Tabela 1), concordando com o trabalho de Kiyatake (2011) nos mesmos locais e com outros trabalhos realizados em estuários próximos aos estudados (CARDOSO, 2009; COSTA, 2010; GOMES, 2013).

O oxigênio dissolvido na água é um dos fatores mais importantes na dinâmica e no equilíbrio de ecossistemas aquáticos. As principais fontes de oxigênio para o corpo hídrico são a atmosfera, através da interface atmosfera-água, e a fotossíntese, que é a produção e liberação do oxigênio pelos organismos fitoplanctônicos e plantas aquáticas. Contudo, o oxigênio dissolvido pode sofrer perdas através de diversos processos como a elevação da temperatura da água, consumo pela decomposição da matéria orgânica (oxidação), perdas para a atmosfera, respiração de organismos aquáticos e a oxidação de íons metálicos (BRASIL, 2013).

Nos locais de coleta o oxigênio dissolvido estava entre 0,22 e 2 mg/L (Tabela 1), abaixo do valor de referência para ambientes aquícolas que é de no mínimo 5 mg/L para águas doces e salobras e 6 mg/L para águas salinas (BRASIL, 2005). Kiyatake (2011) registrou valores maiores de oxigênio dissolvido, de 2,72 mg/L a 7,99 mg/L em Lauro Sodré e valores de 2,22 mg/L a 15,69 mg/L em Pererú de Fátima, contudo, 77% dos valores encontrados em Lauro Sodré e 72,7% dos valores encontrados em Pererú de Fátima estavam abaixo dos valores de referência.

Alguns rios apresentam naturalmente em determinadas épocas do ano valores de oxigênio dissolvido relativamente baixos, sem que este comportamento possa ser atribuído à atividade antrópica. Este comportamento é verificado principalmente nos rios do Pantanal e na bacia Amazônica (VIEIRA, 2016).

Silva e colaboradores (2013) identificaram diversas variáveis físico-químicas nas águas de diversos pontos do rio Amazonas e tributários. A maioria dos locais observados apresentou valores abaixo de 5 mg/L, os baixos valores observados são considerados naturais e os organismos estão adaptados a esta condição.

Outro fator que contribui para a diminuição de oxigênio dissolvido na água é a turbidez, um parâmetro contrário ao crescimento das cianobactérias, pois a alta turbidez bloqueia a luz solar, diminuindo assim a fotossíntese e impedindo as florações (FERRAZ, 2012).

A presença de turbidez encontrada nos locais de cultivo se deve a produção de materiais em suspensão pelas fortes correntes de enchente e vazante geradas pelas marés de grande amplitude da região (KIYATAKE, 2011).

Outro fator importante a ser analisado é o pH, pois este influencia de maneira direta os processos bioquímicos, especialmente as trocas iônicas com o meio extracelular, desta forma, processos de absorção e excreção de substâncias orgânicas e iônicas são diretamente afetados (BRASIL, 2013). Valores de pH na faixa de 6 a 9 são considerados compatíveis, a longo prazo, para a maioria dos organismos aquáticos, enquanto que valores de pH acima ou abaixo destes limites são prejudiciais ou letais (VIEIRA, 2016).

Neste estudo os valores de pH estavam dentro da faixa considerada compatível para a vida aquática, e de acordo com os valores encontrados entre 2009 e 2010 nos mesmos locais por Kiyatake (2011).

Conforme a classificação de corpos d'água do Conselho Nacional de Meio Ambiente (BRASIL, 2005) quanto à medida de salinidade as águas do cultivo de Lauro Sodré se encontravam salobras, pois apresentaram salinidade superior a 0,5‰ (0,5ppt) e inferior a 30‰ (30ppt). Já as águas dos cultivos de São Caetano de Odivelas se encontravam salinas, pois apresentaram salinidade superior a 30‰ (30ppt).

Kiyatake (2011) registrou no período de junho de 2009 a maio de 2010 em Lauro Sodré o valor mínimo de 0,17 e valor máximo de 24,79 de salinidade e em Pererú de Fátima o valor mínimo de 2,73 e valor máximo de 29,46 de salinidade. Esta variação é típica de ambientes estuarinos, caracterizados pela constante mistura de águas com diferentes salinidades.

A condutividade elétrica refere-se à capacidade de uma solução aquosa em conduzir corrente elétrica. Esta propriedade depende da concentração de íons, quanto maior a concentração iônica, maior será a capacidade da solução de conduzir a corrente elétrica e vice-versa. Sua aplicação prática é a indicação do grau de mineralização da água e indicação rápida de variações nas concentrações de minerais dissolvidos (BRASIL, 2013; PARRON; MUNIZ; PEREIRA, 2011).

Neste estudo ambos os locais de cultivo apresentaram valores altos de condutividade elétrica, em regiões estuarinas valores elevados indicam nitidamente a entrada de águas mais condutivas, salobras e não fluviais, indicando a penetração da maré salina (SILVEIRA JÚNIOR, 2012).

Sólidos totais dissolvidos (STD) são a soma de todos os constituintes químicos dissolvidos na água e pode ser medida através da conversão da medida de condutividade elétrica. As substâncias dissolvidas podem conter íons orgânicos e inorgânicos que em concentrações elevadas podem ser prejudiciais à vida aquática (BRASIL, 2013; PARRON; MUNIZ; PEREIRA, 2011). Em comparação, Kiyatake (2011) obteve concentrações menores que as encontradas neste trabalho, com valores entre 11,82 mg/L a 9973mg/L em Lauro Sodré e 10,2 mg/L a 19490 em Pererú de Fátima.

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes no metabolismo de ecossistemas aquáticos, pois participa da formação de proteínas, um dos componentes básicos da biomassa. Nos ambientes aquáticos ele está presente sob várias formas, sendo as principais o nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amônia (NH_3) e íon amônio (NH_4^+), sendo que o nitrogênio amoniacal corresponde ao nitrogênio proveniente de um composto derivado do amoníaco (BRASIL, 2013).

Em ambos os locais de cultivo, os valores de nitrito encontravam-se dentro do limite permitido pela legislação vigente (0,07 mg/L) (BRASIL, 2005). Em Lauro Sodré o nitrato também encontrava-se dentro do limite permitido pela legislação (0,40 mg/L) (BRASIL, 2005), já em Pererú de Fátima e Alto Pererú de Fátima os valores de nitrato se encontravam acima do permitido. E quanto ao nitrogênio amoniacal, todos os locais de cultivo apresentaram valores superiores ao permitido pela legislação (0,40 mg/L) (BRASIL, 2005).

O fósforo possui importância notória nos sistemas biológicos, pois participa em processos fundamentais do metabolismo dos seres vivos como no armazenamento de energia e estruturação da membrana celular. Na maioria dos corpos d'água o fósforo e o nitrogênio podem ser fatores limitantes da produtividade primária e, portanto, são apontados como os principais fatores responsáveis pela eutrofização dos ambientes aquáticos (BRASIL, 2013).

Em ambos os locais de cultivo os valores de fósforo total encontravam-se dentro do limite permitido pela legislação, que é de 0,124 mg/L para águas salobras e 0,062 mg/L para águas salinas (BRASIL, 2005).

A concentração de clorofila *a* é utilizada para expressar a biomassa fitoplanctônica e está diretamente associada à quantidade de algas presentes (BRASIL, 2013). Neste estudo foram encontrados valores baixos de clorofila *a*, indicando baixa densidade de algas, inclusive cianobactérias.

4.2 IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM DE CIANOBACTÉRIAS

4.2.1 Identificação Morfológica

São conhecidas mais de 40 espécies de cianobactérias toxigênicas (CARMICHAEL, 2001). E no Brasil são conhecidas 32 espécies tóxicas, sendo que a região subtropical apresenta maior diversidade (27 espécies) do que a região tropical do país (14 espécies) certamente devido às diferentes condições ambientais destas regiões (SANT'ANNA, 2008). Cardoso (2009) estudou a dinâmica do microfitoplâncton e sua correlação com os fatores ambientais no estuário do rio Guajará-Mirim, na cidade de Vigia-PA e registrou 78 táxons, dentre os quais apenas três pertenciam à Divisão Cyanobacteria, sendo uma espécie de cada Ordem Chroococcales (*Microcystis robusta*), Oscillatoriales (*Oscillatoria princeps*) e Nostocales (*Anabaena crassa*).

Costa (2010) estudou a variação nictemeral do microfitoplâncton do estuário do rio Curuçá, no município de Curuçá-PA e registrou 170 táxons, dentre os quais apenas dois pertenciam à Divisão Cyanobacteria, sendo da Ordem Oscillatoriales (*Oscillatoria proteus* e *Oscillatoria martini*).

Gomes (2013) em estudo no estuário do Rio Pará pesquisou a biodiversidade e densidade de cianobactérias e registrou a ocorrência de 30 espécies pertencentes às ordens Chroococcales (15 spp.), Oscillatoriales (12 spp.) e Nostocales (3 spp.). Sendo que os gêneros *Aphanocapsa* e *Microcystis* apresentaram o maior número de espécies.

Os estudos em estuários paraenses evidenciam a presença de gêneros conhecidos por conterem espécies tóxicas, como os gêneros *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Microcystis* e outros, semelhante ao encontrado neste trabalho.

4.2.2 Identificação por Biologia Molecular

Na análise de similaridade a sequência de rRNA 16S do Morfotipo 1 de Lauro Sodré (Figura 12) apresentou identidade de 94% e 96% de cobertura com seis linhagens de *Pantanalinema rosanae* (CENA537, CENA516, CENA539, CCIBt1046, CENA517 e CENA521) espécie e gênero novos identificados no Brasil (VAZ *et al.*, 2015). Contudo, dois organismos são considerados de mesmo gênero se a identidade entre eles for superior a 95% (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005) e de mesma espécie se for superior a 97,5% (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Não foi possível a identificação molecular de cianobactérias de São Caetano de Odivelas, pois não houve crescimento aparente sobre as conchas no tempo hábil de isolar e cultivar para inclusão neste trabalho.

4.2.3 Contagem de cianobactérias

Nos programas de monitoramento das cianobactérias para águas de abastecimento, normalmente é exigida apenas a contagem do número de células que são as unidades produtoras da toxina. Porém é importante a identificação dos organismos dominantes, pelo menos até o nível genérico, para saber se já são conhecidos seus efeitos tóxicos, já que diferentes gêneros e espécies produzem diferentes toxinas (SANT'ANNA *et al.*, 2006). Neste estudo foi contado apenas o número de células, pois este método não se mostrou eficaz na identificação a qual foi realizada através de outros métodos já descritos

A ausência de cianobactérias na contagem de Curuçá pode estar associada ao seu nicho, pois elas podem não estar dispersas na água em quantidade suficiente no momento da coleta. Outro fator que pode ter contribuído é a dificuldade em diferenciar as células cocóides observadas durante a contagem. Nos cultivos de São Caetano de Odivelas observou-se que o número de células de cianobactérias estava bem abaixo do que estabelece a Resolução CONAMA nº 357/2005 (50.000 células /mL) (BRASIL, 2005)

A aplicação da técnica de castigo (as ostras ficam em mesas próximas às margens dos estuários, e quando a maré baixa as ostras ficam horas expostas ao sol e ao ar livre) diminui assim o crescimento de cianobactérias que vivem aderidas às conchas. Isto é uma forma de os ostreicultores minimizarem os riscos de florações por cianobactérias e a contaminação das ostras com cianotoxinas.

Os resultados das contagens corroboram com os resultados da análise em HPLC dos extratos da água, dos filtros e das ostras os quais não detectaram microcistinas e saxitoxinas, pois as cianotoxinas são endotoxinas (toxinas intracelulares) que somente são liberadas para água por lise celular comum em florações (BRANDÃO; DOMINGOS, 2006). Outro fator que influencia a presença de cianotoxinas segundo Carmichael (2001) é que nem todas as espécies produtoras de toxinas possuem cepas tóxicas em todos os momentos.

5 CONCLUSÃO

- Os locais de criação de ostras apresentam gêneros de cianobactérias conhecidos por serem produtores de cianotoxinas, como *Aphanizomenon*, *Aphanothece*, *Oscillatoria* e *Phormidium*. Contudo, a contagem revelou baixa densidade de células;
- Foi possível isolar e cultivar cianobactérias presente nas conchas das ostras de Curuçá apenas;
- O isolado de cianobactérias obtido do criadouro de Curuçá apresentou produção de saxitoxina detectada através de ensaio imunoenzimático (ELISA);
- Em todos os locais de cultivo estudados as ostras encontram-se adequadas para o consumo, livres de contaminação por microcistinas e saxitoxinas, pois o sistema HPLC não detectou a presença dessas toxinas nos extratos das ostras e nas amostras de água dos locais de cultivo;
- Este estudo é o primeiro a ser realizado nos criadouros de ostra da região paraense e contribui para o conhecimento e monitoramento das ostras no Estado.

6 REFERÊNCIAS

ALLEN, M. M.. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **J. Phycolo.**, 4, 1-3, 1968.

AMORIM, A.; VASCONCELOS, V.. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Toxicon**, 37, 1041-1052, 1999.

ASTUDILLO, L. R. de; CHANG-YEN, I.; BARBERA-SÁNCHEZ, A. La. Determinación de saxitoxina y sus derivados en moluscos bivalvos: Evaluación y optimización del uso de cromatografía líquida de alta resolución con previa oxidación. **Zootecnia Trop.**, 20(4): 501-513, 2002.

BOSCARDIN, N. R.. A Produção Aquícola Brasileira. In: OSTRENSKY, A., *et al.*. **Aquicultura no Brasil**. O desafio é crescer. Brasília: Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca/FAO, p. 27-72, 2008.

BRANDÃO, L. H.; DOMINGOS, P.. Fatores Ambientais para a Floração de Cianobactérias Tóxicas. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 1, n. 2, p. 40-50, jul / dez, 2006.

BRASIL. ANVISA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2 jul. 2003.

BRASIL. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 18 mar. 2005. Seção 1. p. 53.

BRASIL. FUNASA. **Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.914 publicada em 14 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, nº 239 – Seção 1 p. 39-46, 2011.

BRASIL. **Monitoramento da Qualidade da Água de Rios e Reservatórios**. Capacitação para o Singreh. Autoinstrucional 40h. Ministério do Meio Ambiente: Agência Nacional de Águas. 2013.

CARDOSO, F. F. C.. **Dinâmica da Comunidade Microfitoplanctônica Relacionada com os Parâmetros Físico-Químicos do Estuário do Rio Guajará-Mirim (Vigia-PA)**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca). Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

CARMICHAEL, W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**. p. 78-86, jan, 1994.

CARMICHAEL, W. W.. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs”. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 7, n. 5, p. 1393-1407, 2001.

CHEN, J. *et al.*. First Identification of the Hepatotoxic Microcystins in the Serum of a Chronically Exposed Human Population Together with Indication of Hepatocellular Damage. **Toxicological Sciences**, 108(1), 81–89, 2009.

COSTA, B. O.. **Variação Nictemeral do Microfitoplâncton em um Estuário do Nordeste Paraense, Brasil**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca). Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

DIEGUES, A. C.; ROSMAN, P. C.. **Caracterização dos ativos ambientais em áreas selecionadas da zona costeira brasileira**. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 1998.

DÍEZ, B.; ININBERGS, K.. Ecological importance of cyanobacteria. In: SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J.. **Cyanobacteria : an economic perspective**. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2014.cap. 1, p. 3-20.

DUÉ, A. *et al.*. **Itens alimentares de *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) (*Bivalvia: Ostreidae*) cultivadas em um estuário tropical, no Nordeste do Brasil**. **Bioikos**, Campinas, 24(2): 83-93 jul./dez., 2010.

EMBRAPA. Panorama da aquicultura na Amazônia. **Revista de Agropecuária da Embrapa Amazônia Oriental**. Ano I, nº 2, ago, 2015.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Contributing to Food Security and Nutrition for All. Roma, 2016.

FERNANDES, S. da S.. **Biodisponibilidade de Cianotoxinas em Bivalves**. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto – Departamento de Zoologia-Antropologia, Porto, 2008.

FERRÃO FILHO, A. da S.. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. **Oecol. Bras.**, 13(2), p. 272-312, 2009.

FERRÃO-FILHO, A. da S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B.. Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. **Mar. Drugs**, 9, 2729-2772, 2011.

FERRAZ, H. D. A.. **Associação da Ocorrência de Cianobactérias às Variações de Parâmetros de qualidade da Água em Quatro Bacias Hidrográficas de Minas Gerais**. 81f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.

GOMES, A. L.. **Biodiversidade e Densidade de Cianobactérias em uma Região Portuária e Industrial no Estuário Amazônico, Pará, Brasil**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará. Belém, 2013.

HEALEY, A. *et al.*. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. **Plant Methods**, 10:21, 2014.

HOSHINO, P.. **Avaliação e Comparação de Projetos Comunitários de Ostreicultura Localizados no Nordeste Paraense**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca). Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Revisão 4. Rio de Janeiro, RJ, 2011. 20 p..

ISO 20179:2005. Water quality — Determination of microcystins — Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. 1st Edition. 2005.

KIYATAKE, D. M.. **Avaliação Sanitária de Água de Cultivo e de Ostras da Zona do Salgado, Nordeste do Pará – Brasil**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará. Belém, 2011.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K... Cyanoprocaryota. 1. Teil. Chroococcales. In: Ettl, et al. (eds). **Subwassseflora von Mitteleuropa**, Band 19/1. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag, p. 548. 1999.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K.. Cyanoprokariota, 2. Teil: Oscillatoriales. In: BÜDEL, B. et al. (eds.). **Subwasserflora von Mitteleuropa**, Band 19/2. Spektrum Akademischer Verlag, 759p., 2005.

KOMÁREK, J.. **Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprocaryota**: 3rd part: heterocystous genera. Heidelberg: Springer Spektrum, vol. 19 pp. [i]-xviii, [1]-1130, 2013.

LAWRENCE, J. F.; NIEDZWIADK, B.. Quantitative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish by Using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Journal of AOAC International**, 84, 1099-1108, 2001.

LAWRENCE, J. F.; SCOTT, P. M.. HPLC methods for the determination of mycotoxins and phycotoxins. In: BARCELÓ, D. (ed.) **Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance**. Elsevier Science Publishers B.V., 1993, cap. 8, p. 273-309.

LENZ, T. de M.. **Biologia reprodutiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) (Bivalvia: Ostreidae) como subsídio à implantação de ostreicultura na Baía de Camamu (BA)**. 54 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Aquáticos Tropicais – Ecologia). Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, BA, 2008.

LUND, J. W. G.; KIPLING, C.; LE CREN, E. D.. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimation by counting. **Hydrobiologia**. v. 11, n. 2, p. 143-170, abril, 1958.

METCALF, J. S.; CODD, G. A.. **Cyanobacterial Toxins (Cyanotoxins) in Water**. Foundation for Water Research, 2014.

MINILLO, A. et al.. Biodegradação da hepatotoxina (D-Leu1)-microcistina-LR por bactérias presentes em filtros biológicos de carvão. **EngSanit Ambient.**, v.18, n.3, p. 205-214, jul / set, 2013.

MOREIRA, C. *et al.*. Methods to detect cyanobacteria and their toxins in the environment. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 98: 8073–8082, 2014.

NEILAN, B. A. *et al.*. rRNA Sequences and Evolutionary Relationships among Toxic and Nontoxic Cyanobacteria of the Genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 693-697, jul, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. (traduzido por Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi) 3^a ed, São Paulo, 2002.

OLIVEIRA, A. C. P. de. **Efeitos de fatores físicos, químicos e biológicos no processo de degradação e remoção de microcistinas**. 143 f. Tese (Doutorado em ciências Biológicas) Universidade Federal do Rio de Janeiro – Centro de Ciências da Saúde. Rio de Janeiro, 2003.

OLIVEIRA, W. C. *et al.*. Cyanobacteria: a review of potential nutritional and biotechnological aspects. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 1, p. 49-67. jan./jun., 2013.

OREN, A.. Cyanobacteria: biology, ecology and evolution. In: SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J.. **Cyanobacteria : an economic perspective**. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2014.cap. 1, p. 3-20.

OSSWALD J., *et al.*. Uptake and depuration of anatoxin-a by the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) under laboratory conditions. **Chemosphere**, 72 : 1235–1241, 2008.

PAERL, H. W. *et al.*. Harmful Freshwater Algal Blooms, with an Emphasis on Cyanobacteria. **The Scientific World**, 1, 76-113, 2001.

PANOSSO, R. *et al.*. Cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios do Estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Oecol. Bras.**, 11 (3), p. 433-449, 2007.

PARRON, L. M.; MUNIZ, D. H. de F.; PEREIRA, C. M.. **Manual de Prodedimentos de Amostragem e Análise Físico-Química de água**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2011.

PEARSON, L. *et al.*. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. **Mar. Drugs**, 8, p.1650-1680, 2010.

PEREIRA, P. *et al.*. Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfish toxins by the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. **Aquatic Toxicology**, 68, 339–350, 2004.

PORTELLA, C. G.. **Avaliação da qualidade da ostra nativa *Crassostrea brasiliana* congelada em concha em função da composição química e análise sensorial**. 75 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP, 2005.

RAPALA, J. *et al.*. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 2206–221, 1997.

RIOS, E.. **Seashells of Brazil**. Rio Grande, RS, Ed. FURG 1994. 368p..

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D.. **Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. Revisão científica Antonio Carlos Marques. São Paulo: Roca, 2005.

SAKER, M. L. *et al.*. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. **Toxicon**, 43:185-194, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W.. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001.

SANT'ANNA, C. L. *et al.*. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**, Interciência, Rio de Janeiro; Sociedade Brasileira de Ficologia – SBFic, 2006.

SANT'ANNA, C. L. *et al.*. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, 126, 251–265 Stuttgart, April, 2008.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN. J.. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1501–1506, mar, 2005.

SEBRAE. **Ostreicultura: Manual de Boas Práticas: Qualidade e Segurança para Bons Negócios**. Projeto Estruturante AquiNordeste. Aquicultura no Nordeste. Brasília, 2015. 54 p..

SEPAq. **Secretaria de Estado de Pesca e Aquicultura**. Malacocultura. *On line*. Disponível em: <<http://www.sepaq.pa.gov.br/?q=node/55>>. Acesso em :15/05/2015.

SILVA, M. do S. R. da. *et al.*. Classificação dos rios da Amazônia: uma estratégia para preservação desses recursos. **HOLOS Environment**. v. 13, n. 2, p. 163-174, 2013.

SILVEIRA JÚNIOR, A. M. da. **Composição e Biomassa Microfitoplanctônica Associadas a Variáveis Físico e Químicas em Dois Transectos da Zona Estuarina do Rio Amazonas (Amapá, Amazônia, Brasil)**. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Amapá. Macapá, 2012.

SILVINO, L. S.. Validação da metodologia para análise de Saxitoxina e dc-Saxitoxina em água via derivatização pré-coluna. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental. Fortaleza, 2014.

SINGH, Shailendra P. *et al.*. An improved method for genomic DNA extraction from cyanobacteria. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 27:1225–1230, 2011.

SIQUEIRA, D. B.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. **Universitas Ciências da Saúde**, v. 3, n. 1, p. 109-127, 2005.

SIQUEIRA, K. L. F.. **Avaliação do sistema de cultivo de ostra do gênero *Crassostrea* (SACCO, 1897) no estuário do rio Vaza-Barris (Sergipe)**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente. Universidade Tiradentes. Aracaju, 2008.

SIVONEN, K.; JONES, G.. Cyanobacterial Toxins. In: CHORUS, I; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. WHO, 1999, cap. 3.

STAKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M.. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 846-849, oct, 1994.

TURRELL, E.; LACAZE, J.; STOBO, L.. **Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) Toxins in Shellfish Using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography (LC) with Fluorescence Detection: Analysis of Shellfish Extracts from the UK Jellet Rapid Test (JRT) Trial**. Fisheries Research Services, Marine Laboratory, Aberdeen, UK. 2006.

UTHERMOHL, H. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton-methodik. **Mit. Ins. Ver. Limnol.**, v. 9, p. 1-38, 1958.

VALE, P.; TALEB, H.. Assessment of the quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins by pre-column derivatization and elimination of interfering compounds by solid-phase extraction. **Food Additives and Contaminants**, 22(9): 838–846, set, 2005.

VASCONCELOS, V. M. O. de. **Toxicologia De Cianobactérias: Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves**. 136 f. Dissertação (Doutorado em Ecologia Aplicada). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto, 1995.

VASCONCELOS, V. M.. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, 32, 227-237, 1995.

VASCONCELOS, V. M.. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 32(3): 249-254, 1999.

VASCONCELOS, V. M.; WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S.. Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. **Toxicon**, 50, 740–745, 2007.

VASCONCELOS, V. M.. Global changes and the new challenges in the research on cyanotoxin risk evaluation. **Limnetica**, 34 (1): 149-158, 2015.

VAZ, M. G . M. V. *et al.*. *Pantanalinema* gen. nov. and *Alkalinema* gen. nov.: novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline–alkaline lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 65, 298–308, 2015.

VIEIRA, M. R.. **Os principais parâmetros monitorados pelas sondas multiparâmetros são: pH, condutividade, temperatura, turbidez, clorofila ou cianobactérias e oxigênio dissolvido.** *On line*. Disponível em: <

http://www.agsolve.com.br/news_upload/file/Parametros%20da%20Qualidade%20da%20Agua.pdf > Acesso em: 09/06/2016.

VILARIÑO, N. *et al.*. Innovative detection methods for aquatic algal toxins and their presence in the food chain. **Anal. Bioanal. Chem.**, 405:7719–7732, 2013.

WAKAMATSU, T.. **A ostra de Cananéia e seu cultivo**. São Paulo, Superintendência do Desenvolvimento do Litoral Paulista / Instituto Oceanográfico USP, 1973. 141p.

WHITTON, B. A.; POTTS, M.. Introduction to the Cyanobacteria. In: WHITTON B. A. (ed.), **Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time**. Springer Science Business Media B.V., 2012.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for Drinking-water Quality**. 4^a ed., Switzerland: WHO Graphics, 2011.

WOODHOUSE, J. N.; RAPADAS, M.; NEILAN, B. A.. Cyanotoxins. . In: SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J.. **Cyanobacteria : an economic perspective**. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2014. cap. 16, p. 257-268.

WATANABE, M. F. *et al.*. Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. **Natural toxins**, 5, 31-35, 1997.