

Tanise Klein Ramos

SAXITOXINAS DA CIANOBACTÉRIA LÍMNICA
***Cylindrospermopsis raciborskii* e o RISCO DE CONTAMINAÇÃO**
NA PRAIA DO MATADEIRO, FLORIANÓPOLIS, SC

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig

Coorientador: Prof. Dr. João Sarkis Yunes

Coorientadora: Dra. Luiza Dy Fonseca Costa

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

RAMOS, TANISE KLEIN
SAXITOXINAS DA CIANOBACTÉRIA LÍMNICA
Cylindrospermopsis raciborskii e o RISCO DE
CONTAMINAÇÃO NA PRAIA DO MATADEIRO, FLORIANÓPOLIS,
SC / TANISE KLEIN RAMOS ; orientador, LEONARDO RUBI
RÖRIG, coorientador, JOÃO SARRIS YUNES, 2019.
72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em ,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. . 2. C. raciborskii. 3. Saxitoxinas. 4.
Salinidade. 5. P. Perna. I. RÖRIG, LEONARDO RUBI.
II. YUNES, JOÃO SARRIS. III. COSTA, LUIZA DY
FONSECA IV. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em . V. Título.

Tanise Klein Ramos

SAXITOXINAS DA CIANOBACTÉRIA LÍMNICA *Cylindrospermopsis raciborskii* e o RISCO DE CONTAMINAÇÃO NA PRAIA DO MATADEIRO, FLORIANÓPOLIS, SC

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Oceanografia” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Oceanografia.

Florianópolis, 12 de abril de 2019.

Prof. Antonio Henrique da Fontoura Klein, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Leonardo Rubi Rörig, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Paulo Antunes Horta Júnior, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Charrid Resgalla Junior, Dr.
Universidade do Vale do Itajaí

Prof. Maria Cecília Miotto, Dr.^a
Centro Universitário Leonardo da Vinci

Dedico este trabalho a todos os seres vivos que compõem a zona costeira, sejam eles racionais ou irracionais.

AGRADECIMENTOS

É aqui que posso abrir meu coração? Se sim, segue a tentativa de expressar minha gratidão.

Fazendo uma retrospectiva deste período conhecido como pós-graduação, gostaria de fazer meus agradecimentos em ordem cronológica, e não por ordem de importância, pois todos os nomes aqui citados fizeram parte da construção deste trabalho, mas mais do que isso, contribuíram na minha vida profissional e pessoal.

Primeiramente gostaria de agradecer a Dra. Luiza Dy, minha co-orientadora, minha grande incentivadora, minha amiga. A você Luiza, minha gratidão por sempre ter acreditado em mim desde o início, por ter feito a ponte entre eu e professor Sarkis e todo o seguimento deste trabalho. Agradeço por cada minuto da tua vida profissional e pessoal a mim dedicados, e foram muitos, muitos e muitos minutos, que somaram dias de trabalho por mim e por este projeto. As análises de saxitoxinas que o digam! Muito obrigada Lú!

Ao professor Sarkis, que só me conhecia de suas aulas de bioquímica da graduação, agradeço por ter acreditado em mim e ter feito a ponte entre eu e meu orientador, por ter me incentivado com a bolsa técnica, por disponibilizar seu laboratório com toda a infraestrutura para que as tão preciosas análises de saxitoxinas fossem realizadas. Obrigada por permitir que a Luiza me ajudasse tanto na construção deste mestrado.

Ao INCT Mar-COI por ter aceitado meu projeto e me disponibilizado a bolsa DTI-C que tanto me ajudou ao longo de 12 meses.

Agora, chegou a vez, pela ordem cronológica, do meu orientador. Léo, a gratidão se estende desde o momento que você me recebeu na sua sala me apresentando aquela ideia de projeto até este acelerado final. Quero deixar claro que o projeto me encantou muito desde o início, pois ele contemplou muito bem a visão que a oceanografia tem do ambiente e como ele funciona, ou seja, a integração dos fatores, o que é mais fascinante. Enfim, deu certo e aqui estou escrevendo os agradecimentos de um trabalho que teve início, meio e fim. Obrigada por absolutamente todas as reuniões, elas foram sempre muito importantes e esclarecedoras para mim, foram sempre a direção para onde eu precisava seguir. Foi assim que trabalhamos e assim que deu certo. Você é o orientador que disponibiliza pouco tempo devido a tantas demandas, mas quando disponibiliza resolve, desenrola, desempata. O problema foi sempre o pouco tempo, mas ele foi suficiente para me fazer chegar até aqui.

Agradeço-te por ter compartilhado a angústia de não ter bolsa no meu segundo ano, mas mais ainda por ter confiado em mim quando eu precisei deixar o laboratório para assumir meu tão sonhado emprego. Gratidão!

Ao laboratório de Ficologia da UFSC, que me recebeu de braços abertos, obrigada! Neste lugar eu me senti em casa sempre! Segue aqui a lista de pessoas que neste lugar fizeram parte deste trabalho (absolutamente todos contribuíram, desde autoclavar material até ler todo meu trabalho): Gabi, Camila, Grazi, Zé, Rafa, Dani, Cadu, Melissa, Luana, Karina, Carol, Kely, Thaís Agda, Thaís Massocato, Carlinha, Eduardo.

A Univali e ao Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, que me recebeu ao longo de 14 dias para que o experimento dos mexilhões pudesse se tornar realidade. Professor Charrid, obrigada por disponibilizar toda infraestrutura do Letox, mas principalmente por disponibilizar seu tempo. Foi desde me ensinar a limpar e medir os mexilhões até estar presente nesta banca de mestrado. Obrigada também por me permitir conhecer as pessoas do seu laboratório: Dani, Augusto, Karol, Carla e Lucas, todos eles me ajudaram ao longo dos 14 dias, e por consequência ganhei amigos. Dani, gratidão pelo teu acolhimento e pela paciência com todas minhas dúvidas bestas.

O processo de evolução de um projeto de graduação, mestrado ou doutorado envolvem também pessoas que avaliam nossa capacidade de colocar no papel aquilo que estamos fazendo na prática. Neste contexto quero agradecer especificamente a todas as pessoas que estiveram envolvidas nesta avaliação e que contribuíram na escrita e amadurecimento dos meus textos: Dra. Graziela Persich e Dra. Luiza Dy – na avaliação do projeto de mestrado (etapa I), professor Dr. Frederico Gurgel e Dra. Manuela Batista – na avaliação da qualificação (etapa II), professora Dra. Maria Cecília Miotto, professor Dr. Charrid Resgalla e professor Dr. Paulo Horta – na avaliação da dissertação de mestrado (etapa final), professor Dr. Leonardo Rörig, Dra. Luiza Dy e professor Dr. João Sarkis (meus orientadores) – na correção de todos meus textos desde o início até o final.

E por fim, ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Santa Catarina, por subsidiar a formação de mestres em oceanografia.

RESUMO

A Praia do Matadeiro está localizada a sudeste na Ilha de Santa Catarina e apresenta 1.200 metros de extensão. Anexa a esta praia encontra-se a Lagoa do Peri, uma lagoa costeira utilizada para o abastecimento de água das regiões leste e sul da Ilha de Santa Catarina que está localizada 3 metros acima do nível do mar. A água excedente da lagoa escoar pelo Canal Sangradouro e deságua na Praia do Matadeiro em um fluxo unidirecional. A cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* apresenta alta frequência de ocorrência nesta lagoa e é produtora de Saxitoxinas (STX). Desta forma, é possível que esteja havendo liberação destas toxinas ao longo de todo o percurso, bem como a potencialização das mesmas ao atingir o oceano devido ao incremento de condutividade (salinidade), que estimula a produção da toxina. As Saxitoxinas são alcalóides com ação paralisante e podem ser acumuladas nos tecidos dos animais filtradores, sendo biomagnificadas ao longo da cadeia trófica, podendo inclusive, causar intoxicações em humanos. O objetivo deste estudo foi compreender a dinâmica da STX produzida por *C. raciborskii*, uma vez que as populações são expostas a águas mais salinas, bem como verificar se a biomassa potencialmente tóxica pode afetar componentes ecológicos da zona costeira adjacente a Lagoa do Peri. Foram realizadas duas abordagens: uma ambiental e outra experimental. Na abordagem ambiental, foi realizado um monitoramento em campo ao longo de cinco meses junto à desembocadura do canal do Sangradouro para verificar o destino das populações de *C. raciborskii* e sua possível toxicidade. Para isso foram realizadas coletas de água para determinação de variáveis físico-químicas e quantificação da concentração de STX associadas. Na abordagem experimental, cultivos de cepas de *C. raciborskii* oriundas da Lagoa do Peri foram expostos a diferentes salinidades para verificar se há incremento na concentração de STX. Na abordagem ambiental foi possível identificar a presença de STX dissolvidas na água do ambiente em todos os pontos amostrais nos cinco meses de monitoramento, identificando o risco de contaminação dos componentes ecológicos da zona costeira. A abordagem experimental, que obteve dados de clorofila-a *in vivo* (CLA), ficocianina *in vivo* (FIC) e turbidez (TUR) resultou na Concentração Efetiva Mediana (CE₅₀) de 4,62 para a cepa LP1, 5,06 para a cepa LP2 e 4,80 para a cepa T3. As concentrações de STX apresentaram os maiores valores na salinidade 4 para as cepas LP2 e T3 (17,44 e 24,06 STX_{eq}.(µg.L⁻¹) respectivamente), enquanto para a cepa LP1 foi observado maior concentração na salinidade zero (18,3

STX_{eq}($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). O experimento que alimentou mexilhões com biomassa de *C. raciborskii* em diferentes salinidades mostraram que estes animais absorvem essa biomassa e acumulam a Saxitoxina oriunda da mesma. Isso confirmou a hipótese de que a carga tóxica oriunda da Lagoa do Peri pode atingir a praia do Matadeiro e contaminar eventuais filtradores coletados ou cultivados na área. As indicações aqui levantadas sugerem que não seja autorizado nem o cultivo, nem a coleta de animais filtradores para fins alimentícios na região da Praia do Matadeiro.

Palavras-chave: *C. raciborskii*. Salinidade. Saxitoxinas. Mexilhão *Perna perna*.

ABSTRACT

Matadeiro Beach is located southeast of Santa Catarina Island and is 1,200 meters long. Near to this beach is located the Peri Lagoon, a coastal lagoon used to supply water from the eastern and southern regions of Santa Catarina Island which is located 3 meters above sea level. Peri Lagoon reach the ocean just at the north end of Matadeiro beach by the Sangradouro channel. The cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* a Saxitoxin (STX) producer occurs in high frequency and biomass in this lagoon and this biomass reaches the coastal zone at Matadeiro beach. The goal of this study was to understand the dynamics of STX produced by *C. raciborskii*, since populations are exposed to more saline waters, as well as to verify if the potentially toxic biomass can affect ecological components of the coastal zone adjacent to Lagoa do Peri (Matadeiro beach). Two approaches were carried out: one environmental and one experimental. In the environmental approach, field monitoring was carried out over five months at the Sangradouro channel mouth to verify the destination of the *C. raciborskii* populations and their possible toxicity. For this purpose, water samples were collected for the determination of physico-chemical variables and quantification of the associated STX concentration. In the experimental approach, cultures of *C. raciborskii* strains from the Peri Lagoon were exposed to different salinities to verify if there was an increase in STX concentration related to the salinity. In the environmental approach it was possible to identify the presence of STX in the water of the environment in all the sampling points in the five months of monitoring, identifying the risk of contamination of coastal zone ecological components. The concentrations of STX presented the highest values in salinity 4 for the LP2 and T3 strains (17.44 and 24.06 STXeq. (mg.L⁻¹) respectively), while for the LP1 strain higher concentration was observed in the salinity zero (18.3 STXeq. (mg.L⁻¹)). The experiment that fed mussels with biomass of *C. raciborskii* in different salinities showed that these animals absorb this biomass and accumulate the Saxitoxina originating from it. This confirmed the hypothesis that the toxic load from the Lagoa do Peri can reach the beach of Matadeiro and contaminate any filterers collected or cultivated in the area. The indications here suggested suggest that

neither the cultivation nor the collection of feed filtering animals in the region surrounding Praia do Matadeiro should be authorized.

Keywords: *C. raciborskii*. Salinity. Saxitoxin. Mussel *P. perna*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudo e pontos mostrais.....	28
Figura 2: Temperatura da água nos pontos amostrais ao longo do período monitorado.....	35
Figura 3: Salinidade da água nos pontos amostrais ao longo do período monitorado.....	36
Figura 4: Precipitação pluviométrica na área de estudo ao longo do período amostrado. Os dados são apresentados em somatório mensal e em somatório dos sete dias que antecederam a coleta.....	37
Figura 5: Oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) nos pontos amostrais ao longo do período monitorado.....	38
Figura 6: Fluorescência de clorofila-a <i>in vivo</i> nos pontos amostrais ao longo do período monitorado.....	39
Figura 7: Fluorescência de ficocianina <i>in vivo</i> (RFU) nos pontos amostrais ao longo do período monitorado.....	40
Figura 8. Concentração de STX presente na água da área de estudo entre os meses de setembro de 2017 e fevereiro de 2018.....	41
Figura 9: Curva de crescimento da cepa LP1 de <i>C. raciborskii</i> em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de clorofila-a <i>in vivo</i> (CLA) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).....	47
Figura 10: Curva de crescimento da cepa LP1 de <i>C. raciborskii</i> em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de ficocianina <i>in vivo</i> (FIC) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).....	48
Figura 11: Curva de crescimento da cepa LP1 de <i>C. raciborskii</i> em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de Turbidez (TUR) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).....	49

Figura 12: Curva de crescimento da cepa LP2 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de clorofila-a *in vivo* (CLA) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).....50

Figura 13: Curva de crescimento da cepa LP2 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de ficocianina *in vivo* (FIC) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).....51

Figura 14: Curva de crescimento da cepa LP2 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de Turbidez (TUR) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).....52

Figura 15: Curva de crescimento da cepa T3 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de clorofila-a *in vivo* (CLA) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).....53

Figura 16: Curva de crescimento da cepa T3 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de ficocianina *in vivo* (FIC) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).....54

Figura 17: Curva de crescimento da cepa T3 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de Turbidez (TUR) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).....55

Figura 18. Valores de concentração efetiva mediana (CE_{50}) para salinidade em três cepas de *C. raciborskii* (LP1, LP2 e T3) após três tempos de cultivo (96 h, 168 h, 240 h) calculados a partir de três variáveis indicativas de biomassa (CLA; FIC e TUR). As barras indicam o limite superior e inferior da estimativa de CE_{50} pelo método Trimmed Spearman-Kärber.....57

Figura 19. Concentração total de STX (A) e de STX por clorofila-a (B) nos cultivos de três cepas de *C. raciborskii* (LP1, LP2 e T3) em 3 salinidades distintas (0, 4 e 6) após 16 dias de cultivo em condições aclimatadas. As barras representam o desvio padrão da média (n=3).

Letras iguais indicam valores sem diferença estatística e letras diferentes valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).....59

Figura 20. Taxas de filtração de mexilhões *Perna perna* alimentados com *Nannochloropsis oculata* (NOC) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (CRA) em diferentes salinidades (22, 26 e 30), medidas a partir do consumo de clorofila-a *in vivo*. As barras de erro indicam o desvio padrão da média ($n = 3$). Barras com letras em comum indicam diferenças significativas e barras sem letras em comum indicam ausência de diferenças significativas ($p < 0,05$).....62

Figura 21. Concentrações de STX ($\mu\text{g eq-STX.kg}^{-1}$) em mexilhões *Perna perna* alimentados com *Nannochloropsis oculata* (NOC) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (CRA) em diferentes salinidades (22, 26 e 30). As barras de erro indicam o desvio padrão da média ($n = 3$). Letras diferentes indicam diferenças significativas e letras iguais indicam ausência de diferenças significativas ($p < 0,05$).....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correlações entre os dados ambientais monitorados em todo o período amostral (8 amostragens). Os coeficientes apresentados em negrito indicam correlações significativas.....42

Tabela 2. Correlações entre os dados ambientais incluindo-se a concentração ambiental de STX, que foi monitorada somente a partir de setembro de 2017 (5 amostragens). Os coeficientes apresentados em negrito indicam correlações significativas.....43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE₅₀ – Concentração Efetiva Mediana

CLA – Clorofila *in vivo*

FIC – Ficocianina *in vivo*

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

LP1 – cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* Lagoa do Peri 1

LP2 – cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* Lagoa do Peri 2

STX – Saxitoxinas

T3 – cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* Taiaçupeba

TUR - Turbidez

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 OBJETIVOS.....	26
1.1.1 Geral.....	26
1.1.2 Específicos.....	26
2 METODOLOGIA.....	27
2.1 Área de Estudo.....	27
2.2 Amostragens em Campo.....	28
2.3 Cepas de <i>C. raciborskii</i>	29
2.4 Bioensaio de tolerância das cepas a salinidade.....	29
2.5 Teste de influência da salinidade sobre a produção de STX.....	31
2.6 Bioensaio de acumulação de STX em mexilhões.....	31
2.7 Quantificação da concentração de STX utilizando HPLC.....	33
2.8 Procedimentos estatísticos.....	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
3.1 Dados Ambientais.....	35
3.2 Tolerância das cepas a salinidade.....	45
3.3 Concentração de STX nas cepas em diferentes salinidades.....	58
3.4 Exposição dos mexilhões à cianobactéria <i>C. raciborskii</i> (cepa LP2).....	61
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju tornou-se uma das espécies de cianobactérias mais estudadas no mundo, por ser potencialmente produtora de toxinas e devido ao aumento de sua ocorrência em ecossistemas aquáticos continentais de regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Padisák, 1997), mesmo sendo uma espécie de ambientes preferencialmente tropicais (Antunes et al., 2015). Seu sucesso ecológico é atribuído à alta plasticidade fenotípica (Bonilla et al., 2012).

No início deste século, a ocorrência de *C. raciborskii* foi relatada em um número crescente de países em ambos os hemisférios. Padisák (1997) apresentou uma proposta para a dispersão de *C. raciborskii*, apoiada em aspectos ecológicos e fisiológicos. Ecótipos de diferentes partes do mundo toleram amplos valores de temperatura (Everson et al., 2011), capazes de crescer em valores entre 17°C (Piccini et al., 2011) e 35°C (Briand et al., 2004), sendo este o maior valor em que ocorrem florações no ambiente (Soares et al., 2012).

C. raciborskii é também uma espécie tolerante a uma ampla gama de valores de radiação solar, tendo sido verificado o crescimento da mesma desde a faixa de algumas dezenas até algumas centenas de $\mu\text{mol.fótons. m}^2. \text{s}^{-1}$ (Mehnert et al., 2010), o que pode explicar a ocorrência e dominância da mesma em alguns habitats (Pierangelini et al., 2014).

Bonilla et al. (2012) determinaram que a média de pH em que *C. raciborskii* apresenta crescimento é de 8,2. Sabe-se também que esta espécie não tolera elevadas salinidades, apresentando ótimo crescimento em águas doces (Padisák, 1997). Os valores de salinidade acima de 8 são considerados limitantes para o crescimento de *C. raciborskii* (Moisander et al., 2012), embora a espécie seja capaz de crescer em águas salobras, especialmente se houver concentrações elevadas de minerais dissolvidos (Briand et al., 2002) ou enriquecimento em nutrientes (Calandrino e Paerl, 2011). Desta forma é possível indicar um potencial de invasão dessa espécie em ambientes de baixa salinidade, principalmente quando apresentam condições de eutrofização (Calandrino e Paerl, 2011). Calandrino e Paerl (2011) observaram que *C. raciborskii* foi tolerante até valores de salinidade 8 sendo este o maior valor relatado anteriormente por Moisander et al. (2002).

Assim como outras espécies de cianobactérias, *C. raciborskii* é conhecida por produzir toxinas (cianotoxinas), que podem apresentar sérios riscos para a saúde pública quando presentes em corpos d'água

utilizados para recreação e abastecimento (Lagos et al., 1999). Esta espécie produz dois tipos de toxinas: cilindropermopsina e saxitoxina (Burford et al., 2016), sendo que no Brasil há apenas registro de produção de saxitoxinas (Lagos et al., 1999; Yunes et al. 2003; Molica et al., 2005). A cilindropermopsina é produzida independentemente das condições ambientais e seu papel ecológico ou fisiológico ainda não está claro. Já as saxitoxinas são alcalóides que atuam bloqueando seletivamente os canais de sódio, afetando assim a geração de impulsos nervosos em seres humanos, podendo causar, em casos extremos, a morte por paralisia respiratória (Zingone e Enevoldsen, 2000). São os representantes mais potentes entre as toxinas paralisantes intoxicação por mariscos (Paralytic Shellfish Poisoning – PSP ou Saxitoxinas – STX) (Pomati et al., 2004).

Em ambientes com níveis moderados de salinidade, a espécie pode produzir este composto, evitando a perda de água da célula (Pomati et al., 2004). Brentano et al. (2016) observaram que aumentos na condutividade da Lagoa do Peri foram associados ao aumento na concentração de STX neste ambiente durante um curto período de tempo, apontando para uma resposta rápida às mudanças das condições deste ambiente. É provável que, as células de *C. raciborskii* ativam a biossíntese de STX como um mecanismo que funciona como resposta ao estresse causado por elevadas concentrações iônicas. A saxitoxina altera a permeabilidade da célula, contribuindo para a homeostase do organismo.

Pomati et al. (2003a) verificaram, através de experimentos de laboratório, que a diminuição de uma ordem de magnitude na concentração de sódio correspondeu a diminuição de uma ordem de magnitude nos níveis intracelulares de STX, sugerindo que esta toxina possui a função de manutenção da homeostase de cianobactérias que estejam sob condições de estresse de sódio. A STX bloqueia o canal de sódio podendo interferir nos fluxos iônicos de sódio e potássio e no metabolismo de células bacterianas, assim como células eucarióticas (Pomati et al., 2003b). Portanto, alterações de condutividade e salinidade no ambiente podem causar potenciais alterações na produção de STX por esta espécie (Antunes et al., 2015).

Esta toxina pode ser acumulada ao longo da cadeia trófica. Desta forma, todos os organismos aquáticos são vulneráveis à STX. Os organismos bivalves (mexilhões, mariscos e ostras) são os principais vetores de contaminação na cadeia trófica, pois são utilizados como fonte de alimento para o homem. Os bivalves são organismos sésseis que obtêm o alimento através da filtração da coluna d'água, acumulando

subseqüentemente toxinas nos seus órgãos digestivos e tecidos moles sem sofrer letalidade ou dano por isso, podendo haver somente uma diminuição nas taxas de filtração destes organismos quando ocorrem densas concentrações de toxinas (Gilfillan e Hansen, 1975). De acordo com as propriedades químicas das toxinas paralisantes produzidas por microalgas, a hidrossolubilidade distribui estas toxinas por todos os tecidos dos moluscos, onde são acumuladas em diferentes matrizes em diferentes órgãos dos animais (Schramm et al., 2006).

O mexilhão *Perna perna* é uma espécie de mitilídeo que ocorre no litoral brasileiro desde o estado do Espírito Santo até o estado do Rio Grande do Sul (Fernandes et al., 2008). Esta espécie possui grande importância econômica no setor da aquicultura, e é a única espécie de mitilídeo cultivada comercialmente no país, sendo que a maior produção ocorre no estado de Santa Catarina (Lopes e Fonseca, 2008).

Esta espécie apresenta atividade enzimática muito baixa quando comparada com outros organismos marinhos, característica que permite que compostos orgânicos como, por exemplo, as bifenilas policloradas (PCBs), sejam acumuladas em seus tecidos, refletindo a situação do ambiente, o que torna essa espécie adequada para utilização em programas de monitoramento ambiental (Taniguchi et al., 2008). Além disso, possui importância comercial e alimentícia.

Na Ilha de Santa Catarina, a cianobactéria *C. raciborskii* é recorrente na Lagoa do Peri (Hennemann e Petruccio, 2010), lagoa costeira utilizada para o abastecimento de água das regiões leste e sul da ilha. A lagoa está localizada 3 metros acima do nível do mar, e a água excedente escoar pelo Canal Sangradouro, transportando o fitoplâncton da lagoa até a Praia do Matadeiro.

Uma vez que *C. raciborskii* é um dos organismos transportados, é possível que a produção de STX pelas populações remanescentes esteja aumentando ao longo do percurso estuarino, antes de serem mortas pelo choque osmótico na água do mar adjacente. Também não se sabe sobre o destino da biomassa morta potencialmente tóxica dessas populações no ambiente marinho.

A finalidade deste trabalho foi compreender o que ocorre com a produção de STX por *C. raciborskii*, uma vez que as populações são expostas a águas com condições de salinidade moderada a elevada (8-35), bem como verificar se a biomassa potencialmente tóxica pode afetar componentes ecológicos da zona costeira adjacente a Lagoa do Peri, inclusive possíveis cultivos de moluscos marinhos (mexilhão *P. perna*) que podem ser instalados nesta praia. Os procedimentos

envolveram um monitoramento ambiental na área de estudo, experimentos de tolerância de cepas de *C. raciborskii* à salinidade e de avaliação da influência da salinidade na produção de STX. Também foram realizados bioensaios com mexilhões *P. perna* submetidos à alimentação com *C. raciborskii* para verificar a bioacumulação de STX.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Identificar o que ocorre com a produção de saxitoxinas por *C. raciborskii*, uma vez que as populações são expostas a águas com condições de salinidade moderada a elevada (8-35), bem como verificar se a biomassa potencialmente tóxica pode afetar componentes ecológicos da zona costeira adjacente a Lagoa do Peri, na Praia do Matadeiro.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração de STX na água da área de estudo;
- Utilizando as três cepas (LP1, LP2 e T3) cultivadas no Laboratório de Ficologia (LAFIC-UFSC), verificar por meio de experimentos, o limite máximo de salinidade em que ocorre crescimento;
- Avaliar, por meio de experimentos em laboratório se a cianobactéria produz maior quantidade de toxinas quando submetida ao estresse salino;
- Verificar se mexilhões *Perna perna* submetidos a alimentação com cultivos de *C. raciborskii* acumulam STX e se essa acumulação sofre influência da salinidade.

2 METODOLOGIA

2.1 Área de estudo

A área de estudo está localizada no sul do Brasil, na região sudeste da Ilha de Santa Catarina (Figura 1). Abrange a Lagoa do Peri, o Canal Sangradouro e a Praia do Matadeiro. A Lagoa do Peri é cercada por encostas cobertas pela Mata Atlântica em suas margens sul, oeste e norte, e por uma restinga arenosa em sua margem leste, apresentando uma superfície de 5,7 km² e uma profundidade média de 7 metros, sem influência direta da água do mar (Henneman e Petrucio, 2010).

A Lagoa do Peri está situada 3 metros acima do nível do mar e o volume excedente de suas águas é direcionado para o oceano. O fluxo unidirecional segue pelo Canal Sangradouro, que ocorre sob a restinga arenosa, sendo este um contato contínuo entre a lagoa e o oceano. O Canal Sangradouro apresenta em média 7 metros de largura e 90 cm de profundidade (Oliveira, 2002).

A lagoa e arredores, incluindo toda a bacia de drenagem, estão localizados dentro do Parque Municipal da Lagoa do Peri, onde o uso e a ocupação humana são restritos desde 1981 (Hennemann e Petrucio, 2010). A Praia do Matadeiro, receptora do volume de água excedente da Lagoa do Peri, possui uma linha de costa que se orienta no sentido NO-SE com 1.200 metros de extensão, sendo guarnecida por promontórios rochosos e apresentando em seu extremo norte a desembocadura do Canal Sangradouro (Mazzer e Dillenburg, 2009).

Os 5 pontos amostrais foram distribuídos desde a Lagoa do Peri até a praia do Matadeiro. O ponto 1 está localizado na Lagoa do Peri onde é realizada a captação de água para abastecimento dos moradores do sul da Ilha de Florianópolis, pois é o ambiente onde *C. raciborskii* está presente de forma recorrente ao longo do ano. O ponto 2 está situado na ponte (sobre o Canal Sangradouro) já na parte urbana da praia da Armação. O Ponto 3, já bem próximo ao oceano, encontra-se junto a ponte de acesso entre as Praias da Armação e do Matadeiro. O ponto 4, localizado ao lado da passarela, caracteriza aproximadamente o local onde ocorre o encontro do Canal Sangradouro com o oceano. E por fim, o ponto 5 encontra-se na Praia do Matadeiro junto ao costão esquerdo da praia.

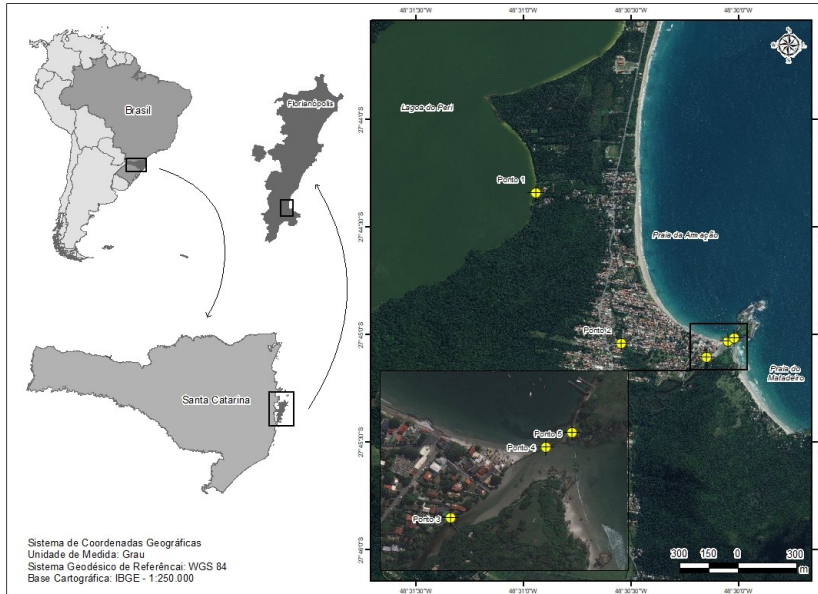


Figura 1. Área de estudo e pontos amostrais

2.2 Amostragens em campo

O monitoramento de campo foi realizado ao longo de 11 meses, nas datas: 6 de abril, 29 de junho, 2 de agosto, 22 de setembro, 31 de outubro e 29 de novembro de 2017 e 18 de janeiro e 16 de fevereiro de 2018. Nos 5 pontos amostrais definidos foram determinadas *in situ* as variáveis salinidade, temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), fluorescência de clorofila-a *in vivo* (CLA) e fluorescência de ficocianina *in vivo* (FIC). A salinidade foi determinada com refratômetro de mão, o oxigênio dissolvido e a temperatura da água foram medidas com um oxímetro de campo (MO-900). A fluorescência de clorofila-a (CLA) e de ficocianina (FIC) foi medida com um fluorímetro de campo (Turner Designs Hand Fluorometer), que apresenta os resultados em unidade bruta de fluorescência (RFU – raw fluorescence unit). Amostras de água foram coletadas para quantificação de STX e dados de pluviosidade foram obtidos do banco de dados da Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática (Florianópolis - São José) do Instituto Nacional de Meteorologia

(INMET) como informação complementar para contribuir na interpretação dos dados obtidos *in situ*.

Para análise de STX na água foram coletados aproximadamente 2 litros de água integral nos pontos de coleta 1, 3, 4 e 5. As amostras foram filtradas utilizando filtro de fibra de vidro (0,7 μm) até atingir a colmatação. O filtro foi armazenado em 10 mL de ácido clorídrico 0,5 M e posteriormente foi processado para análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

2.3 Cepas de *C. raciborskii*

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos com 3 cepas diferentes de *C. raciborskii*: LP1, isolada de uma amostra de água da Lagoa do Peri, Florianópolis, SC, no ano de 2006; LP2, isolada também de uma amostra da Lagoa do Peri, mas no ano de 2013; e T3, isolada de uma amostra de água do reservatório Taiaçupeba na cidade de São Paulo, Brasil, no ano de 1996. A cepa T3 foi utilizada como referência, uma vez que suas características ecofisiológicas e de toxicidade são bem conhecidas na literatura (Soto-Liebe et al., 2010). As cepas foram mantidas em meio de cultura Artificial Salt Medium (ASM-1) (Gorham *et al.*, 1964) a 22 ± 2 °C, fotoperíodo de 12h e irradiância de $60 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.4 Bioensaio de tolerância das cepas a salinidade

A tolerância das três cepas de *C. raciborskii* à salinidade foi determinada através de testes de inibição do crescimento celular, tipicamente utilizados em ecotoxicologia (ISO, 2012; Knie e Lopes, 2004). Foram testadas seis diferentes salinidades: zero (controle), 2, 4, 6, 8 e 10. Essas salinidades foram adotadas com base em dados de tolerância de outras cepas da espécie (Padisák, 1997, Moisander *et al.*, 2012, Briand *et al.*, 2002, Calandrino e Paerl, 2011). Os testes foram realizados em erlenmeyers de 250 ml em triplicata para cada tratamento. As diferentes salinidades foram preparadas utilizando água destilada e uma solução de salmoura (água do mar previamente filtrada e concentrada) de salinidade 70. Após a preparação de cada concentração foram adicionadas as soluções que compõem o meio ASM-1 com volumes previamente calculados para 450 mL (150 mL em cada erlenmeyer). Os inóculos das 3 cepas eram cultivos em fase exponencial de crescimento. O experimento teve a duração de 10 dias. Todos os testes foram conduzidos nas condições de manutenção das cepas citadas

acima. O crescimento foi determinado através da medição da fluorescência de clorofila-a *in vivo*, da fluorescência de ficocianina *in vivo* (ambas utilizando o fluorímetro de campo Turner Designs Hand Fluorometer) e da turbidez dos frascos experimentais (utilizando o Fluorímetro Turner Trilogy). As leituras foram realizadas, no momento da inoculação (t_0), e após 24, 72, 96, 168 e 240 h de exposição às diferentes salinidades. A partir das leituras de fluorescência e turbidez *in vivo* foram calculadas as taxas de crescimento em 96, 168 e 240 h por meio da equação exponencial (equação 1):

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} \quad (1)$$

Onde:

μ é a taxa de crescimento;

N_0 é a leitura inicial de fluorescência ou turbidez;

N_n é a leitura final de fluorescência ou turbidez;

t_n é o tempo entre a medida final e inicial do teste (de 96 a 240 h).

Com as taxas de crescimento foram determinados os percentuais de inibição de crescimento de cada concentração salina em relação ao controle (equação 2). A maior concentração salina que se apresentou significativamente igual ao controle foi considerada o CEO (concentração de efeito observado).

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i \times 100}{\mu_c} \quad (2)$$

Onde:

$I_{\mu i}$ é o percentual de inibição do crescimento em relação ao controle na concentração i ;

μ_i é a taxa de crescimento médio na concentração i ;

μ_c é a taxa de crescimento para o controle.

Com os dados de percentual de inibição foi calculado para cada cepa a Concentração Efetiva Mediana (CE_{50}), que é a concentração salina que gera diminuição de 50% na taxa de crescimento em relação ao controle (salinidade 0). A CE_{50} vem a ser o ponto de inflexão da

curva de dose-resposta, determinada através do método de interpolação Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977).

2.5 Teste de influência da salinidade sobre a produção de STX

Após a determinação da máxima salinidade de crescimento no teste acima descrito, as três cepas foram cultivadas em triplicata ao longo de 16 dias nas três salinidades em que houve crescimento (0, 4 e 6) para posterior análise e verificação da possível influência da salinidade sobre a produção de STX. Os cultivos foram realizados em triplicata utilizando 500 mL de meio ASM-1 previamente preparado nas respectivas salinidades. Ao final do período de cultivo, 400 ml foram filtrados em filtros de fibra de vidro (0,7 μm de porosidade e 47 mm de diâmetro). Os filtros foram armazenados em 10 mL de ácido clorídrico 0,5M para posterior análise de STX. O volume restante (100 ml) foi filtrado para extração de clorofila-a utilizando filtros de fibra de vidro (0,7 μm de porosidade e 25mm de diâmetro). Para a determinação da concentração de clorofila-a extraída, as amostras de cultivo foram filtradas em filtros de fibra de vidro 0,7 μm e 25mm de diâmetro. Os filtros foram colocados em tubos de ensaio e adicionados 10 ml de acetona 90%. Após foram agitados em vórtex e armazenados a temperatura de 4°C por 24 horas para a extração da clorofila-a. Ao término das 24 horas, os tubos de ensaio foram centrifugados por 5 minutos em rotação 1500 rpm e lidos em fluorímetro Turner Trilogy previamente calibrado.

2.6 Bioensaio de acumulação de STX em mexilhões

Mexilhões adultos da espécie *Perna perna* foram coletados da área de cultivo experimental da UNIVALI (Universidade do Vale do Itajaí), localizada na Enseada da Armação do Itapocorói, no município de Penha – SC. Foram selecionados indivíduos de 5 a 7 cm e aclimatados em três diferentes salinidades (22, 26 e 30) por sete dias. A aclimação foi conduzida em frascos de vidro com 2 litros de água do mar filtrada com as salinidades previamente ajustadas. Cinco indivíduos em cada uma das salinidades foram alimentados com a cepa LP2 de *C. raciborskii* em fase exponencial de crescimento. Outros cinco indivíduos em cada uma das salinidades foram alimentados com a microalga *Nannocloropsis oculata*, uma cepa microalgal não tóxica de uso convencional na alimentação de mexilhões, a fim de obter o controle. O tempo de exposição foi de sete dias.

Ao longo dos 14 dias (aclimatação + teste) todos os indivíduos foram mantidos sob aeração constante e a água foi trocada diariamente antes da alimentação. Após a exposição, todos os indivíduos foram alimentados separadamente com a microalga *Nannocloropsis oculata* por 1 hora a fim de obter a taxa de filtração de cada indivíduo. Foram medidos os valores de clorofila-a *in vivo* no início e no fim do período. Registrou-se o peso de cada indivíduo com as valvas. Após, as valvas foram removidas e o peso de cada indivíduo foi novamente obtido utilizando uma balança analítica. O músculo de cada indivíduo foi armazenado em ácido clorídrico 0,5M em frascos devidamente identificados para posterior quantificação de STX em HPLC.

Para cada indivíduo foi calculada a taxa de filtração utilizando os valores de fluorescência de clorofila-a *in vivo* (CLA) obtidos no início e no fim do período de alimentação com *Nannocloropsis oculata*, segundo a metodologia utilizada por Resgalla Jr. et al. (2006). Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula:

$$TF = \frac{V}{N} \left[\frac{CLA_{t0} - CLA_{t1}}{\Delta T} \right] - f = 0$$

Onde:

TF é a taxa de filtração em L.h⁻¹;

V é o volume do frasco utilizado;

N é o número de organismos por frasco;

CLA_{t0} Fluorescência de clorofila *in vivo* no momento inicial;

CLA_{t1} Fluorescência de clorofila *in vivo* no momento final;

ΔT é o tempo de intervalo do teste em horas;

f é o fator de correção do fitoplâncton (taxa de decantação).

2.7 Quantificação da concentração de STX utilizando HPLC

A análise de STX foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas (LCF) da Universidade Federal do Rio Grande, com as amostras do músculo de mexilhão provenientes dos testes de salinidade e com as amostras de água do ambiente. Foi utilizado o protocolo através da aplicação da técnica de duas fases móveis de Rourke et al. (2008). Os filtros foram transferidos para tubos tipo Falcon de 15 mL, e o volume de ácido clorídrico utilizado para acondicionamento era medido. Os tubos assim preparados eram sonicados em 3 ciclos de 30 segundos, com intervalo de mesmo tempo entre os ciclos. Em seguida, os tubos eram centrifugados a 6.000 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante retirado e passado para novos tubos Falcon. Aos tubos originais contendo os filtros, adicionava-se 3 ml de ácido clorídrico 0,5M e sonicava-se novamente em 3 ciclos de 30 segundos, com intervalo de mesmo tempo entre os ciclos e subsequente centrifugação. Este sobrenadante era então misturado com o primeiro sobrenadante e o volume total era filtrado em filtro de acetato de celulose de 0,45µm.

Para as amostras de mexilhão foi utilizado o método AOAC (2011). Eram pesados 5 g de amostra em tubos *Falcon* de 15 mL previamente identificados. A estes tubos eram adicionados 5 ml de ácido acético P.A. (CH₃COOH), com posterior agitação em vórtex. As amostras assim preparadas eram mantidas em banho maria por 5 min a 100 °C, com posterior resfriamento a temperatura ambiente. Em seguida, os frascos eram centrifugados a 3000 rpm por 10 min. Posteriormente as amostras foram submetidas a desproteínização, quando foram adicionados 25 µL de ácido Tricloroacético (TCA) 30%, agitadas em vórtex e centrifugadas a 16.000 rpm por 5 minutos.

As amostras processadas (água e músculo de mexilhão) foram então analisadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com derivatização pós-coluna e detecção por fluorescência para a quantificação de saxitoxinas. A cromatografia, separação de moléculas presentes em misturas complexas de acordo com sua afinidade a diferentes substratos, foi realizada em um sistema HPLC (Shimadzu, Japan), que consiste em uma controladora CBM 20A, um detector de Fluorescência RF-10Axl (excitação 330nm e emissão 390 nm), duas bombas binárias LC-20AD e um forno de coluna CTO-20A controlados através do software Labsolution 5.41.240. Para as reações de pós derivatização foi utilizada uma bomba quaternária LC-10AD controlada manualmente e um sistema de banho (Nova técnica, modelo NT 245),

com temperatura controlada a 80°C. A coluna analítica utilizada para as análises foi Zorbax Bonus-RP C8 (150 x 4,60mm, 5 µm) marca Agilent®.

Para a realização das análises em HPLC foram preparados os eluentes A (GTX1 a 5), consistindo o heptanosulfonato de sódio 11 mM, ácido fosfórico 5,5mM com pH ajustado para 7,1 e B (Neo-STX, de-STX, STX), consistindo o heptanosulfonato de sódio 11mM, ácido fosfórico 16,5mM e acetonitrila 11,5 % (v/v), pH 7,1. O fluxo foi de 1 mL/min. Para esta análise, padrões dos análogos das Gonyautoxinas (GTX-1, GTX-2, GTX-3, GTX-4 e GTX-5) e três saxitoxinas, neosaxitoxina (NeoSTX), decarbamoilsaxitoxina (DcSTX), além do padrão da saxitoxina (STX).

A concentração final encontrada em cada amostra foi determinada pelo total de cada variante calculado a partir da área dos picos encontrados nas amostras com base no padrão utilizado, levando em conta a toxicidade relativa de cada variante já definida na literatura, obtendo-se então a concentração total de STX equivalente em cada amostra. Os padrões, materiais de referência certificados, foram obtidos da *National Research Council Canadá (NRC)*.

2.8 Procedimentos estatísticos

Os dados ambientais foram submetidos a análises de correlação linear. Uma vez que as análises de STX foram realizadas apenas na segunda metade das amostragens (a partir de setembro), os resultados foram apresentados em duas tabelas de correlação, uma sem os dados de STX (n=40) e outra com os dados de STX (n=20).

No experimento de tolerância a salinidade os dados de taxa de crescimento gerados foram testados quanto à normalidade (teste Chi-quadrado) e homogeneidade (teste de Hartley para homogeneidade de variâncias), antes de serem submetidos à ANOVA bifatorial (fatores salinidade e tempo) para identificar as concentrações que determinaram efeito significativamente diferente do controle. Os mesmos procedimentos estatísticos foram executados com os dados de influência da salinidade sobre a produção de STX, tentando verificar se houve diferenças significativas nas concentrações produzidas entre o controle e as demais salinidades testadas.

No experimento de alimentação de mexilhões com *C. raciborskii* (alga produtora de saxitoxina) e *N. occultata* (alga não produtora de toxina), onde foram gerados dados de taxa de filtração e de acumulação de STX pelos mexilhões, foram realizadas ANOVAs (*one*

way) em separado para cada variável, comparando todos os tratamentos, aplicando-se teste de Tukey de comparações múltiplas. As análises estatísticas foram realizadas com o aplicativo GraphPad Prism.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Dados ambientais:

As oito amostragens realizadas entre abril de 2017 a fevereiro de 2018 tiveram a função de monitorar os dados ambientais para eventuais correlações com dados de concentração de STX.

A temperatura da água variou entre 18,7°C e 30,2°C, com os menores valores ocorrendo em junho e os maiores em fevereiro. Entre as estações amostrais, o maior valor médio foi verificado na Lagoa do Peri (#1) e o menor na Praia do Matadeiro (#5), sob influência do mar (Figura 2).

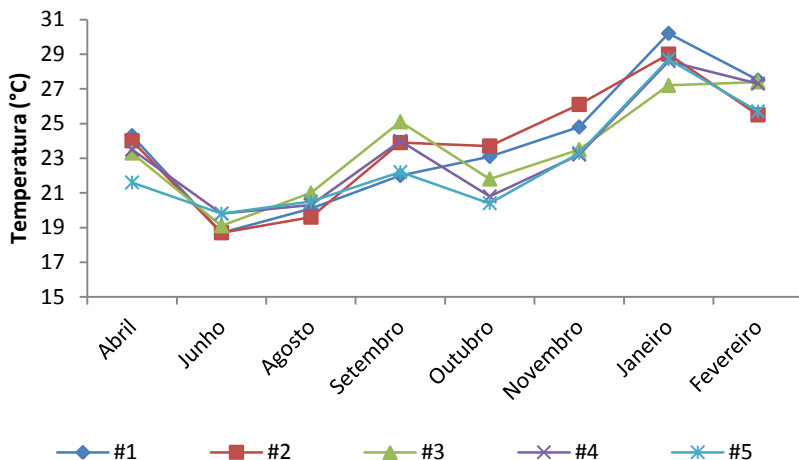


Figura 2: Temperatura da água nos pontos amostrais ao longo do período monitorado.

Em relação à salinidade os valores mostram claramente a presença ou ausência de influência marinha nas diferentes estações, onde os valores foram sempre zero nos pontos #1 e #2, e variaram de zero a 35 nos pontos #3, #4 e #5 (Figura 3).

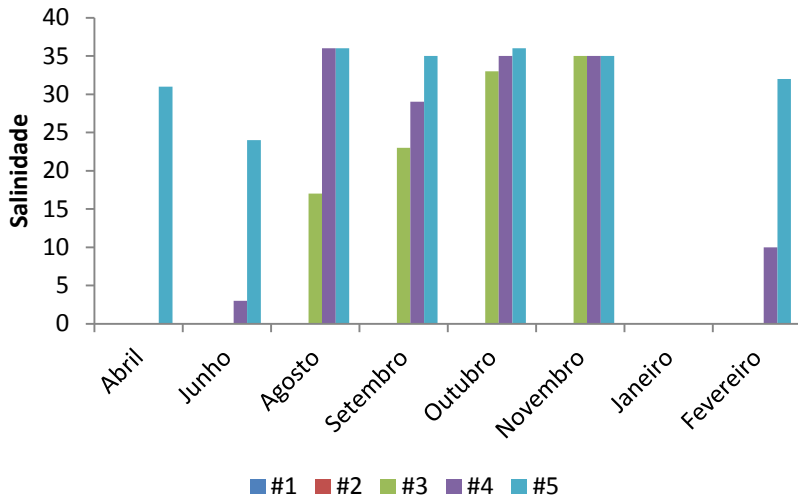


Figura 3: Salinidade da água nos pontos amostrais ao longo do período monitorado.

Na coleta realizada no mês de janeiro, todos os pontos amostrais apresentaram salinidade 0, inclusive o ponto #5 localizado na Praia do Matadeiro. Isso aconteceu devido ao grande volume de chuvas (Figura 4) que ocorreu na região neste período (377,6 mm). O volume acumulado nos sete dias antecedentes à coleta foi de 111 mm. A Lagoa do Peri (#1) apresentava elevada vazão, sendo esta uma típica situação onde a toxicidade das cianobactérias ocorrentes na Lagoa do Peri poderia atingir o ecossistema marinho adjacente.

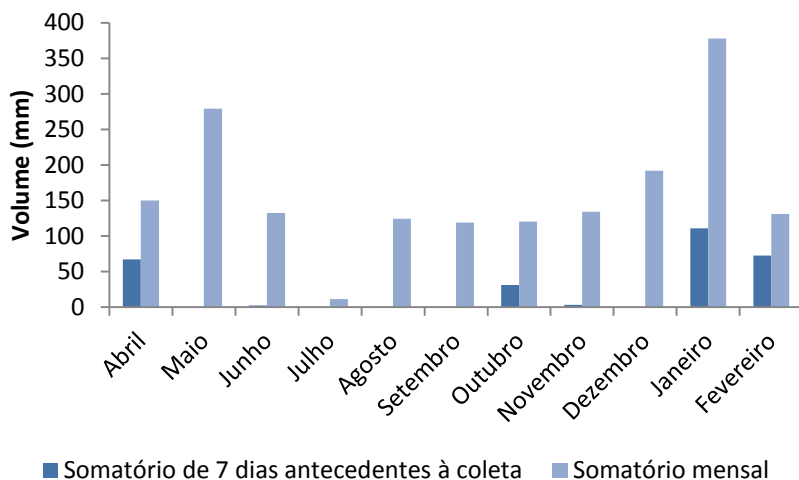


Figura 4: Precipitação pluviométrica na área de estudo ao longo do período amostrado. Os dados são apresentados em somatório mensal e em somatório dos sete dias que antecederam a coleta.

Os valores de oxigênio dissolvido (Figura 5) apresentaram-se elevados (6,7 a 8 mg.L⁻¹) nos pontos #1, #3, #4 e #5 em quase todas as amostragens, exceto no mês de setembro quando os valores foram próximos a 4 mg.L⁻¹ nos mesmos pontos.

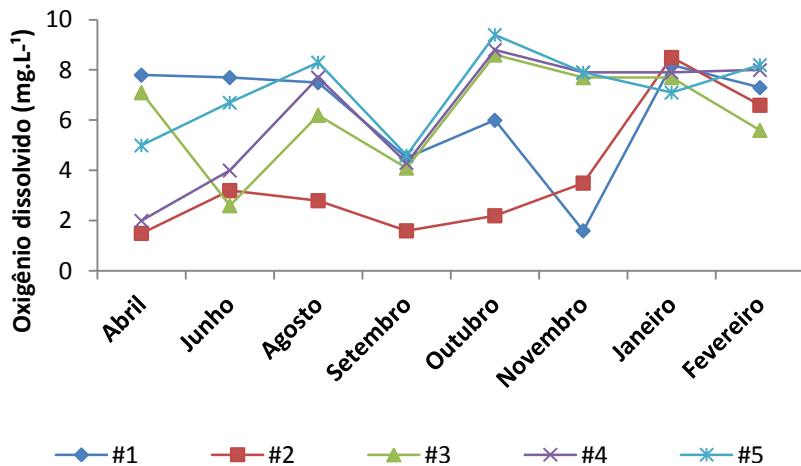


Figura 5: Oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) nos pontos amostrais ao longo do período monitorado.

Os valores apresentaram-se baixos ($1,5$ a $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$) nos meses de outono, inverno e primavera no ponto #2. Já nos meses de verão (janeiro e fevereiro) no mesmo ponto, os valores apresentaram-se elevados (8 e $6,6 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente). Neste ponto amostral, foi possível observar a presença de efluente doméstico durante todas as coletas devido ao lançamento clandestino pelas residências que estão localizadas nas margens do Canal Sangradouro. Os maiores valores observados no verão podem estar associados aos maiores volumes de chuva que ocorreram na região na estação do verão. Os valores de clorofila *in vivo* (CLA) variaram em geral entre 50 a 150 RFU ao longo do período monitorado, exceto em setembro no ponto #3 e em novembro no ponto #2, apresentando os valores $448,9$ e $305,7 \text{ RFU}$ respectivamente (Figura 6).

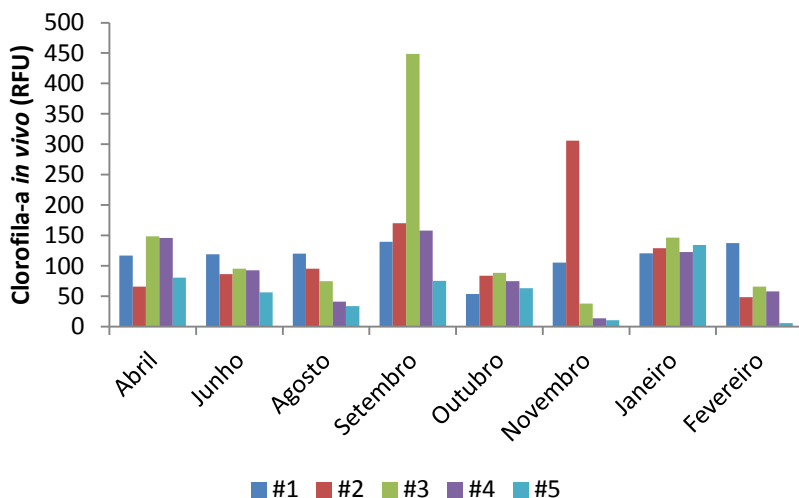


Figura 6: Fluorescência de clorofila-a *in vivo* nos pontos amostrais ao longo do período monitorado.

A ficocianina *in vivo* (FIC) apresentou valores entre 3 a 49,5 RFU (Figura 7) com destaque para os maiores valores sempre no ponto #1, forte indicativo da presença e abundância da cianobactéria *C. raciborskii* por este ser um pigmento característico das cianobactérias. Os valores de FIC foram, em geral, menores em direção ao mar, porém destacam-se os valores mais elevados na zona estuarina (#3 e #4) e praia do Matadeiro (#5) no mês de janeiro, indicando também a forte influência das chuvas no período, que transferiu de forma conspícua a biomassa de cianobactérias para os ecossistemas costeiros.

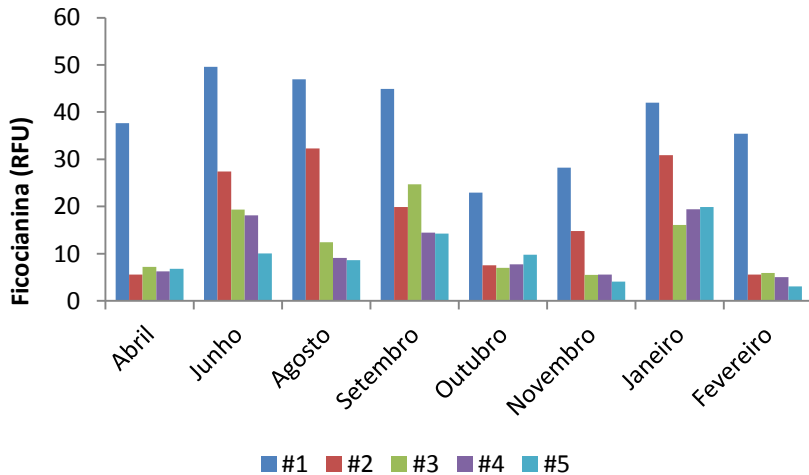


Figura 7: Fluorescência de ficocianina *in vivo* (RFU) nos pontos amostrais ao longo do período monitorado.

Em relação à concentração de STX nas amostras ambientais (Figura 8), que foi quantificada somente a partir de setembro de 2017, percebe-se que em todos os pontos amostrais e todas as amostragens realizadas houve concentrações detectáveis de STX. Em geral os valores foram maiores nos pontos #1 (Lagoa do Peri) e #3 (zona estuarina), evidenciando que a carga tóxica pode efetivamente chegar à zona estuarina e manter-se suficientemente ativa para ser detectada. Os valores bem mais elevados verificados na amostragem de janeiro de 2018 estão também relacionados à elevada pluviosidade e ao período de verão, com maiores concentrações de *C. raciborskii* na Lagoa (#1). Percebe-se claramente que nessas condições de elevada pluviosidade a carga tóxica afeta toda a área de estudo.

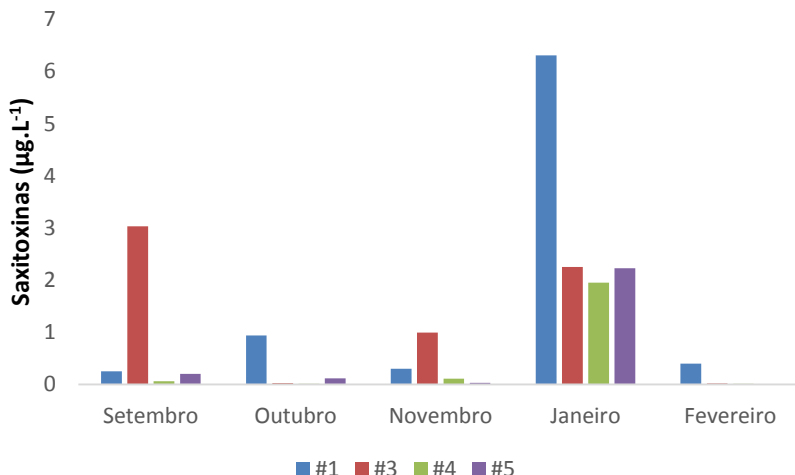


Figura 8. Concentração de STX presente na água da área de estudo entre os meses de setembro de 2017 e fevereiro de 2018.

Considerando o conjunto de dados ambientais sem a variável concentração de STX, as análises de correlação linear demonstraram relações entre variáveis físico-químicas e ambientais, como foi o caso de salinidade com oxigênio dissolvido ($r=0,408$), pluviosidade com temperatura da água ($r=0,762$), salinidade ($r=-0,350$) e oxigênio dissolvido ($r=0,323$). CLA e FIC apresentaram fraca correlação positiva ($r=0,336$), evidenciando certa dependência entre essas variáveis, o que pode ser explicado pelo domínio de *C. raciborskii* na maior parte das amostras. FIC também demonstrou considerável relação negativa com a salinidade, o que é explicado pela origem das cianobactérias a partir das águas da Lagoa do Peri (Tabela 1). Na análise de correlação entre as amostras com dados de concentração de STX, os padrões entre variáveis ambientais e físico-químicas foram similares, assim como a relação positiva entre CLA e FIC e negativa entre salinidade e FIC (Tabela 2). Porém, chama a atenção correlações significativas da concentração de STX com temperatura da água ($r=0,611$), CLA ($r=0,445$), FIC ($r=0,529$) e pluviosidade ($r=0,499$). Essas relações confirmam a origem da toxicidade a partir das populações de cianobactérias presentes na Lagoa do Peri (#1) e a sua clara dependência com a temperatura da água e com a

pluviosidade, evidenciando que períodos mais quentes e chuvosos aumentam a possibilidade de toxicidade tanto nas águas da Lagoa do Peri, como já descrito em outros trabalhos (Hennemann e Petrucio, 2010, Moser, 2012 e Hennemann e Petrucio, 2016) como nas águas a jusante da lagoa, incluindo as estuarinas e marinhas, pois a temperatura aumenta a taxa reprodutiva da espécie e a elevada pluviosidade intensifica o transporte das águas excedentes da lagoa para o mar.

Tabela 1. Correlações entre os dados ambientais monitorados em todo o período amostral (8 amostragens). Os coeficientes apresentados em negrito indicam correlações significativas.

	Temperatura da água	Salinida de	Oxigênio dissolvido	Clorofila-a <i>in vivo</i>	Ficocianina <i>in vivo</i>
Temperatura da água	-				
Salinidade	-0,304 (0,055)	-			
Oxigênio dissolvido	0,170 (0,294)	0,408 (0,001)	-		
Clorofila-a in vivo	0,243 (0,130)	-0,298 (0,061)	-0,312 (0,051)	-	
Ficocianina in vivo	-0,010 (0,950)	-0,522 (0,001)	-0,034 (0,833)	0,336 (0,033)	-
Pluviosidade	0,762 (0,000)	-0,350 (0,026)	0,323 (0,041)	-0,023 (0,885)	-0,044 (0,786)

Tabela 2. Correlações entre os dados ambientais incluindo-se a concentração ambiental de STX, que foi monitorada somente a partir de setembro de 2017 (5 amostragens). Os coeficientes apresentados em negrito indicam correlações significativas.

	Temperatura da água	Salinidade	Oxigênio dissolvido	Clorofila-a in vivo	Ficocianina in vivo	Saxitoxina
Temperatura da água	-					
Salinidade	-0,683 (0,0009)	-				
Oxigênio dissolvido	0,026 (0,912)	0,291 (0,212)	-			
Clorofila-a in vivo	0,197 (0,405)	-0,219 (0,353)	-0,427 (0,060)	-		
Ficocianina in vivo	0,291 (0,211)	-0,650 (0,001)	-0,409 (0,072)	0,456 (0,043)	-	
Saxitoxina	0,611 (0,004)	-0,406 (0,075)	0,071 (0,736)	0,445 (0,049)	0,529 (0,016)	
Pluviosidade	0,801 (0,000)	-0,586 (0,006)	0,439 (0,052)	-0,035 (0,880)	0,124 (0,600)	0,499 (0,025)

Hennemann e Petrucio (2010) observaram que as variáveis temperatura, direção e intensidade do vento e o regime pluviométrico explicam as variações sazonais que são típicas do clima subtropical incidente sobre a Ilha de Santa Catarina. Utilizando índices de estado trófico, Hennemann e Petrucio, 2010 classificaram a Lagoa do Peri como oligotrófica para concentração de nutrientes e meso-eutrófica para clorofila-a, e atribui esta última classificação às elevadas densidades da cianobactéria *C. raciborskii* e também às altas taxas de reciclagem observadas em corpos d'água mais quentes, quando comparados com os temperados.

Moser, 2012 realizou uma avaliação toxicológica da água da Lagoa do Peri por meio de testes ecotoxicológicos, citotóxicos e genotóxicos. Os resultados obtidos pela autora apresentaram toxicidade aguda para *Daphnia magna* e efeitos genotóxicos induzindo a formação de micronúcleos em peixes. Em seu trabalho, Moser, 2012 alerta sobre a necessidade de orientar as autoridades para a presença de cianotoxinas na água e conseqüentemente para a necessidade de programas de monitoramento e melhorias nas técnicas de tratamento da água para a remoção das cianotoxinas presentes na Lagoa do Peri.

Calijuri et al., 2006 afirmaram que a simples presença de uma substância tóxica na água pode não ser um risco para a população, uma vez que vários fatores podem influenciar o potencial tóxico e a ação das toxinas nos organismos após a dispersão das mesmas no ambiente. Tais fatores podem ser: as interações com outras substâncias dissolvidas,

os processos de degradação e biodegradação naturais, o transporte entre os compartimentos do ecossistema, as vias de contaminação e o tempo de contato com os organismos, a dominância da substância tóxica nos organismos e sua ação nos sítios de ação (Calijuri et al., 2006).

Hennemann e Petrucio, 2016 também observaram a dominância de *C. raciborskii* na Lagoa do Peri, constatando que esta cianobactéria apresenta importantes mecanismos de adaptação que determinam seu sucesso em um ambiente oligo-mesotrófico, contrariando o que geralmente acontece em ambientes eutrofizados que apresentam elevada concentração de nutrientes que incentivam o sucesso e desenvolvimento de cianobactérias e outros produtores primários. Além disso, Hennemann e Petrucio 2016 também consideraram a Lagoa do Peri potencialmente limitada por fósforo (P) durante a maior parte do período de estudo e encontrou uma correlação positiva entre as concentrações de clorofila-a e de fósforo. Também constatou que a biomassa fitoplanctônica foi aparentemente controlada pela temperatura da água e pela disponibilidade de fósforo (razões N:P e P dissolvido), atribuindo grande importância aos fatores climáticos, especialmente a temperatura.

Brentano et al., 2016 observaram que os aumentos da condutividade na Lagoa do Peri foram associados a um aumento da concentração de STX neste ambiente durante um curto período de tempo, indicando uma resposta rápida às mudanças nas condições do ambiente. Além disso, constataram que o provável mecanismo subjacente ao aumento de concentração de STX com aumento da condutividade pode ser explicado pela biossíntese de STX como resposta ao estresse causado por altas concentrações iônicas indicadas pela alta condutividade. Em laboratório, testes observaram que a diminuição de uma ordem de grandeza na concentração de Na^+ corresponde na diminuição em uma ordem de magnitude dos níveis intracelulares de STX (Pomati et al., 2003a), sugerindo que o papel da STX pode estar ligado a manutenção da homeostase de cianobactérias sob condições de elevada condutividade (Pomati et al., 2003a, Pomati et al. 2004).

3.2 Tolerância das cepas a salinidade

A avaliação da tolerância a salinidade pelo uso de 3 variáveis diferentes de medição da biomassa (clorofila-a *in vivo*, ficocianina *in vivo* e turbidez) apresentou resultados em geral equivalentes. O

desenvolvimento de um padrão exponencial de crescimento em todos os testes se deu a partir de 96 h, e por esta razão foram geradas taxas de crescimento para todas as cepas e nas três variáveis avaliadas em 96 h, 168 h e 240 h. A observação do crescimento dessa maneira permitiu evidenciar graficamente o efeito da salinidade na limitação do crescimento das cepas. A partir desses dados foram gerados os percentuais de inibição de crescimento para então calcular as concentrações efetivas medianas (CE_{50}) para cada cepa.

A cepa LP1 apresentou taxas de crescimento positivas e sem diferenças significativas ($p < 0,05$) nas salinidades 0, 2 e 4; e taxas de crescimento negativas nas salinidades 6, 8 e 10, sendo que o valor na salinidade 10 foi significativamente diferente dos valores nas salinidades 6 e 8, por ser mais negativo. Esse padrão foi similar entre os três tempos de crescimento avaliados (96 h, 168 h e 240 h) e as três variáveis de biomassa analisadas (CLA, FIC e TUR) (Figuras 9, 10 e 11).

A cepa LP2 apresentou taxas de crescimento negativas a partir da salinidade 8 nos três tempos de crescimento e nas três variáveis analisadas. Os valores não diferiram significativamente entre as salinidades 0, 2, 4, e 6 para CLA em 96h e entre as salinidades 0, 2 e 4 para CLA em 168 h e 240 h. Ou seja, com o aumento do tempo de crescimento a salinidade 6 gerou efeito negativo no crescimento, não verificado em 96 h (Figura 12). Isso indica que a cepa LP2 apresentou maior tolerância à salinidade do que LP1. A avaliação usando FIC mostrou taxas de crescimento sem diferença significativa nas salinidades 0, 2 e 4 para os tempos 96 h e 168 h, sendo que a taxa de crescimento negativa na salinidade 10 foi significativamente diferente das taxas em todas as demais salinidades nesses dois tempos de crescimento. A taxa de crescimento na salinidade 0 se mostrou significativamente diferente de todas as demais no tempo de 240 h (Figura 13).

Na avaliação das taxas de crescimento usando TUR, os resultados tiveram um padrão similar ao apresentado na avaliação com CLA, confirmando tolerância dessa cepa a salinidade 6 (Figura 14). Curiosamente, essa cepa é mais tóxica que a cepa LP1, como já definido em estudos anteriores (Miotto et al., 2017). Ou seja, LP2 parece ter uma propensão a maior produção de STX o que justificaria de certo modo a sua maior tolerância à quantidade de íons no meio. A cepa T3 mostrou taxas de crescimento sem diferenças significativas nas salinidades 0, 2 e 4 para CLA no tempo de 96h (Figura 15). Já nos tempos de 168 h e 240 h também houve crescimento significativo na salinidade 6. O mesmo

padrão foi verificado através da análise pela FIC (Figura 16). Esses resultados mostram que com o maior tempo de crescimento a cepa mostrou mais tolerância a salinidade 6. Na avaliação utilizando a TUR dos cultivos não houve diferença significativa entre os crescimentos nas salinidades 0, 2 e 4 para todos os tempos de crescimento avaliados, porém em 240 h, as taxas nas salinidades 2 e 4 não mostraram diferenças também com a salinidade 6 (Figura 17).

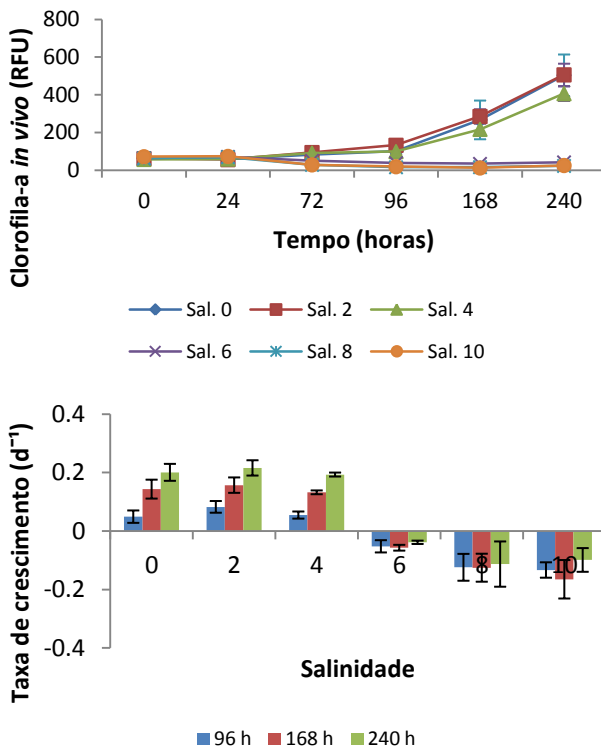


Figura 9: Curva de crescimento da cepa LP1 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de clorofila-a *in vivo* (CLA) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).

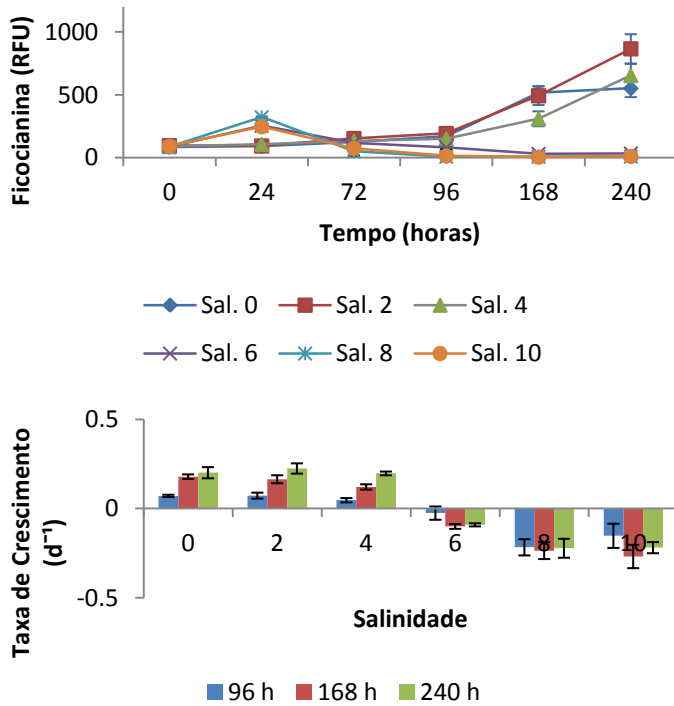


Figura 10: Curva de crescimento da cepa LP1 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de ficocianina *in vivo* (FIC) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).

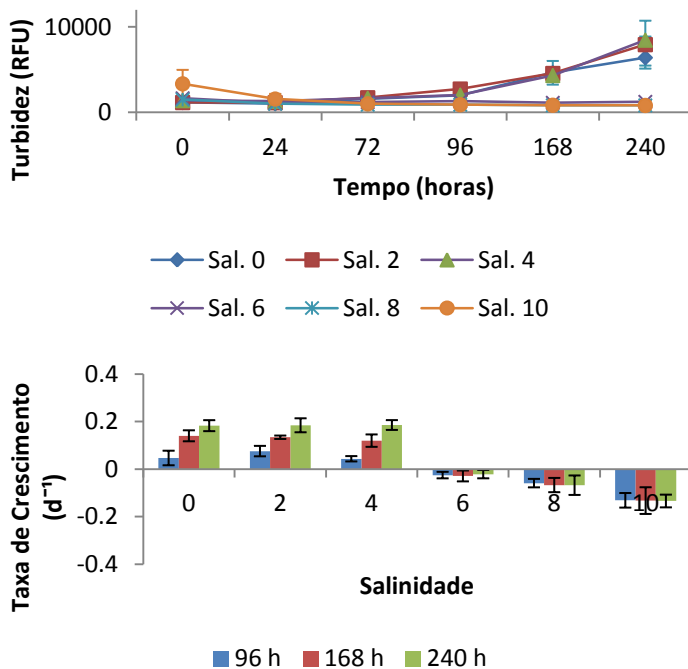


Figura 11: Curva de crescimento da cepa LP1 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de turbidez (TUR) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).

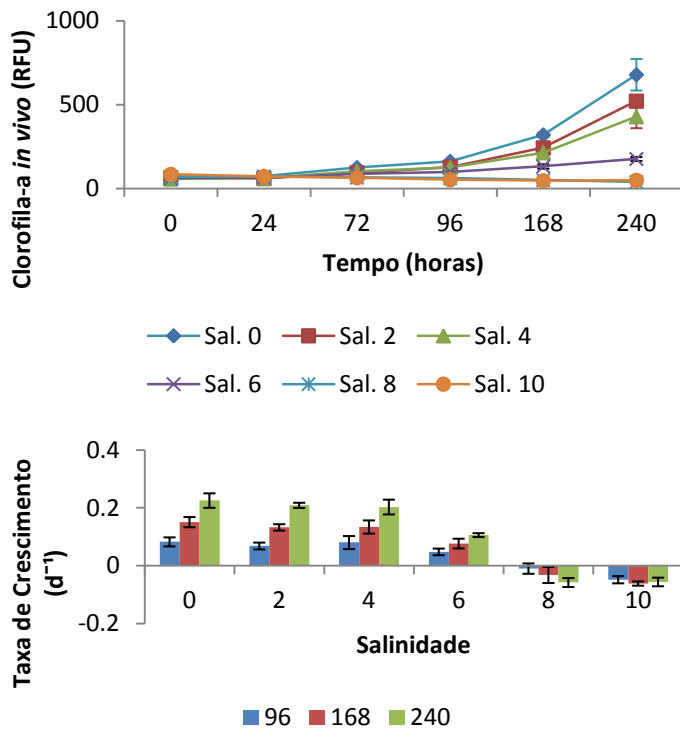


Figura 12: Curva de crescimento da cepa LP2 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de clorofila-a *in vivo* (CLA) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).

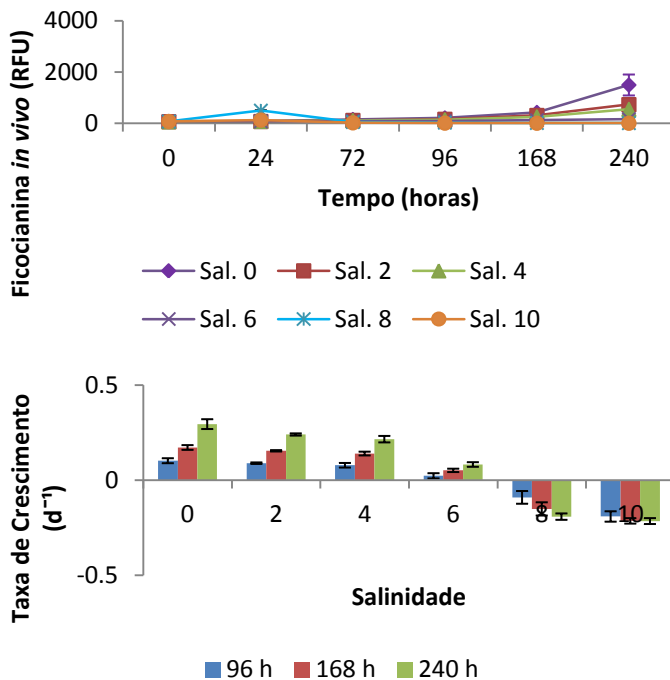


Figura 13: Curva de crescimento da cepa LP2 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de ficocianina *in vivo* (FIC) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).

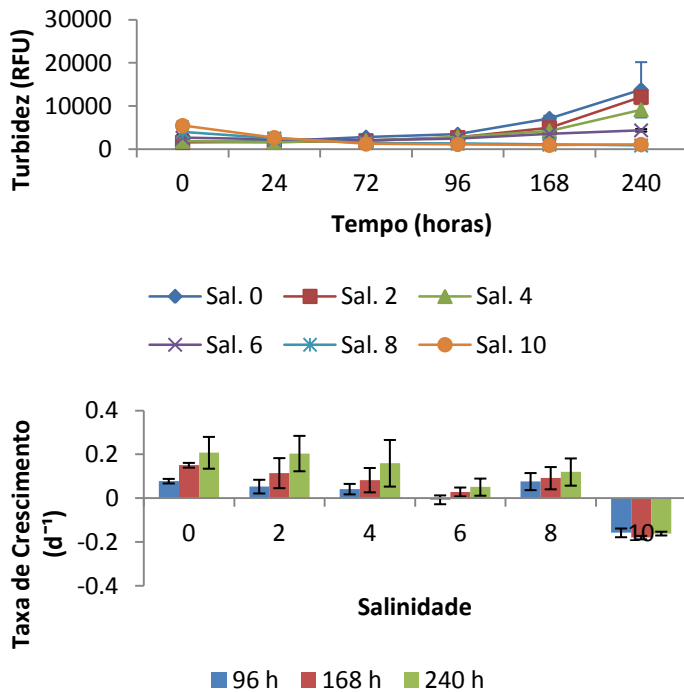


Figura 14: Curva de crescimento da cepa LP2 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de turbidez (TUR) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).

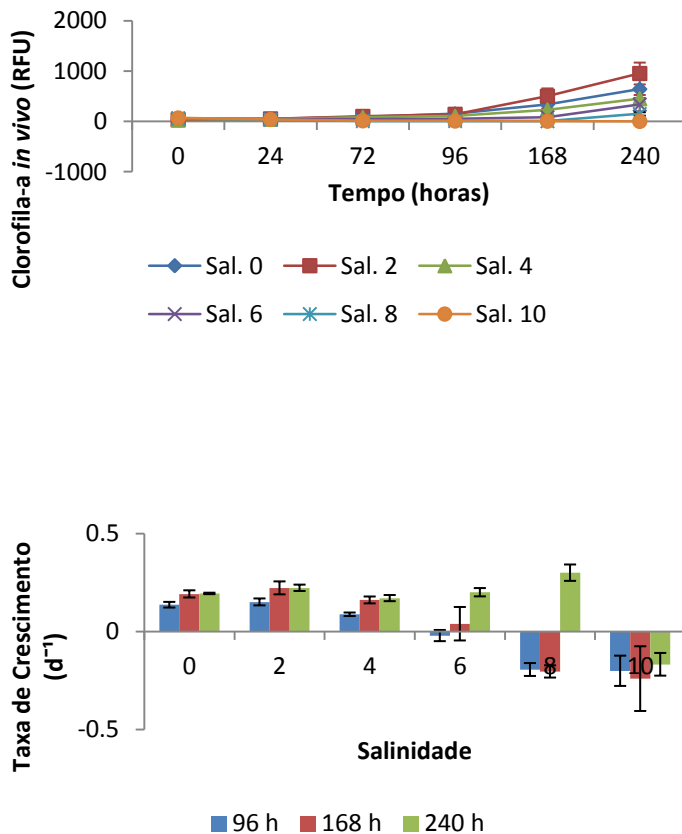


Figura 15: Curva de crescimento da cepa T3 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de clorofila-a *in vivo* (CLA) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).

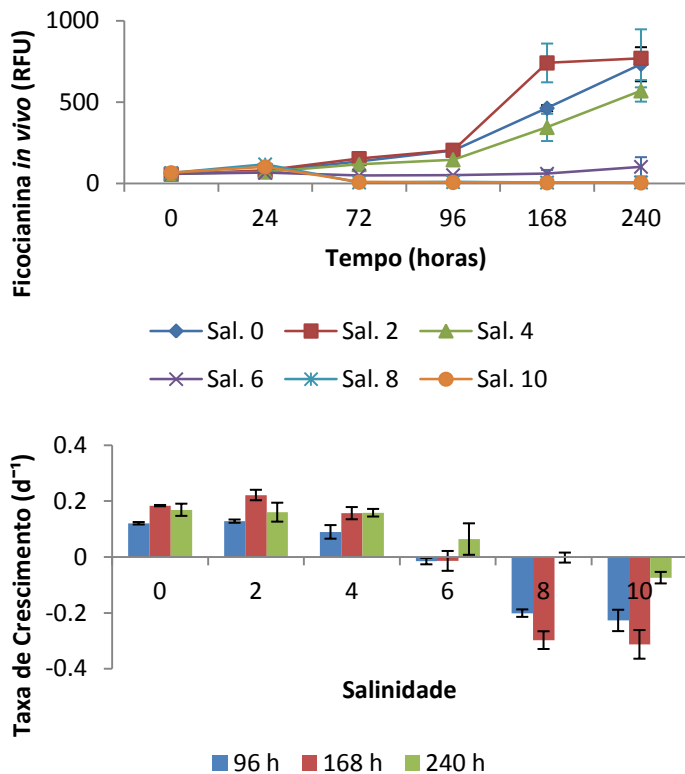


Figura 16: Curva de crescimento da cepa T3 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de ficocianina *in vivo* (FIC) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).

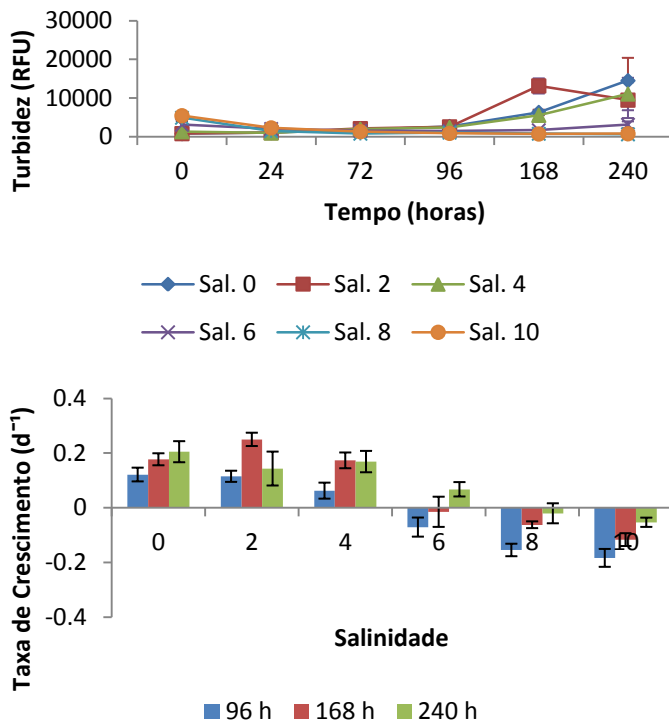


Figura 17: Curva de crescimento da cepa T3 de *C. raciborskii* em diferentes salinidades determinadas a partir de dados de turbidez (TUR) ao longo de 240 horas (gráfico acima) e taxa de crescimento calculadas para 96 h, 168 h e 240 h (gráficos abaixo).

A Concentração Efetiva Mediana (CE_{50}) das 3 cepas para a salinidade demonstrou de forma mais categórica os limites de tolerância das cepas testadas. De maneira geral a cepa LP2 mostrou-se mais tolerante a salinidade e LP1 e T3 mostraram comportamentos similares entre si. Considerando-se as diferentes variáveis de biomassa (CLA, FIC e TUR) e tempos de cultivo nos testes, os valores de CE_{50} variaram entre 4,06 e 4,9 para a LP1 (média geral = 4,62), 3,63 e 5,97 para LP2 (média geral = 5,06) e 3,71 e 6,57 para T3 (média geral = 4,80). Estes valores de tolerância a salinidade corroboram os dados já descritos para outras cepas, que mostram tolerância e crescimento a salinidades baixas, em geral menores que 4 (Figura 18).

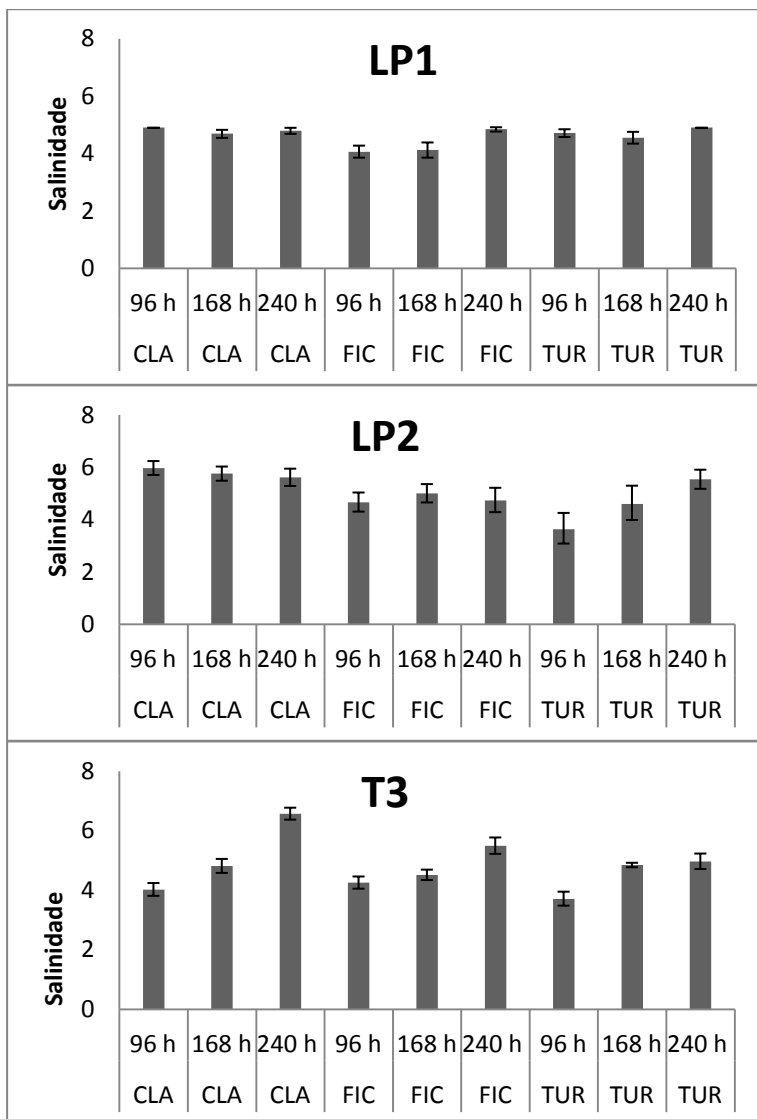


Figura 18. Valores de concentração efetiva mediana (CE_{50}) para salinidade em três cepas de *C. raciborskii* (LP1, LP2 e T3) após três tempos de cultivo (96 h, 168 h, 240 h) calculados a partir de três variáveis indicativas de biomassa (CLA; FIC e TUR). As barras indicam o limite superior e inferior da estimativa de CE_{50} pelo método Trimmed Spearman-Kärber.

3.3 Concentração de STX nas cepas em diferentes salinidades

Os cultivos para determinação da influência da salinidade na produção de STX foram realizados em três salinidades escolhidas de acordo com os seguintes critérios: salinidade 0, controle; salinidade 4, valor próximo do limite de tolerância das cepas, e salinidade 6, valor que em alguns casos gerou crescimento, mas já considerado limitante ou estressante para a cepas.

Os resultados analisados por ANOVA bifatorial mostraram a existência de interação entre os fatores cepa e salinidade, explicando 35,3% da variação ($p < 0,0001$), enquanto o fator salinidade explicou 30,5% ($p < 0,0001$) e o fator cepa 26,1% ($p < 0,0001$). Para a cepa LP1 não houve diferença significativa nos valores de concentração de STX entre as três salinidades, apresentando um valor médio geral de $16,29 \mu\text{g eq-STX.kg}^{-1}$. A cepa LP2 mostrou valores muito baixos em salinidade 0, que foram estatisticamente diferentes dos valores obtidos nas salinidades 4 e 6, com a maior concentração na salinidade 4 (Figura 19A). O valor baixo na salinidade 0 chama a atenção, podendo representar a existência de um gatilho de produção de STX nessa cepa relacionado à salinidade/condutividade. Porém, não se descarta a possibilidade de problemas analíticos ou experimentais. A cepa T3 também apresentou maiores concentrações de STX na salinidade 4, sendo que o valor nesta salinidade se diferenciou estatisticamente dos valores nas outras duas salinidades.

Embora não tenha ficado clara a influência da salinidade sobre a produção de STX na cepa LP1, as cepas LP2 e T3 mostraram incremento entre a salinidade 0 e 4, com diminuição na salinidade 6. Foi essa situação que revelou a interação entre os fatores cepa e salinidade no caso de LP2 e T3. A diminuição na salinidade 6 pode estar relacionada ao colapso fisiológico nas cepas. Ou seja, apesar do teste aqui realizado ser simples e envolver apenas 3 salinidades, a hipótese de que a salinidade estimula a produção de STX pode ser confirmada, mas ela se aplicaria até um determinado valor de salinidade, acima do qual as cepas não conseguem coordenar a resposta devido ao estresse salino, que causaria perturbação fisiológica nas células. Quando se analisa a concentração de STX normalizada pela clorofila-a (Figura 19B), verifica-se a ausência de diferenças significativas entre as diferentes salinidades para LP1 e, para T3, um valor elevado e muito diferente dos demais para a salinidade 6. Essa diferença pode estar relacionada à perda de clorofila-a nessa cepa em salinidade 6, relacionado a mecanismos de estresse.

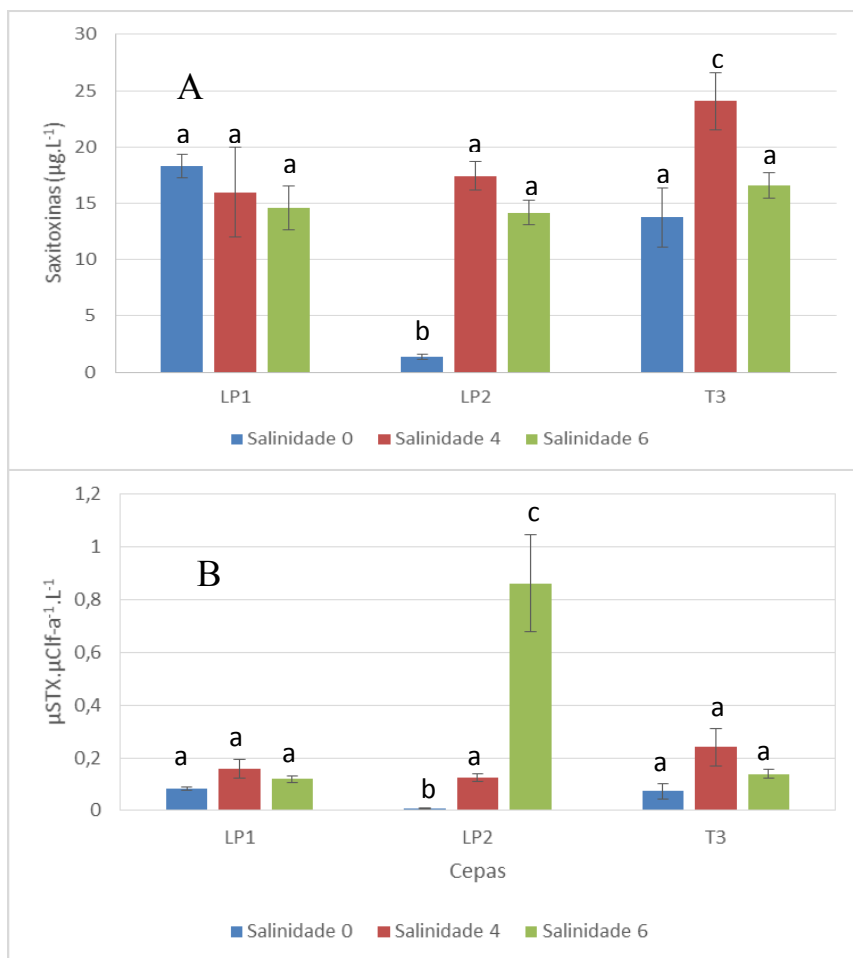


Figura 19. Concentração total de STX (A) e de STX por clorofila-a (B) nos cultivos de três cepas de *C. raciborskii* (LP1, LP2 e T3) em 3 salinidades distintas (0, 4 e 6) após 16 dias de cultivo em condições aclimatadas. As barras representam o desvio padrão da média (n=3). Letras iguais indicam valores sem diferença estatística e letras diferentes valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Miotto et al., 2017 quantificaram a concentração de STX nas cepas LP1 e LP2 de *C. raciborskii* na condição geral de cultivo. Os resultados obtidos demonstraram que a cepa LP2 apresentou um potencial tóxico maior que a cepa LP1, uma vez que a cepa LP2

apresentou uma maior quantidade de toxinas ($31,025 \mu\text{g.L}^{-1}$) que a cepa LP1 ($18,768 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Carneiro et al., 2013 testaram a resposta de uma cepa brasileira de *C. raciborskii* quanto à dureza da água, avaliando seu crescimento e a produção de STX. Foi testada a concentração de 5 mM utilizando os sais MgCO_3 , CaCO_3 e Na_2CO_3 baseando-se em dados ambientais. Os resultados obtidos pelo autor demonstraram aumento na concentração de STX para a maioria dos tratamentos após 6 dias de exposição, retornando às concentrações semelhantes a do controle após 12 dias de exposição, indicando uma adaptação da espécie às alterações nas condições da água. Carneiro et al., 2013 também observaram que, em curto prazo, a exposição das células à maioria das condições testadas favoreceu a produção de STX sobre a produção de neoSTX, afirmando uma notável plasticidade de *C. raciborskii* e seu potencial para prosperar em águas duras.

Carneiro et al., 2011 observou que muitos reservatórios de água eutrofizados da região nordeste do Brasil são dominados por *C. raciborskii*, sendo que a ocorrência de blooms é recorrente devido à eutrofização. Tais corpos de água possuem elevada condutividade devido à elevada concentração iônica, sendo assim definidos como duros (elevados valores de CaCO_3). O estudo desenvolvido investigou o efeito da elevada concentração de cálcio (8 mM Ca^{+2}) no crescimento, morfologia, metabolismo e conteúdo de toxinas da cepa T3 após 12 dias de exposição. Os resultados demonstraram os seguintes efeitos: crescimento limitado, diminuição no comprimento do tricoma, aumento do conteúdo de clorofila-a, inibição da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo primário e alteração no perfil de toxina (Carneiro et al., 2011).

Moisander et al., 2002 calcularam taxas de crescimento em função da salinidade a partir de dados de clorofila-a, onde *C. raciborskii* apresentou taxas de crescimento constante entre as salinidades 0 e 2 e constataram que o limite de tolerância para o crescimento de *C. raciborskii* esteve entre as salinidades 2 e 6. As duas cepas de *C. raciborskii* utilizadas por Moisaner et al., 2002 foram isoladas dos lagos Dora e Griffin (Flórida Central, Estados Unidos). O máximo crescimento para *C. raciborskii* foi observado na salinidade 4. Além disso, observaram que a fixação de CO_2 e a atividade nitrogenase foram significativamente menores em salinidades maiores que 2. Os resultados obtidos por Moisaner et al., 2002 demonstraram que *C. raciborskii* possui habilidade para crescer até a salinidade 4, sugerindo que a espécie pode manter o crescimento e também formar blooms em regiões

estuarinas de baixa salinidade e outros corpos de água salgada como é o caso do mar Báltico. O crescimento de *C. raciborskii* é limitado pela salinidade estuarina, que geralmente apresenta valores acima de 4, sendo este o motivo que evita a formação de blooms no estuário do Rio Neuse (Carolina do Norte, Estados Unidos) e outras águas de salinidade similar.

3.4 Exposição dos mexilhões à cianobactéria *C. raciborskii* (cepa LP2)

Os dados apresentados a seguir demonstram as taxas de filtração calculadas para cada indivíduo utilizado no teste a partir do consumo de clorofila *in vivo* (*N. oculata*) (Figura 20). A taxa de filtração calculada para os indivíduos em cada um dos tratamentos apresentou maiores valores nos tratamentos Controle 22 e Teste 22 (3,275 e 3,087 L.h⁻¹.g⁻¹ respectivamente), indicando que a taxa de filtração para *P. perna* está sendo mais influenciada pela salinidade da água do que pelo tipo de alimentação. Comparando os tratamentos Controle e Teste é possível observar que os indivíduos Controle apresentaram maior taxa de filtração do que os indivíduos Teste em todas as salinidades (22, 26 e 30).

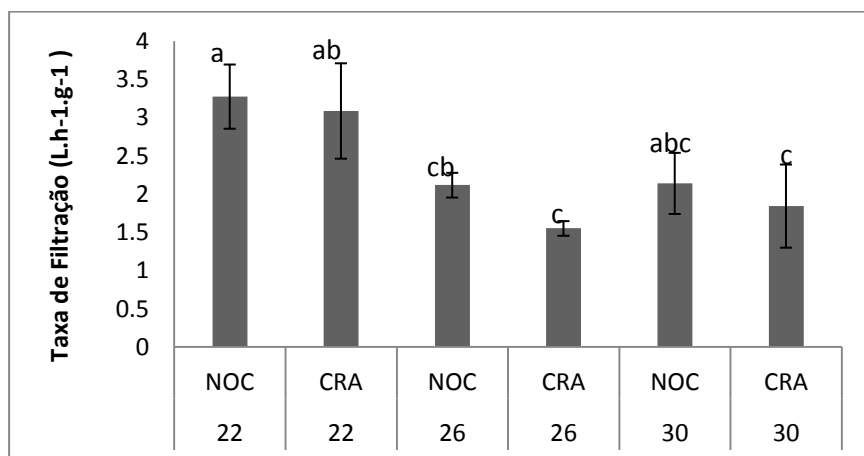


Figura 20. Taxas de filtração de mexilhões *Perna perna* alimentados com *N. oculata* (NOC) e *C. raciborskii* (CRA) em diferentes salinidades (22, 26 e 30), medidas a partir do consumo de clorofila-a *in vivo*. Barras com letras em comum indicam diferenças significativas e barras sem letras em comum indicam ausência de diferenças significativas ($p < 0,05$).

Em relação à acumulação de STX nos mexilhões verificaram-se valores superiores nos animais tratados com *C. raciborskii* em relação aos tratados com *N. oculata* (Figura 21). De maneira geral os resultados mostraram que a biomassa de *C. raciborskii*, quando disponibilizada aos mexilhões, é ingerida e gera acumulação de STX, porém, não há diferenças significativas relacionadas à salinidade. Além deste fato indicar o risco de que moluscos marinhos podem ser contaminados com STX de origem continental, percebe-se também que o contato com a água salgada não destrói instantaneamente as populações de *C. raciborskii*, tampouco inativa a STX presente na sua biomassa.

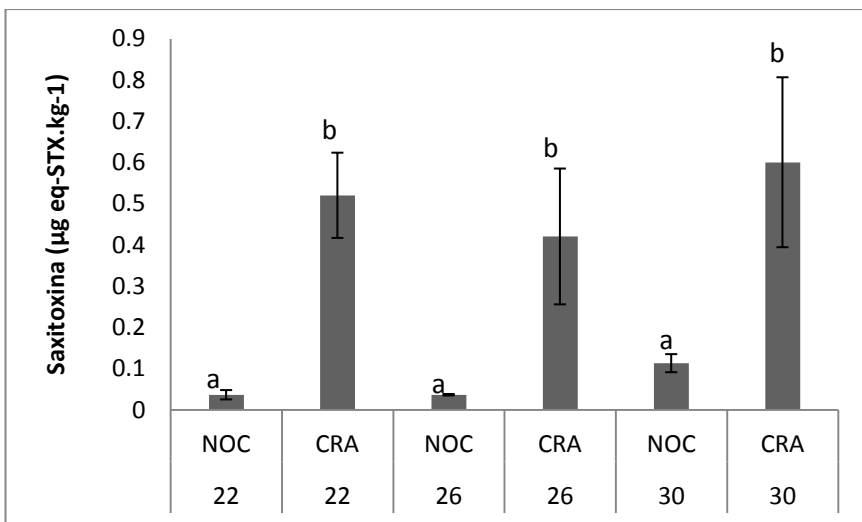


Figura 21. Concentrações de STX ($\mu\text{g eq-STX.kg}^{-1}$) em mexilhões *Perna perna* alimentados com *Nannochloropsis oculata* (NOC) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (CRA) em diferentes salinidades (22, 26 e 30). As barras de erro indicam o desvio padrão da média ($n = 3$). Letras diferentes indicam diferenças significativas e letras iguais indicam ausência de diferenças significativas ($p < 0,05$).

Ainda que baixos, os valores positivos de STX encontrados nos mexilhões tratados com *N. oculata* indicam, provavelmente, uma contaminação residual histórica dos mexilhões utilizados no teste, pois estes foram coletados em área de cultivo onde eventualmente ocorrem dinoflagelados produtores de STX (Rörig et al., 1998; Rörig et al.,

2018). Schramm et al. (2006) identificaram a contaminação de mexilhões *P. Perna* por STX oriundos da ocorrência de *Gymnodinium catenatum* em águas costeiras do litoral norte do estado de Santa Catarina entre abril e maio de 2006. Foram analisados 10 pontos amostrais no litoral de Santa Catarina, identificando concentrações que variaram de 0 a 744,78 $\mu\text{g eq-STX. kg}^{-1}$. Em seu estudo, Schramm et al. (2006) afirmam que, mesmo contaminados com PSP, os mexilhões poderiam ser comercializados e consumidos pois a legislação internacional define que o limite máximo permitido é de 800 $\mu\text{g eq-STX.kg}^{-1}$.

Desde 1997 o Laboratório de Estudos sobre Algas Nocivas da UNIVALI mantém um programa de monitoramento de algas nocivas em uma área de cultivo de moluscos localizada na Armação do Itapocorói (Rörig et al., 2018). Tanto este como outros programas de monitoramento subsequentes têm mostrado uma maior importância de eventos de risco de maré vermelha por dinoflagelados tóxicos durante o inverno (Rörig et al., 2018), quando ocorre maior influência das águas subantárticas, que são mais ricas em dinoflagelados (Islabão e Odebrecht, 2011). Uma vez no litoral de Santa Catarina, algumas espécies de dinoflagelados provavelmente encontram condições ótimas para formar florações, como a presença de locais de menor turbulência e alta concentração de nutrientes. É precisamente neste tipo de ambiente que a maricultura, em particular mexilhões e ostras, foi desenvolvida na região, indicando que o inverno é um período crítico para o monitoramento de florações de dinoflagelados nocivos. Por outro lado, no caso da Lagoa do Peri, as densidades de *C. raciborskii* sempre são maiores no verão, e a pluviosidade muitas vezes também é maior nesse período. Assim, eventuais cultivos de moluscos ou mesmo a coleta em bancos naturais próximos a desembocadura do Canal Sangradouro estariam em risco também no verão, nesse caso a partir de uma fonte continental de STX.

Zagatto et al., 2011 utilizaram duas linhagens de *C. raciborskii* (T2 e T3) isoladas do reservatório Taiaçupeba (São Paulo, Brasil) e cultivaram em laboratório para uso em testes de toxicidade com camundongos, micro crustáceos e peixes. Os resultados obtidos nestes testes apresentaram sintomas típicos de neurotoxicose em camundongos, como tremor, ataxia, convulsões e morte por parada respiratória. Já em

Daphnia similis e *Ceriodaphnia dubia*, os efeitos observados foram imobilização e redução da atividade locomotora respectivamente. Para o peixe *Danio rerio*, foi observado efeito crônico em seu estágio larval somente, e nenhum efeito agudo foi observado no animal adulto. Além disso, afirmam que nenhum padrão consistente foi observado, mas que ambas cepas apresentaram elevada toxicidade para as espécies utilizadas nos testes. De qualquer maneira, a elevada toxicidade destas cepas e o potencial risco para a saúde humana alertam para que haja uma revisão da legislação sobre fatores de segurança para o abastecimento de água potável (Zagatto et al., 2011).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria dos estudos tem verificado quais variáveis influenciam na produção de STX somente em laboratório, sendo que poucos são aqueles que utilizam o ambiente para alcançar estas respostas (Brentano et al., 2016). O presente estudo teve como principal objetivo, entender em laboratório e no ambiente como a salinidade influencia na produção de STX pela espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*. Esta ampla pergunta surgiu a partir dos resultados obtido por Brentano et al., (2016) que identificaram a influência da condutividade na biossíntese de STX da cianobactéria *C. raciborskii* residente na Lagoa do Peri. Assim como Moisander et al. (2002), o presente trabalho identificou que as cepas LP1, LP2 (isoladas da Lagoa do Peri, Santa Catarina) e T3 (isolada do reservatório Taiaçupeba, São Paulo) de *C. raciborskii* apresentaram crescimento em baixos valores de salinidade (salinidade 4 aproximadamente). O outro objetivo era entender se a carga tóxica presente na lagoa do Peri, devido à presença de *C. raciborskii*, poderia atingir os componentes ecológicos da Praia do Matadeiro. Desta forma, os resultados obtidos a partir do acompanhamento no ambiente permitiu concluir que o risco de contaminação por STX biossintetizadas por *C. raciborskii* é evidente na região do estudo, principalmente quando os maiores valores de temperatura da água incentivam o crescimento da espécie e elevados volumes de chuva influenciam na vazão da Lagoa do Peri sobre a região costeira, transportando a carga tóxica para o mar. De acordo com Moser (2012), “Cabe aos profissionais de diversas áreas o desenvolvimento de tecnologia de remoção de algas e toxinas em água de abastecimento público, a pesquisa de predadores naturais e inibidores ao desenvolvimento de *C. raciborskii* (sua existência e dinâmica no meio natural), bem como o estudo do metabolismo da *C. raciborskii*, a fim de sanar dúvidas tais como: em que condições estes organismos liberam toxinas? Quais fatores ambientais influenciam na geração de estresse? Há outros fatores que propiciam sua dominância e que precisam ser melhor elucidados?”

De forma parcial, o presente estudo conseguiu contribuir com algumas respostas para as perguntas realizadas por Moser (2012). Sabendo que *C. raciborskii* é uma espécie de água doce, a salinidade e/ou elevada condutividade são fatores que causam estresse para a mesma. Além de causar estresse, este é um dos fatores que influenciam na produção e liberação de toxinas (especificamente STX) para o meio, sendo comprovados com os resultados deste trabalho. O controle

osmótico realizado por *C. raciborskii* através da biossíntese de STX é o que explica a positiva taxa de crescimento de *C. raciborskii* em condições de baixas salinidades mesmo sendo esta uma espécie de água doce.

A confirmação da hipótese de que a carga tóxica oriunda da Lagoa do Peri atinge a praia do Matadeiro e também que a bioacumulação de STX oriunda de *C. raciborskii* ocorre em filtradores como o mexilhão *P. perna*, chama a atenção para a necessidade de monitoramento desta região do litoral de Santa Catarina, principalmente quando se pensa na possibilidade de tomar a praia do Matadeiro como área para cultivo e comercialização do mexilhão *P. perna*. As indicações aqui levantadas sugerem que não seja autorizado nem o cultivo, nem a coleta de animais filtradores para fins alimentícios na região do entorno a Praia do Matadeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, J.T., Leão, P.N., Vasconcelos, V.M. 2015. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Frontiers in Microbiology*. 13 p. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00473
- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M.C.S., Gonzáles-Piña, M., Fabre, A., Huszar, V.L.M., Lüring, M., Antoniadou, D., Padisák, J. & Kruk, C. 2012. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiology Ecology* 79: 594-607.
- Brentano, D.M., Giehl, E.L.H., Petrucio, M.M. 2016. Abiotic variables affect STX concentration in a meso-oligotrophic subtropical coastal lake dominated by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae). *Harmful Algae* 56 (2016) 22–28
- Briand, J.F., Le Boulanger, C., Humbert, J.F., Bernard, C., Dufour, P. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J. Phycol.* 40, 231–238. DOI:10.1111/j.1529-8817.2004.03118.x
- Briand, J.F., Robillot, C., Quiblier-Lloberas, C., Humbert, J.F., Coute, A. 2002. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Res.* 36, 3183–3192. DOI: 10.1016/S0043-1354(02)00016-7
- Burford, M.A., Beardall, J., Anusuya Willis a, Philip T. Orr, Valeria F. Magalhaes, Luciana M. Rangel, Sandra M.F.O.E. Azevedo, Brett A. Neilan. 2016. Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 54:, 44–53
- Calandrino, E.S., Paerl, H.W. 2011. Determining the potential for the proliferation of the harmful cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Currituck Sound, North Carolina. *Harmful Algae* 11:1–9. dx. DOI.org/10.1016/j.hal.2011.04.003
- Calijuri, M.D.; Alves, M.S.A.; dos Santos, A. C. A.; Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. RIMA, 2006.

Carneiro, R.; Pacheco, A.; Azevedo, S.M.F.O. 2013. Growth and Saxitoxin Production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) Correlate with Water Hardness. *Marine Drugs*, v. 11, p. 2949-2963, 2013.

Carneiro, R. L.; Alipio, A.C.N.; Bisch, P.M.; Azevedo, S.M.F.O.; Pacheco, A.B.F. 2011. The inhibitory effect of calcium on *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) metabolism. *Brazilian Journal of Microbiology (Impresso)*, v. 42, p. 1547-1559.

Everson, S., Fabbro, L., Kinnear, S., Wright, P. 2011. Extreme differences in akinete, heterocyte and cylindrospermopsin concentration with depth in a successive bloom involving *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) and *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju. *Harmful Algae* 10, 265–276. DOI: 10.1016/j.hal.2010.10.006

Fernandes, F.C., Souza, R.C.C.L., Junqueira, A.O.R., Rapagnã, L.C., Ramos, A.B. 2008. O Mexilhão Perna Perna (L.). *Biologia, Ecologia e Aplicações*. Capítulo 1. Editora Interciência. ISBN 987-85-7193-198-5

Gilfillan, E.S., Hanson, S.A. 1975. Effects of paralytic shellfish poisoning toxin on the behavior and physiology of marine invertebrates. In: LoCicero, V.R., ed. *Proceedings of the First International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms*, Wakefield, Massachusetts, Science and Technology Foundation, 367-375.

Gorham, P.R., McLachlan, R.W., Hammer, U.T. 1964. Isolation and Culture of Toxic Strains of *Anabaena flos-aquae*. *Breb. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh.* 19, 796–804.

Hamilton, M.A. Russo, R.C. Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11, 714-719.

Hennemann, M. C.; Petrucio, M. M. 2016. High chlorophyll a concentration in a low nutrient context: discussions in a subtropical lake dominated by Cyanobacteria. *Journal of limnology*, V. 75, p. 1-22.

Hennemann, M.C., Petrucio, M.M. 2010. Seasonal phytoplankton response to increased temperature and phosphorus inputs in a freshwater coastal lagoon, Southern Brazil: a microcosm bioassay. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 2010, vol. 22, no. 3, p. 295-305. DOI: 10.4322/actalb.02203006

International Organization for Standardization. 2012. Water quality Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae, third edition (ISO Standard No. 8692).

Islabão, C.A., Odebrecht, C. 2011. Dinofagelados (Peridiniales, Prorocentrales) do microplâncton na plataforma continental e talude do extremo sul do Brasil (inverno 2005, verão 2007). *Biota Neotrop.* 11(3):153–166.

Knie, J.L.W., Lopes, E.W.B. 2004. Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ. 289p.

Lagos, N.H., Onodera, P.A., Zagatto, D., Andrinolo, S. M. F. O. Azevedo, Y. Oshima. 1999. The first evidence of paralytic shelfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37, 1359–1373.

Lopes, S.G.B.C., Fonseca, M.L. 2008. O Mexilhão Perna Perna (L.). *Biologia, Ecologia e Aplicações*. Capítulo 1. Editora Interciência. ISBN 987-85-7193-198-5

Mazzer, A. M., Dillenburg, S. 2009. Variações temporais da linha de costa em praias arenosas dominadas por ondas do sudeste da Ilha de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brasil). *Pesquisas em Geociências*, 36 (1): 117-135, jan./abr. 2009

Mehnert, G., Leunert, F., Cirés, S., Jöhnk, K.D., Rucker, J., Nixdorf, B. 2010. Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate fresh waters under various light and temperature conditions. *J.PlanktonRes.* 32, 1009–1021. DOI: 10.1093/plankt/fbq033

Miotto, M.C.; Costa, L.D.F.; Brentano, D.M.; Nader, C.; Souza, L.S.; Gressler, P.D.; Laudaes-Silva, R.; Yunes, J.S.; Barufi, J.B.; Rörig, L.R. 2017. Ecophysiological characterization and toxin profile of two strains of *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from a subtropical lagoon in

Southern Brazil. *Hydrobiologia*. The International Journal of Aquatic Sciences. Volume 802. Number 1. *Hydrobiologia* (2017) 802:97-113. DOI 10.1007/s10750-017-3243-y

Moisander, P.H., Cheshire, L.A., Braddy, J., Calandrino, E.S., Hoffman, M., Piehler, M. F. 2012. Facultative diazotrophy increases *Cylindrospermopsis raciborskii* competitive nessunder fluctuating nitrogen availability. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 800–811. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01264.x

Moisander, P.H., Mc Clinton, E., Paerl, H.W., 2002. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microbial Ecology* 43, 432–442.

Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.C., Costa, A.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O. 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4, 743–753.

Moser, M.C. 2012. Avaliação ecotoxicológica do manancial da lagoa do peri: testes genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos. Dissertação de Mestrado. 125p.

Oliveira, J. S. de. 2002. Análise sedimentar em zonas costeiras: subsídio ao diagnóstico ambiental da Lagoa do Peri – Ilha de Santa Catarina – SC, Brasil. Florianópolis, SC: UFSC, Dissertação de Mestrado em Geografia, Utilização e Conservação de Recursos Naturais, 154 p.

Padisák, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayyaet Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Monogr. Stud.* 107, 563–593.

Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Gianni, A. 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae* 10, 644–653. DOI: 10.1016/j.hal.2011.04.016

Pierangelini, M., Stojkovic, S., Orr, P.T., Beardall, J. 2014. Photosynthetic characteristics of two *Cylindrospermopsis raciborskii*

strains differing in their toxicity. J. Phycol. 50, 292–302. DOI:10.1111/jpy.12157

Pomati, F., Neilan, B.A., Suzuki, T., Manarolla, G., Rossetti, C., 2003a. Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyano-bacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). J. Phycol. 39, 535–542.

Pomati, F., Rossetti, C., Calamari, D., Neilan, B.A., 2003b. Effects of saxitoxin (STX) and veratridine on bacterial Na⁺-K⁺ fluxes: a prokaryote-based STX bioassay. Appl. Environ. Microb. 69 (12), 7371–7376.

Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B.P., Neilan, B.A. 2004. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. Microbiology (2004), 150, 455–461. DOI: 10.1099/mic.0.26350-0

Resgalla Jr, C.; Brasil, E.S; Salomão, L.C. 2006. Physiological rates in different classes of sizes of *Perna perna* (Linnaeus, 1758) submitted to experimental laboratory conditions. Brazilian Journal of Biology, São Carlos, SP, V. 66, n.1b, p. 325-336.

Rörig, L.R., Tamanaha, M.S., Persich, G.R., Schettini, C.A.F., Truccolo, E.C. 2018. Phytoplankton Patterns and Processes in a Tropical-Subtropical Transition Region: Santa Catarina Coast, Southern Brazil. In: Hoffmeyer et al. (eds.), Plankton Ecology of the Southwestern Atlantic. Springer International, pp. 269-287.

Rörig L.R., Guimarães S.C.P., Lugli D.O. et al. 1998. Monitorização de microalgas planctônicas potencialmente tóxicas na área de maricultura da Enseada de Armação do Itapocorói - Penha - SC. Notas Técnicas da FACIMAR 2:71–79

Rourke, W.A., Murphy, C.J., Pitcher, G., Van De Riet, J.M., Burns, B.G. Thomas, K.M., Quilliam, M.A. 2008. Rapid postcolumn methodology for determination of paralytic shellfish toxins in shellfish tissue. Journal of AOAC International 91: 589–597.

Schramm, M.A., Tamanaha, M. da S., Beirão, L.H., Proença, L.A de O. 2006. Toxinas Paralisantes em Mexilhão *Perna perna* em áreas de cultivo da Costa Sul do Brasil: Estudo de Caso. Alim. Nutr., Araraquara. V.17, n.4, p.443-450, out./dez. 2006

Soares, M.C.S., Lürling, M., Huszar, V.L.M. 2012. Growth and temperature- related phenotypic plasticity in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Phycol. Res. 61, 61–67. DOI: 10.1111/pre.12001

Soto-Liebe, K.; Murillo, A.A.; Krock, B.; Stucken, K.; Fuentes-Valdés, J.J.; Trefault, N.; Cembella, A.; Vásquez, M. 2010. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. Toxicon 56, 1350–1361.

Taniguchi, S., Montone, R.C., Bicego, M.C., Weber, R.R. 2008. O Mexilhão Perna Perna (L.). Biologia, Ecologia e Aplicações. Capítulo 1. Editora Interciência. ISBN 987-85-7193-198-5

Zagatto, P.A.; Buratini, S.V.; Aragão, M.A.; Ferrão-Filho, A.S. 2012. Neurotoxicity of two *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) strains to mice, Daphnia and fish. Environ. Toxicol. Chem. April 31(4):857-62.

Zingone, A., Enevoldsen, H. O. 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. Ocean Coastal Manag 43, 725–748.

Yunes, J.S.; Cunha, N.T.; Barros, L.P.; Proença, L.A.O; Monserrat, J.M. 2003. Cyanobacterial neurotoxins from Southern Brazilian freshwaters. Comments On Toxicology, 9: 103-115.