UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Efeito do herbicida glifosato sobre o crescimento e produção de metabólitos secundários em *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*

Fabiane Dörr

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Efeito do herbicida glifosato sobre o crescimento e produção de metabólitos secundários em *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 6018. O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Fabiane Dörr

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo

Fabiane Dörr

Efeito do herbicida glifosato sobre o crescimento e produção de metabólitos secundários em *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*

Versão corrigida

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor

> Prof. Dr. Ernani Pinto Junior orientador/presidente

Valéria Freitas de Magalhães 1º examinador

Helenice de Souza Spinosa 2° examinador

Marcelo Luiz Martins Pompêo 3° examinador

João Carlos Monteiro de Carvalho 4º examinador

São Paulo, 10 de abril de 2015.

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

	Dörr, Fabiane
D716e	Efeito do herbicida glifosato sobre o crescimento e produção
	de metabólitos secundários em Microcystis aeruginosa e
	Cylindrospermopsis raciborskii / Fabiane Dörr São Paulo,
	2015.
	1v. (Várias paginações)
	Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
	Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
	e Toxicológicas.
	Orientador: Pinto Junior, Ernani
	1. Toxicologia ambiental 2. Herbicídas I. T. II. Pinto Junior,
	Ernani, orientador.
	·
	615.9 CDD

Dedico este trabalho a meus pais e irmãos, batalhadores incansáveis e exemplos de dignidade e caráter, cujos valores e ensinamentos pretendo levar para a vida toda.

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão Felipe, fonte de inspiração e de quem tenho uma admiração e orgulho imensos, pelo zelo, ajuda e presença constantes. Tua companhia, em casa e no trabalho, me enche de alegria e faz com que me sinta segura e protegida, e ameniza imensamente a distância e a saudade dos nossos pais e irmão, que ficaram lá no Sul. É impossível expressar tudo o que você representa para mim. Por infinitas razões, te amo muito!

Aos meus amados pais, Dorni e Waldir, que por muitas vezes tiveram que renunciar aos seus sonhos para que meus irmãos e eu pudéssemos realizar os nossos. Sua doação em nos proporcionar o que há de melhor certamente é a razão das nossas conquistas. Obrigada por propiciarem mais esta, tão importante na minha vida. Nunca conseguirei expressar minha gratidão por tudo que vocês fizeram por mim.

Ao meu irmão, Nando, e à Mari e Aninha que, mesmo de longe, estão sempre torcendo por mim.

Ao Tomaz, meu companheiro tão especial, por me fazer sentir igualmente (ou até mais) especial e por estar sempre ao meu lado, me incentivando e tentando me fazer acreditar em um monte de qualidades que muitas vezes não consigo enxergar. Muito obrigada por ter me dado uma nova família, sempre pronta a me ajudar, e que me adotou de forma tão carinhosa aqui em São Paulo.

Ao meu querido chefe e professor Ernani, mais do que docente e pesquisador, um amigo para todas as horas. Sou imensamente grata pela oportunidade, confiança no meu trabalho e pelos tantos momentos divertidos que passamos e passaremos juntos. Que esse seja só um passo de uma caminhada de muitas conquistas.

Às minhas grandes amigas e confidentes do laboratório, que sempre se dispuseram a me ajudar (e o fizeram por inúmeras vezes) Natália, Fernanda, Kazumi, Raquel e Ariane, e aos colegas do LTPNA, Gustavo (pela ajuda com a parte estatística), Carlos, Simone e Miriam, que fizeram e fazem todos os dias mais agradáveis. Obrigada pelas risadas, convívio e ajuda constantes. E às queridas e eficientes Barbara e Érika, que me ajudaram muito, de diversas formas. Obrigada também àqueles que por lá passaram, Ronaldo (um grande mentor e fonte de motivação, que participou ativamente e de forma brilhante na orientação da primeira etapa deste trabalho), Diogo, Mariah, Stellinha, Fabyana, Vânia, Luana, Gisele e Bruna.

À Renata, sempre extremamente doce, solícita e dedicada, sou imensamente grata pelas as análises de citometria de fluxo.

A todos os colegas de trabalho e professores do Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas e à Universidade de São Paulo, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao CNPq, CAPES, FAPESP e FUSP pelo apoio financeiro.

A todos os meus amigos de infância e que ficaram para a vida toda. Ainda que eu não os veja com a frequência que gostaria, sempre estão presentes na minha lembrança.

Enfim, a todos que estiveram do meu lado, torcendo por mim, de longe ou de perto, e/ou que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

"If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants."

Isaac Newton

Letter to Robert Hooke February 5, 1675.

RESUMO

DÖRR, F. Efeito do herbicida glifosato sobre o crescimento e produção de metabólitos secundários em *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*. 2015. 104f. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Cianobactérias, conhecidas por sua habilidade de sintetizar metabólitos com ação tóxica, podem se tornar dominantes em águas com altas concentrações de nitrogênio e fósforo. Embora a toxicidade do glifosato, o herbicida mais usado no mundo, em alguns organismos aquáticos seja conhecida, poucos estudos abordam o efeito desse composto sobre a produção de metabólitos secundários por cianobactérias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de glifosato (produto técnico) sobre o crescimento e produção de cianotoxinas e microgininas pelas cepas brasileiras Microcystis aeruginosa LTPNA 08 e Cylindrospermopsis raciborskii CENA 302. Na presença de 15 mg/L de glifosato, o crescimento e a produção de toxinas pela M. aeruginosa foram reduzidos e de microgininas significativamente aumentada. Já a C. raciborskii, quando exposta à 20 mg/L de glifosato teve seu crescimento e síntese de clorofila-a, carotenoides e saxitoxinas aumentados. Concentrações superiores a 20 e 30 mg/L impediram o crescimento celular das cepas LTPNA 08 e CENA 302, respectivamente. A análise de ácidos graxos mostrou perfis bastante distintos entre as cepas. Na cepa LTPNA 08, enquanto que na presença de 10 mg/L de glifosato ocorreu diminuição do teor do ácido linoleico, o ácido estearidônico foi aumentado. Nenhuma das concentrações testadas promoveu alteração sobre o perfil de ácidos graxos da cepa CENA 302. A toxicidade de 5 produtos formulados a base de glifosato foi comparada ao produto técnico em ambas as linhagens-teste. Observou-se uma resistência distinta entre as cepas e toxicidade também variável entre as formulações comerciais. Sendo assim, diante da elevada resistência das cianobactérias M. aeruginosa e C. raciborskii ao glifosato, e considerando-se a elevada interferência antrópica através das práticas agrícolas, pode-se inferir que o uso excessivo e frequente desse herbicida é capaz de estimular o crescimento e dominância desses organismos, podendo modificar a estrutura e funcionalidade de ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: glifosato; *Microcystis aeruginosa*; *Cylindrospermopsis raciborskii*; crescimento; metabólitos secundários.

ABSTRACT

DÖRR, F. The effect of herbicide glyphosate on the growth and of secondary metabolites production in *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii.* 2015. 104f. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Cyanobacteria, known for their ability to synthesize toxic metabolites, can become dominant in water bodies with high concentrations of nitrogen and phosphorus. Although the toxicity of glyphosate, the most widely used herbicide in the world, in some aquatic organisms is well known, few studies address the effect of this compound on the production of secondary metabolites by cyanobacteria. The aim of this study was to evaluate the influence of different concentrations the herbicide glyphosate (technical grade) on growth and production of cyanotoxins and microginins by Brazilian strains of Microcystis aeruginosa LTPNA 08 and Cylindrospermopsis raciborskii CENA 302. In the presence of 15 mg/L of glyphosate, growth and toxin production by *M. aeruginosa* were reduced and microginins cell quota significantly increased. The C. raciborskii strain, when exposed to 20 mg/L of glyphosate, had the growth, and chlorophyll-a, carotenoids and saxitoxins production increased. Concentrations above 20 and 30 mg/L prevented cell growth of LTPNA 08 and CENA 302 strains, respectively. Fatty acid analysis showed distinct profiles among the strains. When exposed to 10 mg/L of glyphosate, a decrease in the linoleic acid and increase in stearidonic acid content were observed in M. aeruginosa LTPNA 08 strain. None of the tested concentrations of glyphosate promoted change on the fatty acid profile of CENA 302 strain. The toxicity of 5 glyphosate formulated products was compared to technical product to both strains. There was a distinct resistance among strains and also a variable toxicity among formulated products. Thus, given the high glyphosate resistance of M. aeruginosa and C. raciborskii cyanobacteria, and considering the high anthropogenic interference through agri cultural practices, it can be inferred that excessive and frequent use of this herbicide is able to stimulate growth and dominance of these organisms, which may modify the structure and function of aquatic ecosystems.

Key words: glyphosate; *Microcystis aeruginosa*; *Cylindrospermopsis raciborskii*; growing; secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Participação das classes na quantidade vendida de defensivos
agrícolas. Fonte: Instituto de Economia Agrícola, 2014
Figura 2. Fontes de contaminação em corpos d'água brasileiros. Fonte:
adaptado de IBGE, 201133
Figura 3. Fórmula estrutural do herbicida glifosato (N-fosfonometil glicina)35
Figura 4. Grau de dissociação do glifosato construído a partir dos valores de Ka,
onde: α0: composto com uma protonação; α1: composto apresentando uma
dissociação; $\alpha 2$: molécula com duas dissociações; $\alpha 3$: molécula com três
dissociações; α4: composto totalmente dissociado. Fonte: AMARANTE JÚNIOR
et al. (2002)
Figura 5. Dissociação do glifosato, onde pKa1 = 0,8, pKa2 = 2,16, pKa3 = 5,46 e
pKa4 = 10,14. Fonte: adaptado de AMARANTE JUNIOR et al. (2002)36
Figura 6. Sítio de ação do glifosato na via do chiquimato. Fonte: adaptado de
Yamada e Castro (2007)37
Figura 7. Reação catalisada pela EPSP sintase. Fonte: adaptado de FUNKE et
al. (2006)
Figura 8. Mecanismo de degradação do glifosato. Fonte: Adaptado de
BORGGAARD e GIMSING (2008)
Figura 9. Destino do herbicida glifosato no ambiente. Fonte: adaptado de
Helander et al. (2012)53
Figura 10. Fotomicrografia da espécie Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing.
Fonte: GUIRY e GUIRY, 201562
Figura 11. Fotomicrografia da espécie Cylindrospermopsis
raciborskii (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju. Fonte: GUIRY e GUIRY,
201563
Figura 12. Fórmulas estruturais de algumas das cianotoxinas mais comumente
encontradas em corpos d'água no mundo. Fonte: adaptado de CARDOZO et al.
(2007)
Figura 13. Fórmula estrutural da microcistina LR, com os aminoácidos variáveis

Figura 18. Imagem da manutenção dos cultivos expostos a diferentes concentrações do herbicida glifosato (produto técnico) e formulações comerciais.

marcação, após um período de exposição de 120 h, às concentrações de 5, 10, Figura 23. Gráficos do tipo countour plot representando (A) o percentual de morte basal das células de C. raciborskii CENA 302 sem marcação e (B) com marcação pelo corante SYTOX® Green, e (C-F) percentual de clorofila, com marcação, após um período de exposição de 96 h, às concentrações de 5, 10, Figura 24. Percentuais de permeabilidade celular da linhagem M. aeruginosa LTPNA 08, avaliados por citometria de fluxo, após exposição a 5, 10, 15, 20, 30 Figura 25. Percentuais de permeabilidade celular da linhagem C. raciborskii CENA 302, avaliados por citometria de fluxo, após exposição a 5, 10, 15, 20, 30 Figura 26. Imagem dos tubos contendo as células de (A) M. aeruginosa LTPNA 08 e (B) C. raciborskii CENA 302 para avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo em concentrações de glifosato de 100, 250, 500 e 1000 mg/L após exposição por 48 h. Os quadros em vermelho evidenciam onde as células Figura 27. Gráficos do tipo countour plot representando (A) o percentual de morte basal das células de M. aeruginosa LTPNA 08 sem marcação; (B) com marcação pelo corante SYTOX[®] Green; e (C-F) percentual de clorofila, com marcação, após um período de exposição de 48 h, às concentrações de 100, Figura 28. Gráficos do tipo countour plot representando (A) o percentual de morte basal das células de C. raciborskii CENA 302 sem marcação; (B) com marcação pelo corante SYTOX[®] Green; e (C-F) percentual de clorofila, com marcação, após um período de exposição de 48 h, às concentrações de 100, Figura 29. Percentuais de permeabilidade celular das linhagens (A) M. aeruginosa LTPNA 08 e (B) C. raciborskii CENA 302, avaliados por citometria de fluxo, após exposição a 100, 250, 500 e 1000 mg/L de glifosato por 24 e 48 h. Os asteriscos representam valores de p<0,05......113

Figura 34. Cromatograma representativo obtido por HPLC-DAD dos padrões analíticos (A) clorofila-a (2,5 µg/L, 665 nm) e (B) astaxantina (10 µg/L, 480 nm), usados na quantificação de clorofila-a e carotenoides, respectivamente. 123 Figura 35. Curvas de calibração de (A) clorofila-a e (B) carotenoides construídas com padrões analíticos de clorofila-a e astaxantina, em análises realizadas por HPLC-DAD em 665 e 480 nm, respectivamente......123 Figura 36. Espectros de absorção da clorofila-a (A) e do carotenoide astaxantina (B), usado na identificação de carotenoides na análise de pigmentos por HPLC-Figura 37. Cromatograma representativo, obtido por HPLC-DAD (480 nm) para análise de carotenoides na linhagem M. aeruginosa LTPNA 08, na condição controle, aos 18 dias de cultivo. Os picos numerados (não identificados) foram Figura 38. Cromatograma representativo, obtido por HPLC-DAD (480 nm) para análise de carotenoides na linhagem C. raciborskii CENA 302, na condição controle, aos 48 dias de cultivo. Os picos numerados (não identificados) foram Figura 47. Espectro de MS/MS (varredura de íon produto) obtido em um equipamento do tipo Q-TOF para o íon de m/z 995, correspondente à MC-LR na cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08......133 Figura 48. Espectros de massas obtidos para o composto presente na fração 2. A. Espectro de varredura (scan) com o pico base m/z 756. B. Espectro de MS/MS (varredura de íon produto) do precursor de m/z 756..... 134 Figura 49. Espectros de massas obtidos para o composto presente na fração 3. A. Espectro de varredura (scan) com o pico base m/z 770. B. Espectro de MS/MS (varredura de íon produto) do precursor de m/z 770...... 135 Figura 50. Estruturas propostas para as microgininas MG756 (R = H) e MG770 Figura 51. Cromatograma representativo obtido por HPLC-DAD na análise de microcistinas MC-LR e MC-RR, monitoradas em 238 nm, produzidas pela cepa M. aeruginosa LTPNA 08, aos 18 dias de crescimento. A identidade do pico marcado com asterisco é desconhecida.....136 Figura 52. Espectros de absorção (A) das microcistinas LR e RR; (B) das microgininas MG756 e MG770; e (C) composto desconhecido obtidos na análise por HPLC-DAD da cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08, aos 18 dias de crescimento.

Figura 60. Concentração de goniautoxinas GTX2 (A) e GTX3 (B), normalizada pela densidade ótica, em culturas de *C. raciborskii* CENA 302, aos 15, 40 e 60 dias de cultivo, na condição controle e exposta a diferentes concentrações de glifosato. Os asteriscos representam valores de p<0,05......144

concentrações.	Crescimento	determinado	por	espectro	ofotometria	(750	nm).	As
barras de erro ir	ndicam as mé	dias ± desvio-	padı	ão (n=3)		1	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toxicidade aguda em organismos aquáticos. 39
Tabela 2. Toxicidade aguda do herbicida glifosato42
Tabela 3. Valores de limite máximo de resíduo, intervalo de segurança e
ingestão diária aceitável de glifosato em diferentes culturas que fazem uso do
herbicida no Brasil49
Tabela 4. Concentrações de glifosato e AMPA encontradas em amostras
ambientais de água55
Tabela 5. Cianotoxinas, grupos toxicológicos, valores de DL ₅₀ e os respectivos
gêneros produtores70
Tabela 6. Variantes de saxitoxinas e os respectivos grupamentos que compõem
sua fórmula estrutural74
Tabela 7. Sequência de aminoácidos de algumas microgininas (MG) descritas
na literatura76
Tabela 8. Valores de toxicidade (EC50) de glifosato a diferentes espécies de
cianobactérias citados na literatura79
Tabela 9. Composição do meio ASM-1 utilizado na manutenção das culturas. .84
Tabela 10. Canais de leitura dos fluorocromos analisados e seus respectivos
comprimentos de onda de excitação e emissão
Tabela 11. Gradiente utilizado nas análises de pigmentos fotossintéticos por
HPLC-DAD90
Tabela 12. Gradiente utilizado nas análises de saxitoxinas por HPLC-FD94
Tabela 13. Composição das formulações comerciais, segundo a bula dos
respectivos fabricantes, usadas na avaliação da toxicidade destes produtos
sobre o crescimento das cianobactérias <i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08 e <i>C. raciborskii</i>
CENA 30295
Tabela 14. Analitos contidos no padrão analítico usado na identificação dos
ácidos graxos nas amostras de cianobactérias por GC-MS117
Tabela 15. Toxicidade de glifosato (produto técnico e produtos formulados) às
cianobactérias <i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08 e <i>C. raciborskii</i> CENA 302150

LISTA DE ABREVIATURAS

Adda: ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienoico Ahda: ácido 3-amino-2-hidroxi-decanoico Ala: alanina AMPA: ácido aminometilfosfônico CE₅₀: concentração efetiva que causa efeito a 50% dos organismos-teste Chl-a: clorofila-a CL₅₀: concentração letal a 50% dos organismos-teste CIAhda: ácido 10-cloro-3-amino-2-hidroxi-decanoico Cl₂Ahda: ácido 10-dicloro-3-amino-2-hidroxi-decanoico DAD: detector de arranjo de diodos e.a.: equivalente ácido EDTA: ácido etilenodiaminotetracético EPSPS: 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase ESI: ionização por *electrospray* FAME: metil-éster de ácido graxo (fatty acid methyl ester) GC-MS: cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas GTX: goniautoxina HPLC: Cromatografia em fase líquida de alta eficiência HTyr: homotirosina i.a.: ingrediente ativo IDA: ingesta diária aceitável i.p.: intraperitoneal IPA: sal de isopropilamina IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Ile: isoleucina LC-MS: Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas LC-MS/MS: Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas in tandem Leu: leucina LOEC: Lowest observed effect concentration (menor concentração em que é observado efeito no organismo-teste)

LTPNA: Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas

MC: microcistina

MCL: nível máximo de contaminante

MG: microginina

MIF: mediana de intensidade de fluorescência

m/z: razão massa carga

NOEC: no observed effect concentration (concentração em que não é observado

efeito no organismo-teste)

p.c.: peso corpóreo

POEA: polietoxietileno amina

Pro: prolina

PSII: fotossistema II

STX: saxitoxina

Tyr: tirosina

USEPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

Val: valina

SUMÁRIO

1.1 CRESCIMENTO POPULACIONAL E O IMPACTO AMBIENTAL P	ELO
EMPREGO DE PRAGUICIDAS	29
1.1.1 Agrotóxicos e o cenário atual no Brasil	30
1.2 HERBICIDA GLIFOSATO	33
1.2.1 Propriedades físico-químicas	35
1.2.2 Mecanismo de ação	36
1.2.3 Ecotoxicidade do herbicida glifosato	38
1.2.4 Toxicidade do glifosato a humanos	39
1.2.5 Degradação do glifosato	50
1.2.6 Destino do glifosato no meio ambiente	52
1.3 CIANOBACTÉRIAS	59
1.3.1 O gênero <i>Microcystis</i>	61
1.3.2 O gênero Cylindrospermopsis	63
1.3.3 Metabólitos secundários de cianobactérias	66
1.3.3.1 Cianotoxinas	67
1.2.3.1.1 Microcistinas	71
1.2.3.1.2 Saxitoxinas	73
1.3.3.2 Microgininas	75
1.4 EFEITO DE HERBICIDAS EM CIANOBACTÉRIAS	77
3 MATERIAIS E MÉTODOS	83
3.1 Manutenção das culturas de cianobactérias	83
3.2 Efeito do glifosato sobre cianobactérias	84
3.2.1 Crescimento celular	85
3.2.2 Viabilidade celular	86
3.2.3 Produção de pigmentos fotossintéticos	89
3.2.4 Perfil de ácidos graxos	91
3.2.5 Produção de microcistinas e microgininas por <i>M. aeruginosa</i>	92
3.2.6 Produção de saxitoxinas por <i>C. raciborskii</i>	93
3.3 Efeito de produtos formulados de glifosato sobre o crescimento	de de
cianobactérias	95
3.4 Análise estatística	97
4.1 Efeito do glifosato sobre o crescimento de cianobactérias	99

4.2 Efeito do glifosato sobre a viabilidade celular de cianobactérias103
4.3 Efeito do glifosato no perfil de ácidos graxos de cianobactérias116
4.4 Efeito do glifosato sobre a produção de pigmentos fotossintéticos 122
4.5 Efeito do glifosato sobre a produção de microcistinas
4.6 Efeito do glifosato sobre a produção de microgininas140
4.7 Efeito do glifosato sobre a produção de saxitoxinas142
4.8 Efeito de formulações comercias de glifosato sobre o crescimento de
cianobactérias146
5 CONCLUSÕES155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS157
ANEXO 1
ANEXO 2
ANEXO 3

1.1 CRESCIMENTO POPULACIONAL E O IMPACTO AMBIENTAL PELO EMPREGO DE PRAGUICIDAS

A fim de atender as necessidades nutricionais da crescente população mundial, criou-se a demanda por um aumento na produção agrícola global. Uma maneira de suprir esta demanda seria ampliar a área de cultivo de alimentos, mas esta alternativa já não é viável, uma vez que a área per capita disponível para a agricultura diminui a cada ano. Isto significa que, à medida que a população mundial cresce impõe-se a necessidade de, em uma mesma área agrícola, produzir alimentos para um número cada vez maior de pessoas. Uma vez que perdas provocadas por pragas podem contribuir significativamente para a redução da produtividade, os defensivos agrícolas apresentam-se como artigos de necessidade primária para a obtenção de maiores rendimentos nas plantações. No entanto, o emprego desenfreado de muitos agrotóxicos foi mais rápido do que a capacidade de entendimento de seus efeitos ambientais, sociais e econômicos a longo prazo. Embora possam ter um efeito benéfico sobre a produtividade agrícola, sabe-se hoje que o uso destes compostos pode levar a uma série de problemas ambientais e ecotoxicológicos, pela perda dos recursos naturais por contaminação, podendo representar riscos inclusive à saúde humana.

Ainda que a maioria dos defensivos agrícolas seja hidrossolúvel e termolábil, para diminuir sua toxicidade e facilitar seu desaparecimento do ambiente, estes compostos devem ser suficientemente persistentes para garantir o controle de pragas e ervas daninhas (ANDREU e PICÓ, 2004). Como consequência, por ação de dispersão e lixiviação, áreas imediatamente adjacentes àquelas onde é promovida a aplicação de praguicidas podem ser contaminadas. Por esta razão, a necessidade de reduzir o impacto ambiental destes compostos tem despertado grande interesse científico.

1.1.1 Agrotóxicos e o cenário atual no Brasil

Segundo o Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002), que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, e que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências, consideramse:

"I - agrotóxicos e afins:

a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;

 b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento;

 II - componentes: os princípios ativos, os produtos técnicos, suas matérias-primas, os ingredientes inertes e aditivos usados na fabricação de agrotóxicos e afins.

III - produto formulado - agrotóxico ou afim obtido a partir de produto técnico ou de pré-mistura, por intermédio de processo físico, ou diretamente de matérias-primas por meio de processos físicos, químicos ou biológicos;

IV - produto técnico - produto obtido diretamente de matériasprimas por processo químico, físico ou biológico, destinado à obtenção de produtos formulados ou de pré-misturas e cuja composição contenha teor definido de ingrediente ativo e impurezas, podendo conter estabilizantes e produtos relacionados, tais como isômeros."

Dentre as classes de agrotóxicos, os herbicidas, empregados na agricultura para o controle de ervas daninhas, têm sido os mais utilizados nas lavouras do mundo todo. Com uma das maiores áreas agricultáveis do mundo, o Brasil é líder no consumo de agroquímicos (INCA, 2015). As vendas de defensivos agrícolas cresceram mais de 72% entre 2006 e 2012, com um aumento de 43,2% no consumo médio de quilos por hectare (SINDAG, 2012). Segundo o Instituto de Economia Agrícola (2014), as vendas destes produtos no Brasil em 2013, que chegaram a 826,7 mil toneladas, somaram US\$11,45 bilhões, 18% a mais do que no ano anterior. Os herbicidas, especificamente, alcançaram 487.743 mil toneladas, representando 54% da quantidade total de defensivos agrícolas vendidos (Figura 1).



Figura 1. Participação das classes na quantidade vendida de defensivos agrícolas. Fonte: Instituto de Economia Agrícola, 2014.

Os herbicidas comercializados em 2013 destinaram-se principalmente para culturas de soja (49,4%), cana-de-açúcar (12,9%), milho safra (8,0%) e safrinha (10,0%), pastagem (5,1%) e algodão (4,2%), sendo 68,7% não-seletivos (classe a que pertence o glifosato). A previsão de vendas de defensivos agrícolas no Brasil para 2014 era de crescimento de 6% em relação a 2013 (Instituto de Economia Agrícola, 2014).

Desde 2005, quando a tecnologia de sementes geneticamente modificadas foi regulamentada no Brasil, a Comissão Técnica Nacional de

Biossegurança (CTNBio) liberou o plantio de 35 variedades geneticamente modificadas de soja, milho, algodão e feijão, sendo 30 delas resistentes a herbicidas. Destas, quase 60% (17 variedades geneticamente modificadas) são resistentes herbicida glifosato (BRASIL, 2012).

Segundo relatório publicado pelo Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), uma organização próbiotecnologia, a área cultivada com sementes geneticamente modificadas no mundo, que era de apenas 1,7 milhões de hectares em 1996 (ano em que a Monsanto Iançou nos Estados Unidos suas primeiras sementes de soja resistente ao herbicida glifosato), chegou a 175 milhões de hectares em 2013. Atualmente, 27 países adotam a transgenia em suas lavouras. No Brasil, onde 88% da soja plantada é transgênica (ISAAA, 2014), a área cultivada com sementes geneticamente modificadas saltou para 40,3 milhões de hectares em 2013 (23% da área total produzida no mundo), ficando atrás apenas dos EUA, responsáveis por 40%, com 70,2 milhões de hectares (ISAAA, 2014).

Dentre as sementes geneticamente modificadas comercializadas no mundo, que incluem sementes de soja (48%), milho (33%), algodão (14%), canola (5%) e outros (1%), 57% são tolerantes a herbicidas (ISAAA, 2014).

Lavouras transgênicas de soja, que demandam 48% de todos os agrotóxicos vendidos no país, fazem uso de maiores quantidades de defensivos do que culturas que não adotam esta tecnologia. No caso específico de lavouras Roundup Ready[®], da Monsanto, a vantagem para o produtor está no manejo, uma vez que, embora requeira maior dosagem, estas culturas substituem vários herbicidas por um único produto, o glifosato (SINDAG, 2012).

Em um estudo sobre o saneamento básico no país, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) constatou que os resíduos de agrotóxicos são a segunda principal fonte de contaminação das águas brasileiras, estando atrás apenas do esgoto sanitário (IBGE, 2011), representando 24,5% dos resíduos gerados (Figura 2).



Figura 2. Fontes de contaminação em corpos d'água brasileiros. Fonte: adaptado de IBGE, 2011.

1.2 HERBICIDA GLIFOSATO

O glifosato (N-fosfonometil glicina), é um herbicida pós-emergente, de amplo espectro, sistêmico e não-seletivo, desenvolvido para o controle de mais de 180 ervas daninhas anuais e perenes (DUKE e POWLES, 2008; ABDULLAH et al., 1995). No Brasil, seu uso é permitido na aplicação em pós-emergência das plantas infestantes em culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pera, pêssego, pinus, seringueira, soja, trigo, uva, pastagens, e como dessecante nas culturas de aveia preta, azevém e soja. O glifosato também é utilizado como maturador de cana-de-açúcar, no controle da rebrota do eucalipto, e na eliminação de soqueira no cultivo de arroz e cana-de-açúcar (ANVISA, 2010). O volume (que varia de 0,5 a 6,0 L/ha) e frequência de aplicação são dependentes de cada cultura, e estão discriminados na bula das formulações comerciais.

Inicialmente vendido pela Monsanto com o nome de Roundup[®], o glifosato teve sua patente extinta em 2000. Atualmente existem diversas formulações comerciais do herbicida, para diferentes usos, na forma ácida ou como sais de isopropilamina, de amônio, diamônio ou potássio, e comercializados como glicina substituída, concentrado solúvel, suspensão concentrada, granulado dispersível ou emulsão óleo em água. No Brasil, 79 produtos comerciais estão registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo que 50 contêm o

ingrediente na forma ácida e os demais formulados como sais de isopropilamina (18), amônio (6), diamônio (1) e potássio (4). Os produtos formulados registrados no Brasil e seus respectivos titulares de registro, composição, formulação e classes toxicológica e ambiental estão representados em anexo (Anexo 1).

Em 1996, a Monsanto iniciou a comercialização de sementes de soja geneticamente modificadas, resistentes ao glifosato, com a marca Roundup Ready[®] (MONSANTO, 2009). A resistência das culturas ao herbicida é conferida pela presença da enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), inserida, por biobalística, através do gene CP4-EPSPS da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* CP4 (OCAÑA et al., 2007).

O desenvolvimento de culturas tolerantes a herbicidas ampliou o uso de glifosato, que se tornou o herbicida mais usado nas lavouras mundiais (BAYLIS, 2000), embora preocupações persistentes sobre os potenciais efeitos de culturas geneticamente modificadas sobre a saúde humana e o meio ambiente tenham limitado sua aceitação, particularmente na Europa e no Japão (FUNKE et al., 2006). As culturas resistentes ao glifosato comercializadas incluem soja, milho, algodão, canola (DEVINE, 2005) e representam mais de 80% dos 120 milhões de hectares de culturas transgênicas crescidas anualmente em todo o mundo (DUKE e POWLES, 2009). Dentre os países com maiores áreas plantadas de culturas transgênicas estão os EUA, Brasil, Argentina e Canadá (DILL et al., 2008). Estas culturas têm sido adotadas devido às suas vantagens econômicas, maior produtividade e facilidade no manejo de plantas daninhas quando comparadas com as culturas convencionais, uma vez que permitem a aplicação do herbicida na pós-emergência das plantas daninhas (DUKE e POWLES, 2009; DILL et al., 2008). As taxas de aplicação de glifosato também aumentaram na última década devido à evolução da tolerância e resistência de muitas espécies de plantas daninhas (VILA-AIUB et al., 2008; ZELAYA et al., 2011).

Amplamente usado na agricultura nacional, desde assentamentos da reforma agrária até grandes áreas no Centro-Oeste, o glifosato movimenta no Brasil um mercado de R\$ 1,2 bilhão anuais, com um consumo anual de cerca de 100 mil toneladas. Essa quantidade refere-se ao produto técnico, com teor acima de 95%, que ainda não foi diluído para o teor de 48%, como é comercializado (SINDAG, 2009).

1.2.1 Propriedades físico-químicas

O glifosato puro é um pó branco cristalino, inodoro, com um ponto de fusão de 184,5 °C e densidade de 1,704 (20 °C). Não é inflamável nem explosivo e possui baixa pressão de vapor (5,7x10⁻⁸ Pa, a 25°C). É bastante polar (log P = -3,2), altamente solúvel em água (12 g/L a 25 °C) e fotoestável. É uma molécula pequena (Figura 3), com três grupos funcionais (carboxila, amino e fosfonato), de massa molar 169,07 g/mol.



Figura 3. Fórmula estrutural do herbicida glifosato (N-fosfonometil glicina).

Suas características químicas são fortemente dependentes do pH, em razão dos quatro hidrogênios ionizáveis em seus grupos funcionais, com valores de pKa de pK₁ = 0,8; pK₂ = 2,16; pK₃ = 5,46; pK₄ = 10,14 (MALLAT e BARCELÓ, 1998), que indicam o grau de dissociação do glifosato em função do pH (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002). Através das curvas de distribuição de espécies, representadas na Figura 4, pode-se verificar a espécie predominante em função do pH.



Figura 4. Grau de dissociação do glifosato construído a partir dos valores de Ka, onde: α0: composto com uma protonação; α1: composto apresentando uma dissociação; α2: molécula com duas dissociações; α3: molécula com três dissociações; α4: composto totalmente dissociado. Fonte: AMARANTE JÚNIOR et al. (2002).

As dissociações ácidas do glifosato estão demonstradas na Figura 5. Pode-se observar que primeiramente ocorre a dissociação dos átomos de hidrogênio das hidroxilas, mantendo 100% da protonação do sítio da amina em pH em torno de 8,0. A dissociação do hidrogênio da amina ocorre apenas em pHs superiores a 11.



Figura 5. Dissociação do glifosato, onde pKa1 = 0,8, pKa2 = 2,16, pKa3 = 5,46 e pKa4 = 10,14. Fonte: adaptado de AMARANTE JUNIOR et al. (2002).

Os valores de coeficiente de adsorção (K_{oc}, medida da tendência de um composto orgânico de ser adsorvido por solos ou sedimentos) variam de 9 a 60.000 L/kg e são dependentes de características do solo, do pH da solução e da concentração de cátions di- e trivalentes, não estando correlacionados com a textura e conteúdo de matriz orgânica do solo (GIESY et al., 2000).

1.2.2 Mecanismo de ação

Após a aplicação, o glifosato é absorvido pelas plantas através das folhas e translocado pelo caule, folhas e raízes (ARREGUI et al., 2003). A absorção e translocação são influenciadas por diversos fatores, incluindo espécie e idade das plantas, as condições ambientais, a concentração do herbicida, o surfactante utilizado e o método de aplicação (YAMADA e CASTRO, 2007). O glifosato atua na inibição da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPS; EC 2.5.1.19), que catalisa o penúltimo passo na via do chiquimato (Figura 6), bloqueando a biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais no desenvolvimento de bactérias, leveduras, fungos, algas e plantas superiores (FUNKE et al., 2006; USEPA, 2009).



Figura 6. Sítio de ação do glifosato na via do chiquimato. Fonte: adaptado de Yamada e Castro (2007).

Os produtos da via do chiquimato incluem os aminoácidos aromáticos essenciais L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano, além de muitos metabólitos secundários, como os flavonoides, pigmentos (antocianinas), fitormônios de crescimento (auxinas), moléculas estruturais vitais (lignina) e moléculas de defesa da planta (fitoalexinas e alcaloides) (HERRMANN e WEAVER, 1999).

A enzima EPSPS cliva a ligação Cβ-O do fosfoenolpiruvato (PEP) e catalisa a transferência regioespecífica do grupamento carboxivinil para a hidroxila C5 do chiquimato-3-fosfato (S3P). Esta reação (Figura 7) resulta na produção de 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (DEWICK, 2009; LEWIS et al., 1999).



Figura 7. Reação catalisada pela EPSP sintase. Fonte: adaptado de FUNKE et al. (2006).

Quando a EPSPS é bloqueada, a via metabólica é interrompida, provocando redução na síntese de proteínas, interrupção do crescimento, lise celular e consequente morte da planta (ARREGUI et al., 2003).

1.2.3 Ecotoxicidade do herbicida glifosato

Apesar de muitos trabalhos sugerirem que o glifosato é ambientalmente seguro (GIESY et al., 2000), estudos recentes têm relatado problemas associados ao seu uso (VEIGA et al., 2001; KJAER et al., 2005).

Como a via do chiquimato não está presente em mamíferos, peixes, aves, répteis e insetos, que obtêm aminoácidos aromáticos através da sua dieta, assume-se que este herbicida não representa riscos a esses organismos (GIESY et al., 2000; USEPA, 2009). Contudo, dentre outros organismos, o glifosato tem sido descrito como tóxico para peixes (CATTANEO et al., 2011; HUED et al., 2012; MARQUES et al., 2014), aranhas (HAUGHTON et al., 2001), anfíbios (EDGE et al., 2014; RELYEA, 2005a), artrópodes (AVIGLIANO et al., 2014; MENSAH et al., 2012) e insetos (SCHNEIDER et al., 2009).

Alguns valores de CE₅₀ e CL₅₀ a diferentes organismos aquáticos estão representados na Tabela 1.

	÷	-	
Espécie	Duração do teste	CE ₅₀ /CL ₅₀	Toxicidade
Daphnia magna (com aeração)	48 h	CE ₅₀ = 37 mg/L	Levemente tóxico
Daphnia magna (sem aeração)	48 h	CE ₅₀ = 24 mg/L	Levemente tóxico
Daphnia magna	48 h	CE ₅₀ = 13 mg/L	Levemente tóxico
Selenastrum capricornutum	96 h	CE ₅₀ = 12,1 mg/L	Levemente tóxico
Lemna gibba	336 h	CE ₅₀ = 11,9 mg/L	Levemente tóxico
Gammarus pseudolimnaeus	48 h	$CE_{50} = 42 \text{ mg/L}$	Levemente tóxico
Carpa	96 h	CE ₅₀ = 19 mg/L	Levemente tóxico
Bluegill (estático)	96 h	CL ₅₀ = 34 mg/L	Levemente tóxico
Bluegill (fluxo contínuo)	96 h	CL ₅₀ = 5,8 mg/L	Moderadamente tóxico
Truta Arco-Íris (estático)	96 h	CL ₅₀ = 15-26 mg/L	Levemente tóxico
Truta Arco-Íris (fluxo contínuo)	96 h	$CL_{50} = 8,2 \text{ mg/L}$	Moderadamente tóxico
Ictalurus punctatus	96 h	CL ₅₀ = 39 mg/L	Levemente tóxico
Pimephales promelas	96 h	$CL_{50} = 23 \text{ mg/L}$	Moderadamente tóxico
Salmão Prateado	96 h	$CL_{50} = 22 \text{ mg/L}$	Levemente tóxico
Salmão-Rei	96 h	CL ₅₀ = 20 mg/L	Levemente tóxico
Salmão-Rosa	96 h	CL ₅₀ = 14-33 mg/L	Levemente tóxico

Tabela 1. Toxicidade aguda em organismos aquáticos.

Fonte: FAO, 2014; USEPA, 1993.

1.2.4 Toxicidade do glifosato a humanos

A exposição mais frequente das pessoas ao glifosato ocorre por exposição ocupacional (na aplicação e manipulação do herbicida) ou pela dieta (pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados), podendo ainda ocorrer por contato com o solo ou águas de recreação contaminados. Enquanto alguns autores afirmam que o glifosato não representa riscos à saúde humana (USEPA,

2009; WILLIAMS et al., 2000), outros, em contrapartida, relatam que o glifosato foi detectado na urina de agricultores que utilizaram o herbicida (ACQUAVELLA et al., 2004) e sugerem um aumento na incidência de danos neurológicos no desenvolvimento de crianças nascidas de agricultores expostos (GARRY et al., 2002), entre outros efeitos adversos. O mecanismo de ação, farmacocinética e metabolismo, e dados de toxicidade do glifosato a humanos são apresentados a seguir:

• Mecanismo de ação

Embora o mecanismo de ação do glifosato em plantas seja bem caracterizado, o mecanismo pelo qual este herbicida exerce efeitos tóxicos em humanos ou mamíferos experimentais ainda não está bem claro. Dois mecanismos bioquímicos de ação são discutidos na literatura sobre o glifosato: (1) desacoplamento da fosforilação oxidativa; e (2) a inibição de oxidases hepáticas de função mista.

A fosforilação oxidativa é um processo metabólico fundamental no qual a energia metabólica derivada da oxidação de nutrientes é transferida para e armazenada em ligações de fosfato de alta energia. O desacoplamento deste processo resulta em perda de energia no organismo, conduzindo à morte. Os sintomas incluem aumento da frequência cardíaca (taquicardia), aumento da frequência respiratória, dificuldade para respirar, sudorese profusa, febre, acidose metabólica e perda de peso (ATSDR, 2002). Com base em uma série de testes com mitocôndrias de fígado de ratos expostos ao sal de isopropilamina de glifosato, um desacoplamento da fosforilação oxidativa tem sido relatado em vários estudos (SERA, 2011). Este processo foi observado após administração de baixas doses intraperitoneais (15 mg/kg) por Olorunsogo et al. (1979).

O outro mecanismo específico de ação do glifosato envolve a inibição das oxidases de função mista, uma classe de enzimas constituídas por várias isoenzimas do citocromo P450, que está envolvido no metabolismo de diversos compostos endógenos, bem como xenobióticos. Diminuições na atividade de oxidases de função mista *in vivo* não foram observadas após a administração de doses de 500 mg/kg/dia de glifosato (Roundup[®] 360 g/L) em ratos durante 4 dias, seguido por doses de 300 mg/kg/dia durante 6 dias (HIETANEN et al.,

1983). Já estudos *in vitro* demonstraram inibição da atividade do P450 em células de mamíferos (RICHARD et al., 2005).

Farmacocinética e metabolismo

As características gerais da farmacocinética do glifosato foram revisadas por diversos grupos (USEPA, 1993; WHO, 1994; WILLIAMS et al., 2000). Em pH fisiológico o glifosato tem carga negativa e, como moléculas carregadas não atravessam facilmente as membranas biológicas normais e intactas, o glifosato não é facilmente absorvido por seres humanos ou outros mamíferos.

Após administração oral, a maior parte do glifosato permanece no trato gastrointestinal (BREWSTER et al., 1991). A biodisponibilidade oral estimada deste herbicida é de cerca de 23% (ANADÓN et al., 2009). Vasiluk et al. (2005) relataram que, em concentrações elevadas (superiores a 10 g/L ou 1% m/v), o glifosato pode danificar as células do intestino, o que poderia contribuir para a absorção mais rápida após exposição oral.

O glifosato não é extensivamente metabolizado, sendo mais do que 95% excretado na forma inalterada pelas fezes (62-64%) e urina (WILLIAMS et al., 2000). Na pequena proporção que é biotransformada, o metabólito mais frequentemente observado é o ácido aminometilfosfônico (AMPA), que é o único metabólito quantificado em estudos farmacocinéticos (ANADÓN et al., 2009).

A eliminação de glifosato do plasma é extremamente rápida. Anadón et al. (2009) relataram tempos de meia-vida de cerca de 10 horas após a administração intravenosa e 14 horas após a administração oral. Brewster et al. (1991) relataram uma meia-vida de todo o corpo de cerca de 52 horas (2,2 dias), o que corresponde a uma taxa de eliminação de cerca de 0,3 por dia.
• Dados de toxicidade

A. Toxicidade aguda

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA, 1993), o glifosato possui toxicidades aguda oral e dérmica relativamente baixas e está classificado na Categoria Toxicológica III para esses efeitos (em uma escala de I a IV, onde IV é o menos tóxico).

A Tabela 2 resume os resultados de toxicidade aguda e categorias para o glifosato grau técnico publicado pela USEPA (1993). O estudo de inalação aguda é dispensado dado que o glifosato técnico é um sólido não-volátil (USEPA, 1993).

Teste de toxicidade	Resultado	Categoria
Oral aguda (ratos)	> 4320 mg/kg	III
Dérmica aguda (coelhos)	> 2 g/kg	III
Inalação aguda	Não requerido	-
Irritação ocular	irritação leve, desaparece em 7 dias	III
Irritação dérmica	ligeira irritação	IV
Sensibilização cutânea	negativo	-

 Tabela 2. Toxicidade aguda do herbicida glifosato.

Fonte: USEPA (1993).

Os valores de toxicidade oral e dérmica de glifosato considerados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994) são maiores do que 5000 mg/kg de peso corpóreo em ratos, o que o coloca na categoria menos tóxica (IV) da USEPA.

Os dados relativos à exposição dérmica indicam taxas de absorção extremamente baixas. Em estudos realizados com macacos rhesus, a absorção de glifosato variou de 0,4 a 2,2% (WESTER et al., 1991; MAIBACH, 1986), dependendo do tipo de material aplicado (formulação diluída, não-diluída ou glifosato puro), da duração da exposição e do volume aplicado.

Efeitos gastrointestinais (náusea, vômitos e dor abdominal), ulceração dificuldade respiratória, orofaringeal, oligúria, taquicardia, hipercalemia, hipotensão, falência renal, toxicidade hepática, acidose metabólica e consciência alterada foram descritos em casos de exposição humana ao glifosato e formulações comerciais (LEE et al., 2000; ROBERTS et al., 2010; ZOUAOUI et al., 2013). MALHOTRA et al. (2010) também observaram encefalopatia prolongada, porém reversível, sugerindo toxicidade ao sistema nervosa central. Segundo Zouaoui et al. (2013), que encontraram concentrações de glifosato no sangue que variaram de 0,6 a 150 mg/L e 690 a 7480 mg/L em pacientes com intoxicação leve a moderada e que vieram à óbito, respectivamente, em casos fatais, os sintomas mais comuns são choque cardiovascular, parada cardiorrespiratória, distúrbio hemodinâmico e falência múltipla dos órgãos. Sribanditmongkol et al. (2012) também observaram edema pulmonar, hemorragia gástrica e dilatação intestinal na autópsia de um paciente que ingeriu 500 mL de Roundup[®].

Surfactantes, associados a produtos formulados para aumentar a eficiência do glifosato, podem lisar e dissolver membranas biológicas. Esse é provavelmente o fator dominante em alguns dos efeitos descritos em casos de ingestão de formulações de glifosato por humanos (DEO e SHETTY, 2012; SRIBANDITMONGKOL et al., 2012). Mesnage et al. (2013) observaram uma toxicidade mais do que 10.000 vezes maior de adjuvantes etoxilados presentes em produtos formulados a base de glifosato do que o princípio ativo *per se*.

Na análise de casos de intoxicação intencional (tentativas de suicídio) por glifosato em Taiwan, mortes foram associadas a formulações de glifosato contendo surfactantes na faixa de 330 ± 42 mL, ao passo que a sobrevivência foi observada após a ingestão de doses de 122 ± 12 mL (LEE et al., 2000).

B. Toxicidade subcrônica e crônica

Um dos sintomas mais consistentes observado em camundongos e ratos após a exposição subcrônica ou crônica ao glifosato é a redução no peso corporal. Outros sintomas de toxicidade parecem genéricos e inespecíficos (SERA, 2011). Alguns estudos relatam alterações no peso do fígado e na composição bioquímica do sangue, sugerindo toxicidade hepática leve ou patologia hepática. Entretanto, sintomas de toxicidade renal, com base em observações em humanos que ingeriram o composto na tentativa de suicídio, não foram relatados de forma consistente e não parecem graves. O Programa Nacional de Toxicologia (NTP) do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (HHS) resumiu várias mudanças hematológicas observadas em ratos e camundongos expostos a doses elevadas do herbicida (NTP, 1992). No entanto, esses efeitos foram atribuídos à desidratação, não sendo associados com sinais evidentes de toxicidade.

Seralini et al. (2012) observaram alterações bioquímicas e fisiológicas significativas em ratos expostos ao herbicida Roundup[®] em concentrações inferiores aos limites de segurança oficialmente estabelecidos. Dentre os efeitos relatados estão o desenvolvimento de tumores, anormalidades na glândula pituitária, modificação do balanço hormonal, congestão e necrose do fígado, nefropatias, entre outros.

Larsen et al. (2012) avaliaram os efeitos da exposição de ratos Wistar, por 30 ou 90 dias, nas concentrações de 0,7 mg/L (o limite máximo de glifosato na água de consumo definido pela USEPA) e 7 mg/L. Os autores não encontraram alterações histomorfológicas no fígado, rins e intestino delgado na menor dose. Porém, modificações bioquímicas foram observadas mesmo em doses 3 a 20 vezes inferiores à dose referência definida pela USEPA, de 2 mg/kg/dia.

Na revisão de diversos estudos sobre a toxicidade subcrônica e crônica do glifosato, Williams et al. (2000) assumem que não foram observados efeitos adversos relacionados ao tratamento de ratos, camundongos ou cães após a administração de doses extremamente elevadas (>20.000 mg/kg p.c.) por diversas semanas.

Os estudos de toxicidade subcrônica e crônica em formulações comerciais não são necessários para o registro de agrotóxicos (USEPA, 1993).

C. Toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento

Estudos de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento são a base para os cálculos de doses de referência propostos pela USEPA. Glifosato grau técnico foi testado em estudos de desenvolvimento para avaliar sua capacidade de causar defeitos de nascimento e em estudos de reprodução multigeração para avaliar seus efeitos globais sobre a capacidade reprodutiva. Em estudos de toxicidade de desenvolvimento utilizando ratos e coelhos prenhes, o glifosato causou efeitos relacionados ao tratamento nos grupos de doses elevadas, incluindo diarreia, diminuição no ganho de peso corporal, secreção nasal e morte. Os valores de NOAEL (nível em que não é observado efeito adverso) foram de 1000 mg/kg p.c./dia para ratos, tanto para toxicidade materna quanto fetal. Em coelhos, valores de NOAEL variaram de 100 a 175 mg/kg p.c./dia em estudos de toxicidade materna e de 175 a 350 mg/kg p.c./dia de toxicidade fetal (SERA, 2011; WILLIAMS et al., 2012).

Em uma análise crítica dos resultados publicados acerca do desenvolvimento e reprodução em seres humanos e animais após a exposição ao glifosato, Williams et al. (2012) concluíram que a literatura disponível não mostra nenhuma evidência sólida que associa a exposição ao glifosato aos efeitos adversos de desenvolvimento ou reprodutivos em concentrações reais de exposição.

D. Mutagenicidade

Segundo a USEPA, todos os ensaios de glifosato para mutações hereditárias foram negativos. Portanto, com base nos estudos que a USEPA exige para registro de agrotóxicos, a agência concluiu que o glifosato não é mutagênico ou clastogênico (USEPA, 2002). A mutagenicidade refere-se a uma alteração (que pode ser hereditária) nos cromossomos, enquanto que efeitos clastogênicos envolvem quebras cromossômicas induzidas por um agente químico ou físico. Já o termo genotoxicidade pode referir-se a qualquer tipo de dano ao DNA.

Embora alguns autores afirmem, com base em ensaios *in vitro*, que o glifosato e suas formulações podem causar danos ao material genético das células (KAYA et al., 2000; RANK et al., 1993), Williams et al. (2012) afirmam que a evidência de efeitos genotóxicos descrita por outros autores foi observada em concentrações muito elevadas, com *endpoints* irrelevantes e/ou em ensaios

não-validados e mal conduzidos, corroborando os dados da USEPA (2002), de que o glifosato não é mutagênico nem clastogênico. A revisão publicada por Kier e Kirkland (2013), em que um grande volume de dados de genotoxicidade foi avaliado, corrobora os argumentos de Williams et al. (2012), afirmando que tanto o glifosato quanto formulações comerciais desse herbicida apresentam genotoxicidade insignificante (KIER e KIRKLAND, 2013).

E. Carcinogenicidade

Com base em estudos de toxicidade crônica e carcinogenicidade com ratos, camundongos e cães beagle, a USEPA (1993) classificou o glifosato na categoria E, com evidência de ausência de carcinogenicidade a humanos.

Para examinar os potenciais riscos de câncer em seres humanos, Mink et al. (2012) recentemente fizeram uma extensa revisão epidemiológica, para avaliar se a exposição ao glifosato apresenta risco de câncer em seres humanos. Os autores não encontraram nenhum padrão consistente de associações positivas indicando uma relação causal entre o câncer em adultos ou crianças ou qualquer tipo de câncer sítio-específico e de exposição ao glifosato.

F. Neurotoxicidade

De acordo com a USEPA (1993), estudos de toxicidade de glifosato não sugerem que esse herbicida é neurotóxico e que testes de toxicidade específicos para neurotoxicidade não são necessários.

G. Efeitos Endócrinos

Diversos ensaios *in vitro* sugerem que o glifosato, bem como suas formulações comerciais, têm um baixo potencial para a desregulação endócrina. Mas alguns estudos mais recentes levantam a preocupação de que o glifosato e algumas formulações desse herbicida podem ser capazes de afetar a função endócrina pela inibição da síntese de hormônios, ligando-se a receptores de hormônios ou pela alteração da expressão gênica (SERA, 2011).

Foi relatado também que a exposição prolongada ao glifosato pode causar efeitos endócrinos em mamíferos (RICHARD et al., 2005) e que o Roundup[®] pode inibir a produção de esteroides em homens, com consequente perda de fertilidade (WALSH et al., 2000).

Como mencionado anteriormente, acerca do seu mecanismo de ação, o glifosato e suas formulações podem inibir a atividade ou funções mistas de oxidases, uma classe de enzimas que compreende várias isoenzimas do citocromo P450. Benachour et al. (2007) obseravaram alteração na atividade de uma dessas enzimas, referida genericamente como uma aromatase, envolvida na síntese de hormônios sexuais a partir de colesterol (especificamente pela conversão de hormônios masculinos para hormônios femininos).

Valores de ingestão seguros preconizados por agências normativas

Embora existam diferenças entre países quanto aos limites máximos permitidos, os herbicidas são substâncias de uso controlado em várias partes do mundo. Enquanto a velocidade de consumo avança, no Brasil tem-se dificuldade de ação de controle, falta de recursos humanos e falta de laboratórios para monitoramento adequado. Dada, ainda, a liderança brasileira no consumo dessa classe de compostos, é de fundamental relevância o monitoramento frequente deste herbicida em amostras de água e alimentos.

A nova Portaria MS 2914 (BRASIL, 2011), que revoga a MS 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) e dispõe sobre a qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, estabelece o valor de 500 µg/L como limite máximo do contaminante glifosato mais seu principal metabólito, o AMPA. A Resolução CONAMA Nº 357 (BRASIL, 2005), que dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, define como valor máximo permitido de glifosato a concentração de 65 µg/L e 280 µg/L para os padrões de qualidade de águas doces pertencentes

às classes 1 e 3, respectivamente. A classe 1 compreende águas destinadas ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção; à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e, à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral. Já a classe 3 inclui águas para abastecimento para consumo humano após tratamento convencional ou avançado; para irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de contato secundário; e para dessedentação de animais (BRASIL, 2005).

Nos EUA, o nível máximo de contaminante (MCL) de glifosato na água de consumo é de 0,7 mg/L, mais elevado do que os valores de MCL de outros praguicidas (USEPA, 2012). Entretanto, esta concentração é muito maior do que o nível tolerável Europeu de apenas 0,1 µg/L (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 1998). Esta discrepância acontece porque, enquanto que nos EUA o valor está baseado em testes de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento, na Europa, o valor de 0,1 µg/L é o MCL para todos os praguicidas.

Os valores de limite máximo de resíduo, intervalo de segurança e ingestão diária aceitável (nacional e definidos pelo Codex Alimentarius) das diferentes culturas que empregam glifosato estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de limite máximo de resíduo, intervalo de segurança e ingestão diáriaaceitável de glifosato em diferentes culturas que fazem uso do herbicida no
Brasil.

		LMR		
Cultura*	(mg/ł	kg produto)	Intervalo	
ounturu		Codex	de	IDA
	Nacional	Alimentarius	Segurança	(mg/kg p.c.)
Algodão	3	40	1	0,042
Ameixa	0,2	-	17	0,042
Arroz	0,2	0,1	1	0,042
Aveia Preta	20	100	4	NC
Banana	0,02	0,05	30	0,042
Cacau	0,1	-	30	0,042
Café	1	-	15	0,042
Cana-de-açúcar	1	2	30	0,042
Citros	0,2	-	30	0,042
Сосо	0,2	-	15	0,042
Feijão	0,05	2	-	0,042
Maçã	0,2	-	15	0,042
Mamão	0,1	-	3	0,042
Milho	0,1	5	1	0,042
Nectarina	0,2	-	30	0,042
Pastagens	0,2	-	-	0,042
Pêra	0,2	-	15	0,042
Pêssego	0,2	-	30	0,042
Soja**	10	20	Variável	0,042
Trigo	0,06	5	1	0,042
Uva	0,2	-	17	0,042

*Culturas de eucalipto, fumo, pinus e seringueira, por não serem alimentos, não são regulamentados.

** O intervalo de segurança para a cultura da soja não é determinado quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e pré-emergência da cultura. Quando aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e da cultura de soja geneticamente modificada, o intervalo de segurança é de 56 dias, e quando aplicado para dessecação, de 7 dias. O LMR foi estabelecido para aplicação em pós-emergência das plantas infestantes e da cultura da soja geneticamente modificada.

Fonte: BRASIL, 2003; WHO/FAO, 2013.

1.2.5 Degradação do glifosato

Apesar de uma grande variedade de microrganismos do solo ser capaz de degradar o glifosato, as bactérias parecem desempenhar o principal papel na biodegradação desse herbicida (FORLANI et al., 1999). Segundo Rueppel et al. (1977) e Strange-Hansen et al. (2004), a degradação do glifosato no solo é um processo puramente microbiológico, já que praticamente nenhuma degradação em solo estéril foi observada. Barrett et al. (2005), no entanto, observaram a degradação de glifosato e AMPA em condições abióticas, em birnessita, um tipo de óxido de manganês comum em solos.

Os microrganismos degradam o glifosato por duas vias. Uma via leva à formação de AMPA, o principal metabólito, enquanto a outra leva à formação intermediária de sarcosina e glicina (Figura 8).



Figura 8. Mecanismo de degradação do glifosato. Fonte: Adaptado de BORGGAARD e GIMSING (2008).

Na via do AMPA, pela ação da enzima glioxilato oxi-redutase, primeiramente ocorre a clivagem da ligação C–N do glifosato, produzindo AMPA e glioxilato (JACOB et al., 1988). O AMPA é posteriormente clivado pela enzima C–P liase para produzir fosfato inorgânico (Pi) e metilamina. Por fim, a metilamina é mineralizada em dióxido de carbono e amônio, e o glioxilato metabolizado através do ciclo do glioxilato (BORGGAARD e GIMSING, 2008).

Na via da sarcosina, a clivagem da ligação C–P do glifosato é catalisada pela enzima C–P liase, produzindo fosfato e sarcosina. A sarcosina, por sua vez, é subsequentemente degradada em glicina e formaldeído por ação da sarcosina oxidase (DICK e QUINN, 1995). Já o formaldeído entra na via de transferência de carbono (tetrahidrofolato) e a glicina é metabolizada a dióxido de carbono e amônio (KISHORE e JACOB, 1987).

A degradação do glifosato no solo ocorre sem uma fase lag e parece ser inversamente correlacionada com a capacidade de adsorção do glifosato ao solo, ou seja, se adsorção é forte, a degradação é reduzida, possivelmente devido à sua baixa biodisponibilidade (FORLANI, 1999). Embora alguns autores assumam que o glifosato é prontamente degradado no solo (GIESY et al., 2000), estudos enfatizam que esse não é sempre o caso, e que a taxa de degradação depende da grande variabilidade entre os solos (STRANGE-HANSEN et al., 2004) e aumenta com o aumento da temperatura (BORGGAARD e GIMSING, 2008).

Tanto o glifosato quanto o AMPA são degradados sob condições aeróbias e anaeróbias, mas a degradação sob anaerobiose é normalmente menor (BORGGAARD e GIMSING, 2008; RUEPPEL et al., 1977). Alguns microrganismos demonstraram capacidade de utilizar o glifosato como fonte alternativa de fósforo, mas não como uma fonte de carbono ou nitrogênio (DICK e QUINN, 1995; KISHORE e JACOB, 1987). Embora a atividade da C-P liase seja induzida sob privação de fosfato, sendo a degradação do glifosato negativamente afetada pela presença desse composto (KONONOVA e NESMEYANOVA, 2002), microrganismos capazes de utilizar o glifosato como uma fonte de carbono ou de nitrogênio, mesmo na presença de fosfato, têm sido isolados (KRZYŚKO-LUPICKA e ORLIK, 1997).

1.2.6 Destino do glifosato no meio ambiente

O destino de praguicidas no solo é controlado por processos químicos, físicos e biológicos, que podem ser agrupados em processos que afetam a persistência, que incluem a degradação química e microbiana, e os que afetam a mobilidade, envolvendo adsorção ao solo, absorção pelas plantas, volatilização, deriva promovida pelo vento, escoamento e lixiviação (ANDREU e PICÓ, 2004). Além dos processos supracitados, o grau de dissipação de praguicidas no ambiente também está relacionado à sua quantidade e forma de aplicação, uma vez que é dependente de fatores como tamanho de gotículas, altura da aplicação, distância da aplicação dos corpos d'água e condições meteorológicas (vento, temperatura e pluviosidade). A aplicação por pulverização é a que apresenta maior risco de contaminação do ambiente aquático (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

A contaminação de águas superficiais pode ocorrer, ainda, pela pulverização direta do herbicida na água para o controle de algas ou plantas aquáticas (SOLOMON e THOMPSON, 2003), por meio de efluentes de estações de tratamento de água (KOLPIN et al., 2006) e da lavagem de embalagens e tanques de máquinas de fumigação em corpos d'água próximos às áreas de cultivo (VERA et al., 2010). Um esquema do destino do glifosato no ambiente, está representado na Figura 9.



Figura 9. Destino do herbicida glifosato no ambiente. Fonte: adaptado de Helander et al. (2012).

O glifosato e seus sais são estáveis por pelo menos 30 dias à fotólise e sua dissipação está relacionada ao ambiente (USEPA, 2009). O fato da molécula do glifosato ser relativamente pequena e possuir três grupos funcionais polares (carboxil, amino e fosfonato) na sua estrutura fazem com que ele seja fortemente adsorvido aos componentes minerais do solo. Como o glifosato liga-se ao solo através do grupamento fosfonato, e esse reage de forma semelhante ao fosfato, ambos podem competir pelos sítios de ligação na superfície do solo, o que pode afetar a absorção do herbicida e, consequentemente, sua mobilidade em solos ricos em fosfato (BORGGAARD e GIMSING, 2008).

Em testes de dissipação no campo, a meia-vida do glifosato no solo variou de 2 a 197 dias (GIESY et al., 2000). A variabilidade da meia-vida é devida a diferenças na atividade microbiana e extensão da adsorção ao solo (COUPE et al., 2012). Aplicações repetidas de glifosato, entretanto, podem aumentar a sua persistência no solo (ANDRÉA et al., 2003). No que concerne à influência da temperatura na cinética de degradação e adsorção do glifosato ao solo, estimase que a taxa de adsorção aumente em temperaturas mais elevadas (BORGGAARD e GIMSING, 2008), ou seja, o glifosato tem meia-vida maior em climas frios do que quentes (USEPA, 2009).

A deriva do glifosato no ambiente depende do tempo e da intensidade da primeira chuva após a aplicação (NORGAARD et al., 2014). Embora ele seja fortemente adsorvido ao solo, o que reduz a quantidade carreada por escoamento durante eventos de precipitação (BYER et al., 2008), sua elevada solubilidade em água facilita seu transporte, inclusive em solos estruturados, representando riscos para ambientes aquáticos (KJAER et al., 2005). O glifosato pode ser carreado para águas superficiais e subterrâneas em solução ou suspensão, isto é, transportado como soluto ou co-transportado ligado aos coloides do solo. Tanto o glifosato dissolvido quanto aquele ligado às partículas de solo podem ser carreados por lixiviação sobre o solo (por escoamento superficial) e através do solo (por escoamento subsuperficial). Em solos com uso prolongado de glifosato, com baixa capacidade de sorção e baixa taxa de biodegradação, essencialmente em solos arenosos, pobres em óxidos e com alta condutividade hidráulica e que recebem taxas de precipitação elevadas, o material lixiviado da subsuperfície pode percolar o solo e atingir águas subterrâneas. Já o glifosato que sofre escoamento superficial é transportado para águas superficiais, como rios, córregos e lagos, onde pode permanecer na fase aquosa ou ser preso por sorção no sedimento de corpos hídricos (BORGGAARD e GIMSING, 2008). Em sistemas lênticos (de água parada, como lagos e reservatórios), a profundidade e a mistura vertical da água são determinantes nas taxas de adsorção aos sedimentos. Em sistemas lóticos (de água corrente), além da profundidade, a turbulência e fluxo da água resultam em um decréscimo rápido da concentração do herbicida, aumentando sua ligação a partículas suspensas ou do sedimento (SOLOMON e THOMPSON, 2003). A meia-vida do glifosato na água é de 49 a 70 dias (GIESY et al., 2000).

Glifosato e AMPA têm sido frequentemente detectados em águas naturais próximas a áreas agrícolas (MATTOS et al., 2002; COUPE et al., 2012) e urbanas (GLOZIER et al., 2012; KOLPIN et al., 2006; RAMWELL et al., 2014), sendo encontrados inclusive na atmosfera e em amostras de água pluvial (SCRIBNER et al., 2007; CHANG et al., 2011a). Ainda que amostras de águas subterrâneas não tenham sido amplamente investigadas, Mörtl et al. (2012), Sanchís et al. (2012) e Scribner et al. (2007) observaram que o glifosato é capaz de atingir esse tipo de matriz. O conteúdo de água no solo e a profundidade do lençol freático em relação ao local onde ocorre a aplicação são determinantes no grau de percolação do glifosato (NORGAARD et al., 2014). Scribner et al. (2007) relataram concentrações acima do limite máximo europeu de 0,1 µg/L em amostras de água subterrânea, com uma concentração máxima de 4,7 µg/L. Concentrações de glifosato e AMPA encontradas em amostras ambientais de água de diferentes tipos e locais estão relacionadas na Tabela 4.

MATDIZ	CONCENTR	RAÇÃO (μg/L)		DEEEDÊNCIA	
	Glifosato	AMPA		REFERENCIA	
Água superficial	Traços - 7,6	Traços - 1,3	Sudeste de Buenos Aires (Argentina)	APARICIO et al., 2013	
Água superficial	0,1-8,7	0,1-3,6	51 córregos de 9 Estados do Meio- Oeste dos EUA	BATTAGLIN et al., 2005	
Água superficial	<0,02-328	<0,02-41	Lagos vernais de Washington DC, Iowa, Maryland e Wyoming (EUA)	BATTAGLIN et al., 2009	
Água superficial	<0,1-1,082 <0,1-0,196	0,231-1,925 0,233-0,786	Rio Böele (França) Rio Orge (França)	BOTTA et al., 2009	
Água superficial	<0,02-12	<0,02-2,08	Mais de 150 locais de Ontário (Canadá)	BYER et al., 2008	
Á sur a sur a fi a la	0,03-73	0,12-28	Mississippi (EUA)		
	<0,02-290	<0,02-400 Iowa (EUA)			
Agua superiiciai	0,15-430	0,07-29	Indiana (EUA)		
	<0,1-86	0,2-44	Rouffach (França)		
Água superficial	100-700	-	Zona Pergamino- Arrecifes (Argentina)	PERUZZO et al., 2008	
Água superficial	0,21-0,74	0,17-4,17	Rio Jauron (França)	PESCE et al., 2008	
Água superficial	<0,025-0,59	<0,05-0,12	Rio Ruhr, North- Rhine Westphalia (Alemanha)	SKARK et al., 1998	
Água superficial	<0,5-40,8	<17-66	Rios e riachos de Ontário (Canadá)	STRUGER et al., 2008	
Água superficial	0,13-1,01	0,03-0,75	Amostras de rio (não identificado)	SUN et al., 2010	
Água superficial	0,44-59,9	2,01-9,09	Flórida (EUA)	RAMIREZ et al., 2014	
				continua	

Tabela 4. Concentrações de glifosato e AMPA encontradas em amostras ambientais de água.

MATDIZ	CONCENTRAÇÃO (µg/L)			DEEEDÊNCIA	
	Glifosato	AMPA		REFERENCIA	
Rios e córregos urbanos	<0,1-2,2	<0,1-3,9	29 córregos e 11 efluentes tratados (EUA)	KOLPIN et al., 2006	
Rios e córregos urbanos	<0,02-11,8	<0,02-20,8	16 bacias hidrográficas do Canadá	GLOZIER et al., 2012	
Água superficial Água subterrânea	0,12-0,68 0,50-0,98	-	Békés, Hungria	MÖRTL et al., 2012	
Água subterrânea	<0,01-2,6	-	Catalunha, Espanha	SANCHÍS et al., 2012	
Água superficial	<0,1-427	<0,1-41			
Água subterrânea	<0,1-4,7	<0,1-2,6	EUA	SCRIBNER et al., 2007	
Água da chuva	0,3-1,0	0,02-0,47			
Água da chuva	<0,1-2,5	<0,1-0,48	Mississippi, Iowa e Indiana (EUA)	CHANG et al., 2011a	
Água de drenagem	<0,1-2,1	0,02-0,73	Faardrup, Jyndevad e Estrup (Dinamarca)	KJAER et al., 2005	
Água de lavoura de arroz irrigado	13-144	5,9-113,6	Arroio Bretanhas e Lagoa Mirim (Litoral Sul do RS, Brasil)	MATTOS et al., 2002	

Tabela 4. (continuação)

Conclusão

Aparício et al. (2013) detectaram concentrações muito maiores de glifosato e AMPA em amostras de material particulado em suspensão e sedimentos do que na água. Além disso, enquanto que nas amostras de água as concentrações máximas de glifosato e AMPA foram de 7,6 e 1,3 µg/L, respectivamente, solos cultivados apresentaram concentrações que variaram de 35 a 1502 µg/kg para o glifosato e de 299 a 2256 µg/kg para o AMPA.

O AMPA tem baixa solubilidade em água (5,8 g/L a 25 °C) e uma meiavida que varia de 76 a 240 dias no solo, o que o torna razoavelmente persistente no meio ambiente, podendo ser detectado por muito tempo após a aplicação e a uma certa distância do local de aplicação (GIESY et al., 2000). Assim como o glifosato, o AMPA é fortemente adsorvido nas partículas do solo, especialmente minerais argilosos, podendo chegar a uma persistência superior a 170 dias (VEREECKEN, 2005). Foram encontrados resíduos de AMPA até 120 dias após a aplicação nos canais de irrigação e drenagem de lavoura de arroz, em concentrações que variaram de 5,9 a 113,6 µg/L no litoral sul do Brasil (MATTOS et al., 2002). Já Edwards et al. (1980) relataram concentrações de glifosato no escoamento superficial de pequenas bacias com plantio direto de milho que chegaram a 5,2 mg/L, tendo sido detectado até quatro meses após a aplicação.

Para que seja passível a identificação, ocorrência, avaliação da estabilidade e do destino de herbicidas em ambientes aquáticos, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e precisos que permitam o monitoramento destes compostos. Diversos métodos de análise de glifosato em amostras de água e solo já foram descritos, sendo os mais comuns realizados por técnicas instrumentais de cromatografia em fase líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS e LC-MS/MS) (IBÂNEX et al., 2005; VREEKEN et al., 1998). Métodos analíticos por cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) (BORJESSON e TORSTENSSON, 2000; TSUJI et al., 1997; STALIKAS e PILIDIS, 2000; TSUNODA, 1993), imunoensaio (BYER et al., 2008; MÖRTL et al., 2012; SANCHÍS et al., 2012), e eletroforese capilar com detecção por espectrometria de massas (CE-MS) (JIANG e LUCY, 2007; SAFARPOUR e ASIAIE, 2005) também foram publicados. Antes das análises cromatográficas, a utilização da extração em fase sólida (SPE) para limpeza (clean up) e concentração das amostras (CORBERA et al., 2006; HANKE et al., 2008; IBÁÑEX et al., 2005; VREEKEN et al., 1998; WAGNER et al., 2012), assim como a derivatização de glifosato e AMPA (HANKE et al., 2008; SUN et al., 2010) se mostraram estratégias recorrentes adotadas pelos autores para melhorar a sensibilidade de detecção desses analitos.

Métodos pouco sensíveis (com altos limites de detecção) diminuem a probabilidade de detecção de praguicidas em águas superficiais, reduzindo a capacidade de mensurar e caracterizar adequadamente a sazonalidade de baixas concentrações. Mesmo baixas, estas concentrações são ecológica e toxicologicamente relevantes, e sua detecção é fundamental nas avaliações de risco (DE SOLLA et al., 2012).

Considerando-se a intensa prática agrícola em terras próximas a corpos d'água naturais e, sabendo-se que parte do herbicida pulverizado sofre deriva, é inevitável que organismos aquáticos também sejam expostos. Enquanto as plantas terrestres são expostas apenas parcialmente e por um tempo definido, organismos aquáticos (especialmente aqueles que vivem em ambientes lênticos) podem ser expostos por um longo período, o que pode torná-los mais sensíveis do que as plantas terrestres (CEDERGREEN e STREIBIG, 2005). Em contrapartida, herbicidas são diluídos quando atingem corpos d'água, o que reduz sua toxicidade. Ainda assim, tem crescido o número de trabalhos que descrevem o efeito de herbicidas em cianobactérias, organismos não-alvo, que podem ser afetados positiva ou negativamente, através do estímulo ou inibição de seu crescimento.

1.3 CIANOBACTÉRIAS

Com cerca de 3,5 bilhões de anos, as cianobactérias constituem o grupo de organismos mais antigos da Terra. Estima-se que esses organismos sejam os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera, contribuindo para o desenvolvimento da vida no planeta e tendo, até hoje, papel importante na manutenção da biosfera (TANDEAU DE MARSAC e HOUMARD, 1993; CHORUS e BARTRAM, 1999). Amplamente distribuídas por todo o mundo, cianobactérias podem ser encontradas em sistemas aquáticos (de água doce e marinha) e terrestres, inclusive em ambientes inóspitos, desde desertos áridos e águas termais, até lagos glaciais (HERRERO et al., 2001).

Pertencentes ao domínio Cyanobacteria, constituído por uma única classe (Cyanophyceae), cianobactérias ocupam a posição intermediária entre algas eucarióticas e bactérias, uma vez que apresentam clorofila-a, porém sem sistema de membranas. São microrganismos procarióticos, aeróbios e fotossintetizantes, que necessitam de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas (zinco, ferro, cobre, nitrogênio, fósforo, entre outros) e luz para manter seu metabolismo (CARMICHAEL, 1992).

A energia utilizada em seus processos vitais provém da fotossíntese, que é similar a dos vegetais superiores e algas verdes, tendo como principal pigmento de captação de luz a clorofila-a. As cianobactérias possuem os fotossistemas I e II, e sintetizam uma gama de pigmentos acessórios, predominantemente ficobiliproteínas, além de alguns carotenoides que auxiliam tanto na captação de luz como na proteção contra a foto-oxidação da clorofila-a (NELSON e COX, 2002). Em resposta a mudanças ambientais, ou outros interferentes, a síntese de alguns desses pigmentos pode variar, alterando o metabolismo da cianobactéria (BRYANT et al., 1979). Os pigmentos e componentes celulares (como substâncias de reserva, carboxissomos e ribossomos), assim como o material genético, estão dispersos no citoplasma (AZEVEDO e SANT'ANNA, 2006).

Algumas cianobactérias também possuem em sua estrutura aerótopos (vacúolos de ar constituídos de pequenas vesículas gasosas, permeáveis

somente a gases), que conferem flutuabilidade a esses organismos na coluna d'água. Esta característica, considerada uma adaptação a diferentes intensidades luminosas, permite às cianobactérias movimentarem-se de acordo com sua necessidade de regulação metabólica e fotossintética (AZEVEDO e SANT'ANNA, 2006).

Com relação à morfologia, as cianobactérias podem apresentar-se na forma unicelular (com morfologia esférica, ovoide ou cilíndrica), em colônias, ou como filamentos multicelulares, retos ou espiralados, chamados tricomas (RIPPKA et al., 1979; CHORUS e BARTRAM, 1999). Assim como nas bactérias Gram negativas, a parede celular de cianobactérias é composta por um envelope mucilagionoso (essencialmente polissacarídeos) e, ainda de forma análoga às bactérias, cianobactérias não possuem membranas envolvendo o núcleo, nem as organelas celulares – plastos, mitocôndria, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (GRAHAM e WILCOX, 2000). Sua reprodução é assexuada, geralmente por fissão binária ou múltipla, com fragmentação do tricoma nas espécies filamentosas (CHORUS e BARTRAM, 1999).

As cianobactérias podem tornar-se dominantes em águas com pH neutroalcalino (pH 6-9), altas concentrações de nitrogênio e fósforo, e temperaturas entre 15 a 30 °C, crescendo exageradamente e formando o que é conhecido como floração (TANDEU DE MARSAC e HOUMARD, 1993; CHORUS e BARTRAM, 1999). Esse fenômeno, comumente identificado a olho nu como uma densa camada de células, é definido como o aumento significativo de biomassa fitoplanctônica em um corpo d'água (WHITTON e POTTS, 2000).

O fator mais fortemente apontado como responsável pela dominância das cianobactérias é a eutrofização antrópica de corpos hídricos, gerada pelo grande aporte de nutrientes (essencialmente nitrogênio e fósforo), oriundos principalmente de esgotos doméstico e industrial, mas com grande contribuição das atividades agrícolas, incluindo os fertilizantes e defensivos agrícolas, além da erosão de solos férteis (NEWCOMBE et al., 2012; VERA et al., 2010 e 2012). Em águas eutrofizadas, as cianobactérias apresentam vantagem competitiva, adquirindo mais rapidamente os nutrientes disponíveis (MOLICA e AZEVEDO, 2009). Dentre os problemas relacionados às florações de cianobactérias em corpos d'água pode-se citar o aumento de turbidez, a diminuição de oxigênio dissolvido, deterioração da qualidade da água (com perdas de qualidades

cênicas e produção de odores desagradáveis), e morte extensiva de peixes (HUDNELL, 2008; SMITH et al., 2008).

Com base em um extenso levantamento bibliográfico realizado acerca das cianobactérias brasileiras e no Estado de São Paulo, especificamente, Sant'Anna et al. (2012) encontraram um total de 460 espécies citadas no país, sendo que destas, 378 foram descritas no estado de São Paulo. Admitindo-se que atualmente há 4184 espécies de cianobactérias catalogadas na base de dados do Algae Base (GUIRY e GUIRY, 2015), além da diversidade de ambientes e habitats existentes nos biomas tropicais e subtropicais e da dimensão do território brasileiro, os dados existentes acerca da biodiversidade de esses organismos estão subestimados e são pouco significativos (SANT'ANNA et al., 2012). Segundo Sant'Anna e Azevedo (2000), os gêneros *Microcystis, Anabaena, Cylindrospermopsis, Oscillatoria, Planktothrix, Aphanocapsa, Nostoc* e *Nodularia* destacam-se na ocorrência de florações de cianobactérias que produzem cianotoxinas já descritas e caracterizadas no Brasil.

1.3.1 O gênero Microcystis

Pertencentes à ordem Chroococcales e família Microcystaceae, cianobactérias do gênero *Microcystis* são organismos unicelulares, comumente associados à formação de florações em ecossistemas aquáticos e amplamente distribuídos nos 5 continentes (DE FIGUEIREDO et al., 2004). Atualmente há 49 espécies pertencentes ao gênero *Microcystis* taxonomicamente aceitas no banco de dados do AlgaeBase (GUIRY e GUIRY, 2015).

È um gênero colonial, tipicamente planctônico, cujas células podem ser micro- ou macroscópicas, com morfologia esférica, hemisférica (após a divisão celular, que ocorre por fissão binária em três planos), ou irregular (Figura 10). As células encontram-se em colônias, desordenadamente dispostas no envelope mucilaginoso, esparsa ou densamente aglomeradas. O conteúdo celular é verde-azulado, acinzentado ou amarelado, com vários aerótopos. Dependendo da espécie, as dimensões das células variam de 3 a 7 μm de diâmetro (BICUDO e MENEZES, 2006; GUIRY e GUIRY, 2015).



Figura 10. Fotomicrografia da espécie *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing. Fonte: GUIRY e GUIRY, 2015.

Organismos desse gênero são conhecidos por sua habilidade de sintetizar diversos metabólitos secundários. Dentre esses metabólitos merecem destaque as microcistinas, que estão frequentemente envolvidas na intoxicação de animais e homens (SANT'ANNA et al., 2011). O primeiro relato de uma linhagem brasileira de *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistinas foi documentado por Azevedo et al. (1994). Desde então, florações de *Microcystis* spp. em diversos ambientes brasileiros têm sido frequentemente relatadas (SANT'ANNA e AZEVEDO, 2000). No Estado de São Paulo, especificamente, os reservatórios Billings e Guarapiranga são recorrentemente afetados por florações de linhagens tóxicas de *M. aeruginosa* e *M. panniformis* (SANT'ANNA e AZEVEDO, 2000; ANJOS et al., 2006; FRIAS et al., 2006; MOSCHINI-CARLOS et al., 2009; SILVA-STENICO et al., 2011).

A cepa *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08, utilizada neste estudo, foi isolada do reservatório de Salto Grande, em Americana, São Paulo. Esse reservatório, intensamente utilizado para atividades recreativas, já teve florações de linhagens tóxicas de *Microcystis* spp. documentadas por Bittencourt-Oliveira (2003).

1.3.2 O gênero Cylindrospermopsis

Pertencentes à ordem Nostocales e família Nostocaceae, cianobactérias do gênero *Cylindrospermopsis* são organismos fixadores de nitrogênio, filamentosos, que se apresentam como uma cadeia de células formando finos tricomas. Possuem, na sua estrutura, heterocitos terminais e diferenciação de células vegetativas em acinetos – esporos de resistência que se apresentam nas extremidades do tricoma e, quando presentes, são separados da célula terminal por uma a três células vegetativas (SHAFIK, 2003). A presença de heterocito e a capacidade de fixação de nitrogênio classificam *C. raciborskii* entre as cianobactérias diazotróficas.

Células da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, especificamente, possuem morfologia apical cônico-arredondada, pontiaguda ou cilíndrica, com extremidades arredondadas (Figura 11). O conteúdo celular é verde-azulado, usualmente com numerosos aerótopos (GUIRY e GUIRY, 2015). Atualmente há 12 espécies pertencentes ao gênero *Cylindrospermopsis* no banco de dados do Algae Base (GUIRY e GUIRY, 2015).



Figura 11. Fotomicrografia da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju. Fonte: GUIRY e GUIRY, 2015.

A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Figura 11) foi originalmente isolada de um lago de Java, na Indonésia, em 1912 (KOMAREK e KLING, 1991). Antes considerada de origem tropical, esta cianobactéria tem ao longo das últimas décadas aumentado sua distribuição para regiões de clima temperado (PADISÁK, 1997; WIEDNER et al., 2007) e ocorrências de florações desta espécie vem sendo citadas em diferentes partes do mundo (HAMILTON et al., 2005). Considerada invasora, a *C. raciborskii* possui uma alta capacidade de competição em relação a outras espécies e sua dominância é associada ao aumento da temperatura global (MOISANDER et al., 2012). Outros fatores que favorecem a dominância desta espécie em vários ecossistemas são: (a) habilidade de migração, permitindo a exploração de várias camadas na coluna d'água; (b) alta taxa de assimilação do amônio, possibilitando sua rápida metabolização; (c) grande afinidade e capacidade de armazenamento de fósforo; (d) resistência à predação pelo zooplâncton; (e) baixo requerimento por luz; e (f) capacidade de utilizar nitrogênio inorgânico ou de fixar nitrogênio da atmosfera (PADISÁK, 1997; BURFORD e DAVIS, 2011).

A cianotoxina mais comumente produzida pela espécie *C. raciborskii* é a cilindrospermopsina, um agente hepatotóxico (NORRIS et al., 2002; OHTANI e MOORE, 1992; RUNNEGAR et al., 2002), potente inibidor da síntese de proteínas (TERAO et al., 1994; FROSCIO et al., 2001 e 2003). Até 2014, quando Wimmer et al. (2014) isolaram e determinaram a estrutura de 2 novas variantes, identificadas como 7-deoxi-desulfo-cilindrospermopsina e 7-deoxi-desulfo-12-acetilcilindrospermopsina, apenas os análogos 7-epicilindrospermopsina (NORRIS et al., 1999) e 7-deoxi-cilindrospermopsina (BANKER et al., 2000) haviam sido descritos.

Além da cilindrospermopsina e suas variantes, algumas linhagens da espécie *C. raciborskii* são capazes de sintetizar saxitoxinas (LAGOS et al., 1999; MOLICA et al., 2002; HOFF-RISSETI et al., 2013) e outros compostos potencialmente tóxicos (FASTNER et al., 2003; SAKER et al., 2003), enquanto outras são descritas como não-produtoras de nenhum tipo de cianotoxina (HAANDE et al., 2008), um fenômeno possivelmente associado à ausência do gene *cyrJ* (MIHALI et al., 2008). Essa habilidade de síntese de determinadas cianotoxinas parece estar relacionada à localização geográfica. Com base nisso, a espécie tem sido dividida em quatro grupos: Austrália/África/Ásia, Europa, América do Sul e Nova Zelândia (WOOD et al., 2014).

A habilidade da espécie *C. raciborskii* de sobreviver em diversos ambientes parece estar associada à capacidade de modificar sua morfologia sob

diferentes temperaturas e nutrientes (SOARES et al., 2013) e produzir acinetos (PADISÁK, 1997; SAKER et al., 2003). Temperaturas de cultivo mais altas parecem promover um aumento no crescimento celular e redução do tamanho dos tricomas (SOARES et al., 2013; YAMAMOTO e SHIAH, 2014), enquanto que a produção do número de acinetos é aumentada em temperaturas mais baixas (MEHNERT et al., 2014; YAMAMOTO e SHIAH, 2014). A intensidade luminosa não parece estar envolvida com essas características (MEHNERT et al., 2014).

Rzymski et al. (2014) sugerem que a expansão desta espécie em várias regiões do mundo e sua dominância sobre outras espécies de fitoplâncton também se deve à produção de cilindrospermopsina e outros compostos extracelulares, porém com modo de ação similar, capazes de inibir o crescimento e alterar o metabolismo de outras espécies por alelopatia.

Embora Sant'Anna e Azevedo (2000) tenham indicado *Microcystis* aeruginosa como a espécie com maior distribuição no Brasil, observa-se um aumento e dominância da espécie *C. raciborskii* em diferentes regiões (BAPTISTA e NIXDORF, 2014; BOUVY et al., 1999; BRANCO e SENNA, 1994; FIGUEIREDO et al., 2014; LAGOS et al., 1999; MOLICA et al., 2002). O primeiro relato da ocorrência de uma floração tóxica de *C. raciborskii* no Brasil data de 1999, quando Lagos et al. (1999) identificaram a presença de saxitoxinas, neosaxitoxinas e goniautoxinas em linhagens isoladas de dois reservatórios no Estado de São Paulo. Desde então, todas as linhagens toxigênicas isoladas no país até o momento demonstraram capacidade de produzir saxitoxinas, uma característica exclusiva das linhagens da América do Sul (HOFF-RISSETI et al., 2013; MOLICA et al., 2002; PICCINI et al., 2011). As linhagens isoladas em vários outros países ou produzem cilindrospermopsina (hepatotoxina) ou outros compostos ainda desconhecidos, mas que têm efeitos tanto hepáticos quanto no sistema nervoso (HUDNELL, 2008).

Considerando-se a toxicidade destas linhagens e os prejuízos que florações podem causar à qualidade da água (uma vez que podem contaminar águas de abastecimento), o interesse mundial pela espécie *C. raciborskii* tem aumentado cada vez mais (HUDNELL, 2008).

1.3.3 Metabólitos secundários de cianobactérias

O metabolismo é definido como o conjunto total dos processos pelos quais os organismos adquirem e utilizam a energia que necessitam para suas várias funções, acoplando reações exergônicas (catabolismo), que promovem a oxidação de nutrientes para gerar energia, com processos endergônicos (anabolismo), nos quais moléculas complexas são biossintetizadas a partir de moléculas mais simples (VOET e VOET, 2011).

Além do metabolismo primário, responsável pela síntese substâncias necessárias para a realização das funções vitais, os organismos também apresentam o chamado metabolismo secundário. Os metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular e normalmente estão presentes em baixas concentrações. Apesar da grande variedade desses compostos descritos na literatura, o número de vias biossintéticas é restrito, uma vez que os precursores da sua síntese usualmente derivam da via do chiquimato, glicólise e ciclo de Krebs (WINK, 2010).

Na prática, a diferença entre metabólitos primários e secundários é um pouco imprecisa (SEIGLER, 1998). Enquanto alguns autores afirmam, por exemplo, que os ácidos graxos são metabólitos primários (SEIGLER, 1998; DEWICK, 2009), e classificam os metabólitos secundários em apenas 3 grandes grupos (terpenos, alcaloides e compostos fenólicos), Wink (2010) classifica os ácidos graxos como metabólitos secundários, e divide essa classe em 14 grupos, que compreende: (A) alcaloides; (B) aminoácidos não-proteicos; (C) aminas; (D) glicosídeos cianogênicos; (E) glucosinolatos; (F) alcamidas; (G) lectinas, peptídeos e polipeptídeos; (H) terpenos; (I) esteroides e saponinas; (J) flavonoides e taninos; (K) fenilpropanoides, ligninas, cumarinas e lignanas; (L) poliacetilenos, ácidos graxos e ceras; (M) policetídeos; (N) carboidratos e ácidos orgânicos.

Além das cianotoxinas, diversos outros cianopeptídeos bioativos têm sido identificados como metabólitos secundários produzidos por cianobactérias (WELKER et al., 2006; CARDOZO et al., 2007). A maioria deles são oligopeptídeos que contêm aminoácidos não usuais em sua composição (WELKER et al., 2006). A síntese destes peptídeos únicos é presumivelmente catalisada por sintetases não-ribossomais (NRPS) ou policetídeo sintase (PKS) (WELKER e VON DÖHREN, 2006). Com relação à sua atividade, a inibição de proteases parece ser uma característica comum de vários oligopeptídeos, como as anabaenopeptinas (ERHARD et al., 1999) e microgininas (OKINO et al., 1993; ISHIDA et al., 1997; ISHIDA et al., 1998; ISHIDA et al., 2000).

De acordo com sua estrutura química, os cianopeptídeos são classificados em microgininas, aeruginosinas, cianopeptolinas, microviridinas, anabaenopeptinas, entre outras. Em cada classe, o número de aminoácidos e a ordem em sua composição são altamente variáveis, sendo possível a ocorrência de diversas variantes em uma mesma classe. Segundo Welker e von Döhren (2006), mais de 600 peptídeos já haviam sido descritos até 2006, mas resultados ainda são escassos, principalmente no que concerne à investigação de linhagens brasileiras (SILVA-STENICO et al., 2011).

Embora as funções fisiológicas desses compostos não tenham sido completamente elucidadas, alguns deles possuem potencial farmacológico, com atividades antibiótica, imunossupressora, anticâncer, antiviral e anti-inflamatória (RASTOGI e SINHA, 2009), e são importantes candidatos ao desenvolvimento de medicamentos anti-hipertensivos, uma vez que inibem a enzima conversora de angiotensina (ECA) e de outras proteases (OKINO et al., 1993; NEUMANN et al., 1997).

1.3.3.1 Cianotoxinas

Uma das características mais marcantes das cianobactérias reside na sua capacidade de sintetizar metabólitos com ação tóxica a diferentes organismos (HUDNELL, 2008), podendo ser acumulados na cadeia trófica ou afetando diretamente organismos de sistemas aquáticos, como o zooplâncton e peixes, além de aves e mamíferos, inclusive seres humanos (CHRISTOFFERSEN, 1996; CHORUS e BARTRAM, 1999; CARMICHAEL, 1992). Dos aproximadamente 150 gêneros de cianobactérias descritos, cerca de 40 estão relacionados à produção de cianotoxinas (VAN APELDOORN et al., 2007).

Presentes no interior da célula, as cianotoxinas podem ser secretadas ou liberadas pela lise celular, por processos de senescência natural ou pela ação de fatores ambientais. O significado ecológico ou ecofisiológico da produção destas

toxinas, que possuem potencial aplicação como algicidas, herbicidas e inseticidas permanece desconhecido (BERRY et al., 2008; RZYMSKI et al., 2014). As primeiras suposições baseiam-se na teoria de que sua produção tem como objetivo a defesa contra herbivoria, assim como é observado com alguns metabólitos em plantas vasculares (CARMICHAEL, 1992), embora o zooplâncton negativamente afetado (FERRÃO-FILHO sempre pareça ser nem е KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011). Há também a teoria de que as cianotoxinas, como moléculas mediadoras em interações de cianobactérias com outros componentes do habitat, exercem um efeito alelopático sobre o crescimento do zooplâncton (GROVER et al., 2012) e sugere que a produção desses metabólitos está relacionada à sinalização celular, seja intra ou interespecífica, afetando o crescimento e influenciando diretamente na fisiologia e bioquímica celular dos microrganismos (KEARNS e HUNTER, 2000; RZYMSKI et al., 2014; WIESE et al., 2010). O fato de uma mesma cepa de cianobactéria ser capaz de sintetizar mais de um metabólito tóxico torna ainda mais difícil a compreensão de uma relação de causa-efeito (FERRÃO-FILHO e KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011).

Embora sua função não seja clara, sabe-se que (mas não exatamente como) a produção de toxinas está relacionada a fatores ambientais, como concentração de nutrientes, produção de clorofila-a, luminosidade, temperatura, pH e percentual de saturação de oxigênio (CAMPOS e VASCONCELOS, 2010; CARNEIRO et al., 2009; KAEBERNICK et al., 2000; ORR e JONES, 1998; SIVONEN, 1990).

Além disso, a razão pela qual florações em um mesmo corpo d'água variam na toxicidade em um curto intervalo de tempo (podendo perder totalmente sua toxicidade) não é totalmente compreendida. Acredita-se que possa ocorrer uma alteração na abundância de cepas toxigênicas e não-toxigênicas (MOLICA e AZEVEDO, 2009).

As cianotoxinas mais conhecidas são quimicamente divididas em peptídeos cíclicos, alcaloides e lipopolissacarídeos (MOLICA e AZEVEDO, 2009). Algumas fórmulas estruturais das cianotoxinas mais comumente encontradas em corpos d'água no mundo estão representadas na Figura 12.



Figura 12. Fórmulas estruturais de algumas das cianotoxinas mais comumente encontradas em corpos d'água no mundo. Fonte: adaptado de CARDOZO et al. (2007).

Quanto à toxicidade, os peptídeos cíclicos microcistinas e nodularinas são descritos como hepatotóxicos; os alcaloides anatoxina-a, anatoxina-a(s), aplisiatoxinas, cilindrospermopsinas, lingbiatoxinas e saxitoxinas, como neurotóxicos, citotóxicos ou alergênicos; e os lipopolissacarídeos (componentes da membrana celular das cianobactérias), como dermatotóxicos (HUDNELL, 2008). Os 3 principais grupos toxicológicos e alguns gêneros produtores de suas respectivas cianotoxinas estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5	. Cianotoxinas,	grupos	toxicológicos,	valores	de D	DL ₅₀ e	os	respectivos	gêneros
	produtores.								

CIANOTOXINA	GRUPO	DL ₅₀ (i.p., camundongos)	GÊNERO				
Microcistinas	Hepatotoxina	50-1.000 μg/kg*	Microcystis, Oscillatoria, Nostoc, Anabaena, Anabaenopsis				
Nodularinas	Hepatotoxina	50 µg/kg	Nodularia				
Cilindrospermopsina	Hepatotoxina	2.100 µg/kg (24 h) 200 µg/kg (5-6 dias)	Cylindrospermosis, Aphanizomenon, Umezakia				
Anatoxina-a	Neurotoxina	20-250 µg/kg	Anabaena, Oscillatoria, Aphanizomenon				
Anatoxina-a(s)	Neurotoxina	20 µg/kg	Anabaena				
Saxitoxinas	Neurotoxina	8-10 µg/kg	Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermosis, Planktothrix				
Lipopolissacarídeos	Dermatotoxina	a desconhecida	Cianobactérias em geral				
* Valores de diferentes variantes de microcistinas.							

Fonte: FERRÃO-FILHO e KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011.

Conforme pode ser observado na Tabela 5, alguns gêneros são capazes de produzir mais de um tipo de toxina. Com relação ao gênero *Cylindrospermopsis*, por exemplo, enquanto que linhagens de *C. raciborskii* isoladas de diferentes corpos d'água do mundo demonstraram capacidade de produzir cilindrospermopsina (NEILAN et al., 2003) – um alcaloide inicialmente considerado hepatotóxico, mas que atualmente já se sabe ser citotóxico (pois afeta vários órgãos além do fígado) –, as linhagens toxigênicas da espécie isoladas no Brasil são produtoras de saxitoxinas (HOFF-RISSETI et al., 2013; MOLICA et al., 2002).

Diversos casos de intoxicação de humanos e animais por cianotoxinas já foram mundialmente relatados (CHORUS e BARTRAM, 1999). No Brasil, o primeiro caso comprovado de intoxicação humana ocorreu em 1996, em Caruaru - PE, quando 116 pacientes com problemas renais crônicos, após serem submetidos a sessões de hemodiálise, apresentaram um quadro clínico de distúrbios visuais, náusea e vômito. Desses, 100 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda, levando ao óbito 76 deles. Testes realizados no filtro de carvão e no dialisador usados na clínica de hemodiálise, e no plasma e fígado dos pacientes acometidos, indicaram a presença de cianotoxinas dos grupos da microcistina e cilindrospermopsina (AZEVEDO et al., 2002; JOCHIMSEN et al., 1998).

Considerando a elevada toxicidade destas cianotoxinas, a Portaria MS 2914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, define, como limite máximo para o padrão de potabilidade para substâncias que representam risco à saúde, 1,0 µg/L de microcistinas. A Portaria exige, ainda, que as análises de cianotoxinas incluam a determinação de cilindrospermopsinas e saxitoxinas (STX), observando, respectivamente, os valores máximos permitidos de 1,0 µg/L e 3,0 µg de equivalentes STX/L.

Uma descrição mais detalhada acerca das toxinas produzidas pelas espécies deste estudo (microcistinas e saxitoxinas) é apresentada a seguir.

1.2.3.1.1 Microcistinas

Microcistinas são heptapeptídeos cíclicos que compreendem um grupo diverso, com mais de 90 congêneres estruturalmente semelhantes (PEARSON et al., 2010; BORTOLI e VOLMER, 2014). A estrutura geral das microcistinas é ciclo(-D-Ala-X-D-eritro-p-metil-Asp-Y-Adda-D-Glu-*N*-metil-dehidro-Ala), onde X e Y são dois aminoácidos variáveis (X= leucina (L), arginina (R) ou tirosina (Y); e Y= arginina (R), alanina (A) ou metionina (M). XY são combinações de heptapeptídeos definidas como LR, LA, YA, YM, YR, RR, e Adda é o ácido 3amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienoico (CARMICHAEL et al., 1988). A fórmula estrutural da microcistina LR está representada na Figura 13.



Figura 13. Fórmula estrutural da microcistina LR, com os aminoácidos variáveis leucina (L) e arginina (R).

O resíduo N-metil dehidroalanina presente na molécula foi caracterizado como um dos responsáveis pela atividade biológica dessas hepatotoxinas, potentes inibidores de proteínas fosfatases da família serina/treonina (PP1 e PP2A) em organismos eucarióticos (HARADA et al., 1990M; MACKINTOSH et al., 1990).

Conforme já demonstrado na Tabela 5, microcistinas são produzidas por espécies de vários gêneros de cianobactérias, incluindo *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc*, *Anabaena* e *Anabaenopsis*. Sua toxicidade em camundongos apresenta DL₅₀ entre 50 e 1.000 µg/kg de peso corpóreo por administração intraperitoneal (FERRÃO-FILHO e KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011) e entre 5 e 10,9 mg/kg de peso corpóreo por administração oral (CHORUS e BARTRAM, 1999).

Estas toxinas agem sobre os hepatócitos, onde chegam por meio de receptores dos ácidos biliares e promovem desorganização do citoesqueleto. Os danos às células hepáticas incluem ainda peroxidação lipídica, perda da integridade da membrana, fragmentação de DNA, apoptose, necrose e sangramento intra-hepático, podendo levar à morte por choque hemorrágico (CHORUS e BARTRAM, 1999; MACKINTOSH et al., 1990). Os sintomas causados pela intoxicação por microcistinas descritos na literatura incluem náusea, fraqueza, dermatite, pneumonia, gastroenterite e hepatoenterite (VAN APELDOORN et al., 2007).

1.2.3.1.2 Saxitoxinas

A saxitoxina (STX) e seus análogos compõem um grupo de alcaloides neurotóxicos também conhecidos como "*Paralytic Shellfish Poisons*" (PSPs), devido à ocorrência e associação destes compostos com moluscos marinhos e crustáceos, organismos nos quais essas toxinas são bioacumuladas (WIEGAND e PFLUGMACHER, 2005).

O grupo das STX, que compreende 57 variantes, possui em sua fórmula estrutural básica um esqueleto tricíclico, que difere na composição dos grupamentos laterais (WIESE et al., 2010). De acordo com sua estrutura, são classificados em: (A) carbamatos (STX, neoSTX e goniautoxinas (GTX1-4)); (B) N-sulfo-carbamoil (GTX5-6, C1-4), (C) decarbamoil (dcSTX, dcneoSTX, dcGTX1-4) e (D) desoxicarbamoil (doSTX, doneoSTX, doGTX1-4) (OSHIMA, 1995; CHORUS e BARTRAM, 1999). A fórmula estrutural e respectivas combinações dos grupamentos R_1 a R_4 que formam as variantes mais comuns estão representadas na Figura 14 e Tabela 6, respectivamente.



Figura 14. Fórmula estrutural básica das saxitoxinas, onde R₁, R₂, R₃ e R₄ são grupamentos variáveis, resultando em combinações de mais de 20 variantes dessa classe de cianotoxina.

TOXINA	R ₁	R ₂	R₃	R4
Carbamoil-				
STX	Н	Н	Н	CONH ₂
neoSTX	OH	Н	Н	CONH ₂
GTX1	OH	Н	OSO3 ⁻	CONH ₂
GTX2	Н	Н	OSO3 ⁻	CONH ₂
GTX3	Н	OSO3 ⁻	Н	CONH ₂
GTX4	OH	OSO3 ⁻	Н	CONH ₂
N-sulfocarbamoil-				
GTX5 (B1)	Н	Н	Н	CONHSO3 ⁻
GTX6 (B2)	OH	Н	Н	CONHSO3 ⁻
C1	OH	Н	OSO3 ⁻	CONHSO3 ⁻
C2	Н	Н	OSO3 ⁻	CONHSO3 ⁻
C3	Н	OSO3 ⁻	Н	CONHSO3 ⁻
C4	OH	OSO3 ⁻	Н	CONHSO3 ⁻
Decarbamoil-				
dc-STX	Н	Н	Н	OH
dc-neoSTX	OH	Н	Н	OH
dc-GTX1	OH	Н	OSO3 ⁻	OH
dc-GTX2	Н	Н	OSO3 ⁻	OH
dc-GTX3	Н	OSO3 ⁻	Н	OH
dc-GTX4	OH	OSO3 ⁻	Н	OH
Deoxidecarbamoil				
doSTX	Н	Н	Н	OH
doGTX2	OH	OSO3 ⁻	Н	OH
doGTX3	Н	OSO3 ⁻	Н	OH

 Tabela 6. Variantes de saxitoxinas e os respectivos grupamentos que compõem sua fórmula estrutural.

STXs são produzidas pelas cianobactérias de água doce pertencentes às espécies Anabaena circinalis, Aphanizomenon flos-aquae, Lyngbya wolleii e C. raciborskii, e por dinoflagelados marinhos dos gêneros Alexandrium, Gymnodinium, Pyrodinium (MEREL et al., 2010).

Com relação ao seu mecanismo de ação, STXs induzem intoxicações graves atuando como bloqueadores de canais de sódio. A inibição irreversível destes canais leva a sintomas de paralisia, como insuficiência respiratória, podendo levar à morte (RANDO e STRICHARTZ, 1986). Outro mecanismo de toxicidade de STXs é a geração de espécies reativas de oxigênio. Ramos et al. (2014) observaram que a ingestão crônica de água contaminada com STX pode

alterar as defesas antioxidantes e induzir estresse oxidativo no cérebro e fígado. A saxitoxina (STX) é considerada a mais potente dentre os alcaloides desse grupo, seguida das toxinas carmabato, decarbamoil e N-sulfo-carbamoil. Valores de DL₅₀ da STX por administração intraperitoneal e oral em camundongos são de 10 e 263 µg/kg de peso corpóreo, respectivamente (CHORUS e BARTRAM, 1999; MEREL et al., 2010).

1.3.3.2 Microgininas

As microgininas são peptídeos lineares que variam de 4 a 6 aminoácidos, usualmente com a presença de um derivativo do ácido decanoico (Adha: ácido 3-amino-2-hidróxi-decanoico) na porção amino terminal (WELKER e VON DÖHREN, 2006). Foram descritas como inibidoras da enzima conversora da angiotensina (OKINO et al., 1993; NEUMANN et al., 1997) e representam grande interesse como compostos-alvo no descobrimento de agentes anti-hipertensivos (CARNEIRO et al., 2012). Compostos bioativos de cianobactérias ainda são descritos pela sua atividade anti-inflamatória, antifúngica, antibiótica, algicida, imunossupressora e citotóxica.

Silva-Stenico et al. (2011), na avaliação da produção de agentes antimicrobianos em 12 linhagens de cianobactérias brasileiras, encontraram congêneres de cianopeptolinas, micropeptinas, anabaenopeptinas e aeruginosinas. Os autores descreveram, ainda, microgininas putativas em linhagens NPCD-1 e SPC804 de *Microcystis*, mas a confirmação estrutural destes compostos não foi realizada. No ano seguinte, duas novas moléculas de microgininas foram identificadas na linhagem brasileira *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08 (CARNEIRO et al., 2012). Neste mesmo artigo (Anexo 2), mais de 30 variantes de microgininas já descritas são relacionadas (Tabela 7).

Massa	MG	Sequência de aminoácidos*					Referência	
[M+H]	MG	1	2	3	4	5	6	
575,36	91-A	ClAhda	lle	MeLeu	Pro	-	-	Ishida et al., 2000
585,30	AL584	CIAhda	Ala	MeVal	Tyr	-	-	Gesner-Apter et al., 2008
609,32	91-B	Cl ₂ Ahda	lle	MeLeu	Pro	-	-	Ishida et al., 2000
698,38	T2	Ahda	Ala	Pro	Tyr	Tyr	-	Kodani et al., 1999
704,46	91-C	Ahda	lle	MeLeu	Pro	Tyr	-	Ishida et al., 2000
712,39	711	Ahda	Hty	Ala	Pro	Tyr	-	Welker et al., 2006
714,26	MG	Ahda	Ala	Val	MeTyr	Tyr	-	Okino et al., 1993
726,41	FR5	Ahda	Val	Pro	Tyr	Tyr	-	Welker et al., 2006
727	FR1	Ahda	Ala	MeLeu	Tyr	Tyr	-	Welker et al., 2006
728,39	FR3	Ahda	Thr	Pro	Tyr	Tyr	-	Welker et al., 2006
728,41	Cianostatina A	Ahda	Ala	Val	MeTyr	Hty	-	Sano et al., 2005
732	T1	CIAhda	Ala	Pro	Tyr	Tyr	-	Kodani et al., 1999
738,42	91-D	CIAhda	lle	MeLeu	Pro	Tyr	-	Ishida et al., 2000
740,42	FR6	MeAhda	Val	Pro	Tyr	Tyr	-	Welker et al., 2006
742,40	FR4	MeAhda	Thr	Pro	Tyr	Tyr	-	Welker et al., 2006
751,40	FR9	MeAhda	Thr	Pro	Tyr	Trp	-	Welker et al., 2006
754,43	Cianostatina B	Ahda	Melle	Pro	Tyr	Tyr	-	Sano et al., 2005
756,45	756	Ahda	Val	Leu	HTy	Tyr	-	Carneiro et al., 2012
756,45	755	Ahda	Val	MeVal	Tyr	Tyr	-	Ishida et al., 2000
758,43	757	Ahda	Thr	MeLeu	Tvr	Tvr	-	Welker et al., 2006
765,42	764	MeAhda	Thr	Pro	Tyr	Trp	-	Welker et al., 2006
768,45	767	MeAhda	Tyr	Melle	Pro	Tyr	-	Welker et al., 2006
770,46	770	MeAhda	Val	Leu	HTy	Tyr	-	Carneiro et al., 2012
770.47	478	MeAhda	Val	MeVal	Tvr	Tvr	-	Ishida et al., 2000
772.38	91-E	Cl ₂ Ahda	lle	MeLeu	Pro	Tvr	-	Ishida et al., 2000
773	99-A	ClAda	Tvr	Leu	MeTvr	Pro	-	Ishida et al., 1997
757	299-D	Cl ₂ Ahda	Val	MeVal	MeTvr	Pro	-	Ishida et al., 1997
806	99-B	Cl ₂ Ada	Tvr	Leu	MeTvr	Pro	-	Ishida et al., 1997
810.38	GH787	ClAhda	Tvr	Melle	Pro	Tvr	-	Lifshits et al., 2011
852	299-C	Ahda	Val	MeVal	MeTvr	Pro	Tvr	Ishida et al., 1997
887	299-A	ClAhda	Val	MeVal	MeTvr	Pro	Tvr	Ishida et al., 1997
917.49	51-A	Ahda	Tvr	MeVal	MeTvr	Pro	Tvr	Ishida et al., 2000
921	299-B	Cl ₂ Ahda	Val	MeVal	MeTvr	Pro	Tvr	Ishida et al., 1997
<u>93</u> 1,51	51-B	MeAhda	Tyr	MeVal	<u>Me</u> Tyr	Pro	Ťyr	Ishida et al., 2000

Tabela 7. Sequência de aminoácidos de algumas microgininas (MG) descritas na literatura.

Fonte: CARNEIRO et al., 2012.

Da mesma forma que para as cianotoxinas, desconhece-se o papel que microgininas exercem no metabolismo das cianobactérias. Segundo Neumann et al. (1997), esses compostos podem atuar como possíveis sinalizadores, uma vez que demonstraram capacidade de limitar o crescimento de *M. aeruginosa*. Como a biossíntese de metabólitos secundários como microcistinas, aeruginosinas e cianopeptolinas ocorre principalmente durante o período de luz, estes

metabólitos podem interagir com moléculas relacionadas ao metabolismo diurno (STRAUB et al., 2011).

1.4 EFEITO DE HERBICIDAS EM CIANOBACTÉRIAS

Poucos estudos se dedicaram a avaliar o efeito da presença de herbicidas e/ou seus produtos de degradação sobre a ecofisiologia de cianobactérias. A avaliação dos efeitos tóxicos de herbicidas em microalgas e cianobactérias é geralmente focada em parâmetros de crescimento (LOEC, NOEC, EC₅₀), conteúdo de pigmentos e fotossíntese (SÁENZ e DI MARZIO, 1997; WONG, 2000; TSUI e CHU, 2003).

Abou-Waly et al. (1991) avaliaram a relação concentração-resposta, através da análise do conteúdo de clorofila-a e da atividade fisiológica (consumo de ¹⁴C) da cianobactéria *Anabaena flos-aquae* e da microalga *Selenastrum capricornutum* quando expostas aos herbicidas atrazina e hexazinona. O efeito da hexazinona e diquat também foi estudado em *Microcystis*, *Pseudoanabaena, Anabaena, Oscillatoria* e *Aphanizomenon* por Peterson et al. (1994) e os autores verificaram variações significativas na sensibilidade dos organismos aos diferentes herbicidas. Em ambos os estudos, as cianobactérias mostraram-se menos sensíveis do que algas verdes à hexazinona, porém mais sensíveis ao diquat. Uma vez que, na presença de xenobióticos, cianobactérias podem ter seu crescimento favorecido, com a morte de organismos menos resistentes, estabelece-se um desequilíbrio ecológico favorecendo a floração de espécies possivelmente tóxicas.

Outros estudos de toxicidade de herbicidas a cianobactérias incluem: anilofós em *Oscillatoria simplicissima* (SINGH e SANDHU, 2010); trifluralina, 2,4-D e linuron em 10 espécies isoladas na Turquia, pertencentes aos gêneros *Synechocystis, Chroococcus, Microcystis* e *Synechococcus* (ASLIM e OZTURK, 2009); monosulfuron em *Anabaena azollae, A. flos-aquae* e *A. azotica* (SHEN e LUO, 2010); beta-ciflutrina, hidróxido de fentina, cihexatina, azociclotina e óxido de fembutatina em *Anabaena flos-aquae, Microcystis flos-aquae* e *Microcystis aeruginosa* (MA et al., 2010); etc.
Pannard et al. (2009), no estudo da resposta de fitoplâncton a baixas doses de atrazina, apoiam a hipótese de que a dominância de cianobactérias em florações de sistemas aquáticos na Europa pode ser consequência de uma combinação de enriquecimento desbalanceado de nutrientes e pressão seletiva de diferentes toxicantes. Segundo os autores, a interação entre a disponibilidade de nutrientes e exposição a poluentes é um assunto ecologicamente emergente que merece mais investigações.

Estudos acerca dos efeitos tóxicos de glifosato têm sido feitos em diferentes organismos aquáticos (TSUI e CHU, 2003; RELYEA, 2005a, b). Maule e Wright (1984), além de glifosato, testaram o efeito de outros cinco herbicidas (diuron, propanil, atrazina, clorprofan, MCPA) na população da cianobactéria *Anacystis nidulans* e da clorofícea *Chlamydomonas reinhardii*. O glifosato e o MCPA foram os que causaram menor efeito inibitório sobre o crescimento de ambos os organismos. Em experimentos com mesocosmos, Vera et al. (2010) verificaram que a quantidade de fósforo total aumentou significativamente devido a degradação de Roundup[®] por comunidades perifíticas, o que favorece processos de eutrofização e consequente dominância de cianobactérias.

Ravi e Balakumar (1998) expuseram linhagens de *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp. ao glifosato e encontraram valores de EC₅₀ de 52 µmol/L e 65 µmol/L para estas espécies, respectivamente. Análises *in vitro* demonstraram que a *A. variabilis*, embora tenha se mostrado mais sensível, possui um mecanismo adaptativo ao glifosato, clivando a ligação C-P deste composto e utilizando-o como fonte de fosfato quando este não foi fornecido através do meio de cultura.

A tolerância de cianobactérias ao glifosato também foi descrita por Forlani et al. (2008) no estudo com linhagens de *Anabaena* sp., *Arthrospira fusiformis*, *Leptolyngbya boryana*, *Microcystis aeruginosa*, *Nostoc punctiforme* e *Spirulina platensis*. Quatro delas se mostraram capazes de utilizá-lo como única fonte de fósforo. Adicionalmente, Issa (1999) avaliou a interferência do glifosato na via do chiquimato nas cianobactérias *Oscillatoria angustissima* e *Calothrix parietina* e verificou a inibição parcial da síntese do aminoácido aromático triptofano. Alguns dados acerca da toxicidade de glifosato a diferentes espécies de cianobactérias estão representados na Tabela 8.

Organismo	EC ₅₀ (mg/L)	Referência
Anabaena sp.	1490	Forlani et al. (2008)
Anabaena variabilis	8,8	Ravi e Balakumar (1998)
Arthrospira fusiformis	8,11	Forlani et al. (2008)
Arthrospira fusiformis	>169 *	Lipok et al. (2010)
Leptolyngbya boryana	3,89	Forlani et al. (2008)
Leptolyngbya boryana	246,6 *	Lipok et al. (2010)
Nostoc punctiforme	598,4 *	Lipok et al. (2010)
Nostoc sp.	11	Ravi e Balakumar (1998)
Microcystis aeruginosa	6,25	Forlani et al. (2008)
Microcystis aeruginosa	251,4 *	Lipok et al. (2010)
Microcystis aeruginosa	>120	López-Rodas et al. (2007)
Microcystis aeruginosa	~15	Saxton et al. (2011)

Tabela 8. Valores de toxicidade (EC₅₀) de glifosato a diferentes espécies de cianobactérias citados na literatura.

* Crescimento avaliado pelo teor de clorofila total.

Apesar de o estudo da presença de cianotoxinas em corpos d'água não ser tão recente, ainda tem demonstrado um amplo campo a ser explorado, com poucos relatos sobre o favorecimento de eutrofização pela presença de herbicidas em águas.

Embora a toxicidade do herbicida glifosato em alguns organismos aquáticos seja conhecida, há poucos dados na literatura que relatem a ação deste composto sobre a espécie *C. raciborskii*. Além disso, nenhum estudo aborda o efeito deste composto sobre a produção de toxinas por cianobactérias. Por esta razão, estudar a ação do glifosato sobre cianobactérias tóxicas é tema de extrema relevância e atualidade.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal verificar o efeito do glifosato sobre o crescimento e produção de metabólitos secundários (cianotoxinas e microgininas) por cepas toxigênicas de *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii.*

Como objetivos específicos, tem-se:

- determinar o crescimento e a viabilidade celular das linhagens *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302 na presença de diferentes concentrações do herbicida glifosato (produto técnico), investigando alterações associadas à permeabilidade celular e à capacidade das células desenvolveremse na presença do herbicida;

- determinar as mudanças associadas à variação da produção de clorofilaa e pigmentos acessórios em linhagens de *M. aeruginosa* e *C. raciborskii* expostas a diferentes concentrações de glifosato (produto técnico);

verificar o efeito do glifosato sobre a produção de microcistinas MC-LR e
 MC-RR e microgininas MG756 e MG770 pela cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08 e
 de goniautoxinas GTX2 e GTX3 pela cepa *C. raciborskii* CENA 302 na presença
 de diferentes concentrações do herbicida;

- avaliar o efeito de glifosato (produto técnico) na síntese de ácidos graxos das linhagens *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302;

 verificar a influência de diferentes concentrações de cinco produtos formulados contendo glifosato como ingrediente ativo sobre o crescimento das cepas *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção das culturas de cianobactérias

Neste estudo, testes foram realizados com as cepas de *Microcystis* aeruginosa LTPNA 08 e *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA 302. A linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, produtora de microcistinas MC-LR e MC-RR e microgininas MG756 e MG770, foi isolada do reservatório Salto Grande, em Americana - SP (22°45'40"S, 47°09'5"W) (CARNEIRO et al., 2012). A cepa tem sido mantida na coleção de cianobactérias do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP) desde seu isolamento, em 2007. A linhagem *C. raciborskii* CENA 302, isolada em 2008 no braço Riacho Grande da represa Billings, em São Bernardo do Campo - SP (23°46'33,9"S, 46°3'54,4"W), foi gentilmente cedida pela Professora Marli de Fátima Fiore, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA - USP). Esta linhagem foi caracterizada como produtora de saxitoxina e goniautoxinas GTX2 e GTX3 (HOFF-RISSETI et al., 2013).

Para manutenção das culturas, a linhagens LTPNA 08 e CENA 302 foram cultivadas em meio ASM-1 (GORHAN et al., 1964), pH 8,0, cuja composição está descrita na Tabela 9. As culturas foram mantidas sem aeração, à temperatura de 24 ± 2 °C, com um fotoperíodo de 14:10 h (claro/escuro) e sob baixa intensidade luminosa (20 µmol fótons.m⁻².s⁻¹). A medida de irradiância foi avaliada através de um sensor quântico (QSL-100, Box – Biospherical Intruments Inc.) imerso até o fundo de um Erlenmeyer contendo água destilada, com o mesmo volume das culturas. Subcultivos foram realizados a cada 20 dias para a linhagem LTPNA 08 e a cada 40 dias para a CENA 302.

Componentes	Concentração (µmol/L)		
NaNO ₃	2000		
MgCl ₂	200		
MgSO ₄	200		
CaCl ₂	200		
KH ₂ PO ₄	128		
Na ₂ HPO ₄	100		
H ₃ BO ₃	40		
MnCl ₂	7		
FeCl₃	4		
ZnCl ₂	2,2		
CoCl ₂	0,08		
CuCl ₂	0,014		
EDTA.Na ₂	20		

Tabela 9. Composição do meio ASM-1 utilizado na manutenção das culturas.

3.2 Efeito do glifosato sobre cianobactérias

O efeito do glifosato (produto técnico) sobre as cepas toxigênicas *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08 e *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA 302 foi avaliado em diferentes parâmetros, que incluem: crescimento celular; síntese de ácidos graxos, clorofila-a, cianotoxinas (microcistinas pela cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08 e saxitoxinas pela cepa *C. raciborskii* CENA 302), microgininas (produzidas apenas pela cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08), carotenoides; e permeabilidade celular. Um esquema ilustrativo do delineamento experimental está representado na Figura 15.



Figura 15. Delineamento experimental usado para avaliação do efeito de glifosato sobre diferentes as cianobactérias *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302.

Por fim, considerando que o glifosato é aplicado como produto formulado no meio ambiente e que testes toxicológicos são usualmente realizados com o ingrediente ativo, a toxicidade de cinco formulações comerciais, em diferentes concentrações, foi comparada com o produto técnico com relação ao seu efeito sobre o crescimento das linhagens *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302.

3.2.1 Crescimento celular

Foram testadas diferentes concentrações de glifosato para avaliar seu efeito sobre o crescimento de *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302. Uma solução estoque de glifosato produto técnico, com 98% de pureza (gentilmente cedido pela Adama Brasil, antes conhecida como Milenia Agrociências S/A), na concentração de 5 g/L, foi preparada em água ultrapura. A partir desta solução, esterilizada por filtração em membrana de PVDF 0,2 µm (Millipore), promoveu-se a adição de glifosato aos cultivos, de modo que se obtivessem diferentes concentrações finais do herbicida (de 0,1, 1, 10, 15, 20, 30 e 50 mg/L para a cepa LTPNA 08 e de 5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg/L

para a cepa CENA 302). Em Erlenmeyers de 1 L, contendo 700 mL de meio ASM-1, previamente autoclavados, adicionou-se inóculo para uma concentração final de 1 x 10^4 células/mL. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e mantidos sob aeração, à temperatura de 24 ± 2 °C, com um fotoperíodo de 14:10 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa de 40 µmol fótons.m⁻².s⁻¹ (CARNEIRO et al., 2012; HOFF-RISSETI et al., 2013). Uma cultura de mesma densidade celular, mantida sem o herbicida, foi usada como controle.

O crescimento das culturas de *M. aeruginosa* LTPNA 08 foi monitorado, a cada 2 dias, por um período de 18 dias. As células, fixadas com solução de lugol imediatamente após a amostragem, foram contadas em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, com o auxílio de microscópio óptico (Primo Star, Zeiss). A fim de diminuir a incerteza da contagem, definiu-se a contagem de células em pelo menos 16 campos, dispostos na diagonal. Apenas as células no interior destes campos e sobre as linhas superiores e da esquerda foram consideradas. Quando o número de células nestes 16 campos era inferior a 200, um número maior de campos foi contado. O resultado da contagem foi expresso em número de células/mL.

O crescimento das culturas de *C. raciborskii* CENA 302 foi monitorado, imediatamente após a amostragem, por espectrofotometria, a cada 5 dias, por um período de 60 dias. As medidas foram realizadas em quintuplicata (com homogeneização das culturas entre as medidas), em cubetas de 1,5 mL, com caminho óptico de 1 cm, a 750 nm (Espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 200).

3.2.2 Viabilidade celular

Em um estudo de toxicidade aguda, foi testado o efeito de diferentes concentrações do herbicida sobre a viabilidade celular das linhagens LTPNA 08 e CENA 302. A partir de uma solução estoque de glifosato (produto técnico) de 5 g/L, foram preparadas diluições em meio ASM-1 previamente autoclavado, nas concentrações 10, 20, 30, 60 e 100 mg/L, de modo que nos tubos usados nos testes se obtivesse concentrações finais de 5, 10, 15, 30 e 50 mg/L de glifosato, respectivamente. Nestes tubos de polipropileno de fundo redondo de 5 mL foram

pipetados 1 mL das culturas *M. aeruginosa* LTPNA 08 ou *C. raciborskii* CENA 302 (com elevada densidade celular, já na fase exponencial, com tempos de crescimento de 15 e 30 dias, respectivamente) e 1 mL das soluções de diferentes concentrações de herbicida. Após homogeneização, os tubos foram mantidos em incubadora, à temperatura de 24 \pm 2°C, com um fotoperíodo de 14 horas e sob intensidade luminosa de 35 µmol fótons.m⁻².s⁻¹ (Figura 16). Todas as condições foram testadas em triplicata.



Figura 16. Cultivos realizados para verificar a viabilidade celular das cepas *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302 expostas a diferentes concentrações de glifosato.

Após o tempo de contato, os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos e o meio ASM-1 contendo glifosato descartado. Para a cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08, o sobrenadante foi facilmente descartado apenas emborcando-se os tubos. Já para a cepa *C. raciborskii* CENA 302, mesmo após centrifugação, células viáveis permaneceram na superfície do meio, sendo necessária a remoção cuidadosa do meio com o auxílio de pipetas de Pasteur.

A viabilidade das células foi avaliada por meio da verificação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo, utilizando o corante SYTOX[®] Green (Invitrogen, USA). Este marcador possui alta afinidade ao ácido nucléico e penetra apenas nas membranas celulares danificadas, emitindo fluorescência verde quando excitado a fontes de 450-490 nm.

A cada 24 h, imediatamente antes da análise de cada tempo amostral, uma nova solução de SYTOX[®] Green 50 µmol/L foi preparada, ao abrigo da luz, pela diluição de uma solução estoque de SYTOX 5 mmol/L (preparada em dimetilsulfóxido e armazenada a -20°C), em tampão fosfato-salino (PBS) diluído em água MilliQ (1:10). A partir dessa solução intermediária de SYTOX 50 µmol/L, foi preparada uma nova diluição, na concentração de 0,2 µmol/L. 300 µL de SYTOX 0,2 µmol/L foram adicionados aos tubos contendo o pellet de células controle (sem herbicida) e células tratadas com glifosato. Para avaliar o possível efeito do SYTOX sobre as células, foram avaliadas também células sem marcação (células com e sem herbicida, ressuspendidas em 300 µL de PBS, apenas - sem SYTOX). Após a adição de SYTOX e PBS, as amostras foram vortexadas e mantidas em ambiente escuro por cerca de 5 minutos. As análises por citometria de fluxo foram realizadas com o auxílio da Mestre Renata Chaves Albuquerque, em um equipamento do tipo FACS CANTOTM II, (Becton Dickinson, USA). Além dos parâmetros granulosidade/complexidade (*Side Scatter*, SSC) e tamanho das células (*Forward Scatter*, FSC), foram monitorados 4 fluorocromos: FITC, para detecção de células marcadas com SYTOX[®] Green, e PerCP, APC e PE, para detecção da autofluorescência da clorofila, ficocianina e ficoeritrina, respectivamente, pigmentos naturalmente presentes nas células testadas. Os canais usados nas leituras estão representados na Tabela 10.

Laser / Canal	Pigmento	λ excitação	λ emissão
Azul / PerCP	Clorofila a	448	670
Azul / PE	Ficoeritrina	448	585
Azul / FITC	SYTOX [®] Green	448	530
Vermelho / AC	Ficocianina	633	660

 Tabela 10. Canais de leitura dos fluorocromos analisados e seus respectivos comprimentos de onda de excitação e emissão.

Na análise das amostras, ao delimitar os *gates* para selecionar as populações celulares e determinar a intensidade de fluorescência das células situadas nas regiões de interesse, foi possível definir a viabilidade das células de acordo com fluorescência de cada fluorocromo analisado. Intensidades de fluorescência acima de 10² foram consideradas positivas e abaixo dela negativas.

A aquisição dos dados foi realizada até completar um total de 100.000 eventos para a linhagem LTPNA 08 e 20.000 eventos para a CENA 302, utilizando o software de aquisição FACS DIVA e os resultados processados pelo software FlowJo. Os resultados estão representados por gráficos bidimensionais da intensidade de fluorescência (Figura 17), onde os quadrantes Q1 e Q2 representam células positivas para clorofila (PerCP) e ficocianina (APC), e os quadrantes Q3 e Q4 representam células lisadas, com baixa intensidade de fluorescência para estes pigmentos. No eixo x, os quadrantes Q1 e Q3 representam as células não marcadas com SYTOX e os quadrantes Q2 e Q4 representam as células marcadas com o corante, ou seja, células que tiveram sua membrana celular danificada, porém sem indução de lise quando estas apresentam-se nos quadrantes Q1 e Q2.



Figura 17. Representação de gráfico bidimensional da intensidade de fluorescência.

3.2.3 Produção de pigmentos fotossintéticos

Para avaliação do efeito do glifosato sobre a produção de pigmentos fotossintéticos foram realizadas amostragens do cultivo controle e daqueles contendo diferentes concentrações do herbicida a cada 6 dias, por um período de 18 dias para a cepa LTPNA 08 e aos 15, 40 e 60 dias para a cepa CENA 302.

Alíquotas dos cultivos foram filtradas em membranas de fibra de vidro (AP-20, 13 mm de diâmetro, Millipore) e os filtros armazenados em microtubos tipo Eppendorf âmbar e mantidos em freezer (-20 °C) para posterior análise. A extração da clorofila-a e dos carotenoides totais, realizada no escuro, foi promovida pela adição de 1,5 mL de acetona 90% sobre os filtros, seguida de agitação no vórtex. Para lise celular, as amostras foram mantidas em ultrassom em 3 ciclos de 10 minutos, com intervalos de 20 minutos, e posteriormente

centrifugadas a 10.000 rpm, 4 °C, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membranas de PVDF (0,45 μm, 13 mm de diâmetro, Millipore) para vials âmbar e analisados por HPLC-DAD (Shimadzu, Kyoto, Japão), segundo protocolo de Jodlowska e Latala (2003). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Luna[®] 5 μm C18(2) 100 Å, 250 x 3,0 mm, Phenomenex). A fase móvel consistiu dos eluentes A: acetato de amônio 0,5 mol/L:metanol (80:20) e B: acetona:metanol (20:80), com fluxo de 0,6 mL/min, com o gradiente discriminado na Tabela 11.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0,01	40	60
1	40	60
10	20	80
20	20	80
22	0	100
32	0	100
35	40	60
50	40	60

 Tabela 11. Gradiente utilizado nas análises de pigmentos fotossintéticos por HPLC-DAD.

Os pigmentos foram identificados pelo seu espectro de absorção (clorofila-a: 665 nm e carotenoides: 480 nm) e pela comparação entre os tempos de retenção com padrões analíticos. A quantificação foi feita automaticamente pela integração dos picos cromatográficos e as áreas utilizadas para cálculo da concentração através de curvas de calibração construídas com padrões analíticos de clorofila-a e astaxantina (Sigma-Aldrich). Os valores de clorofila-a foram expressos em fentograma por célula.

3.2.4 Perfil de ácidos graxos

Para avaliação do efeito do glifosato sobre a biossíntese de ácidos graxos das linhagens *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302, as cepas foram expostas a diferentes concentrações do herbicida (*M. aeruginosa* LTPNA 08: 10, 15 e 20 mg/L; e *C. raciborskii* CENA 302: 5, 10, 15, 20 e 30 mg/L). Após 18 dias de crescimento, as células de *M. aeruginosa* foram separadas por centrifugação a 7.000 rpm (centrífuga 5804R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as amostras concentradas foram liofilizadas (Liotop L101, Liobras, São Carlos, SP, Brasil). Já no caso da linhagem *C. raciborskii* CENA 302, apenas a liofilização foi empregada, aos 60 dias de crescimento, já que as células não sedimentam com a centrifugação.

Para extração dos ácidos graxos, as culturas de ambas as cepas, na fase estacionária (18 dias para *M. aeruginosa* LTPNA 08 e 60 dias para *C. raciborskii* CENA 302), foram centrifugadas. À aproximadamente 30 mg das amostras secas foram adicionados, respectivamente, 200 µL de clorofórmio contendo BHT 1 mmol/L, 1,7 mL de metanol, 30 µL de uma solução 25 µmol/L de ácido nonadecanoico (padrão interno), e 100 µL de HCI concentrado para transesterificação (obtenção de metil-ésteres). Após agitação por 1 min em vortex, as amostras foram aquecidas em banho seco a 100 °C por 15 minutos, a 600 rpm. Às amostras arrefecidas foram adicionados 1 mL de hexano e 1 mL de água MilliQ e, após agitação (1 min) em vortex, as mesmas foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 min. A fase orgânica foi transferida para um vial para análise por GC-MS.

As análises dos ácidos graxos foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo, GC-MS 5975C INERT XL EI/CI (Agilent Technologies). Os compostos foram separados em uma coluna capilar VF-23ms (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm; Agilent Technologies). A programação de temperatura do forno foi de 50 °C (mantidos por 1 minuto) a 130 °C a 20 °C/min, de 130 °C a 220 °C a 5 °C/min e 220 °C mantidos por 10 minutos, com um tempo total de corrida de 33 minutos. Hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo constante de 1 mL/min. As injeções foram realizadas no modo split, com uma razão de 1:10, e o volume de injeção foi de 1 µL. As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram mantidas em

220 e 240 °C, respectivamente. A ionização foi promovida por impacto de elétrons (EI) a 70 eV, e a varredura (*full scan*) feita na faixa de 50-450 m/z. A temperatura da fonte de íons foi mantida a 280 °C.

A identificação dos compostos foi baseada no tempo de retenção em comparação com padrão analítico comercial (37 Component FAME Mix, Supelco) e comparação do espectro de massas com espectros de referência disponíveis nas bibliotecas NIST 08 e NIST 08s. A quantificação relativa foi feita automaticamente pela integração dos picos cromatográficos obtidos.

3.2.5 Produção de microcistinas e microgininas por M. aeruginosa

Para avaliação do efeito do glifosato sobre a produção de toxinas e microgininas por *M. aeruginosa* foram realizadas amostragens dos cultivos a cada 6 dias, nos dias 6, 12 e 18. Um volume definido dos cultivos foi filtrado a vácuo, em pré-filtros de fibra de vidro (47 mm de diâmetro, Sartorius), e estes envoltos em papel alumínio e mantidos em freezer (-20 °C) até análise.

Para análise, os filtros contendo a biomassa celular foram picotados, transferidos para tubos Falcon de 15 mL e a eles adicionados 5 mL de metanol 90%. Após 3 ciclos de 20 minutos em banho de ultrassom (37 kHz), para lise celular, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C, por 7 minutos e o sobrenadante retirado. O extrato foi seco sob nitrogênio e reconstituído em 1 mL de metanol 50%. Após filtração em membranas de PVDF de 0,45 µm (Millipore), 50 µL de extrato foram injetados no sistema cromatográfico. As análises foram realizadas por HPLC-DAD (Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando-se uma coluna cromatográfica Luna C18(2) (5 µm, 250 mm x 4,6 mm; Phenomenex). A fase móvel consistiu de 2 eluentes, em que A: água e B: acetonitrila, ambos contendo 0,08% de ácido fosfórico, com fluxo de 1 mL/min. Um gradiente linear de fase móvel de 10 a 50% de acetonitrila por 40 minutos foi utilizado. Microcistinas foram quantificadas pela integração das áreas dos picos cromatográficos em 238 nm usando uma curva de calibração construída com padrões analíticos de MC-RR e MC-LR (National Research Council, Marine Analytical Chemistry Standards Program (NRC-CRM), Institute for Marine Biosciences, Halifax, Nova Scotia, Canadá).

92

Na identificação dos picos desconhecidos observados na análise de microcistinas, análises por LC-MS foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução, do tipo QTOF (MicroTOF QII, Bruker Daltonics, MA, EUA), com ionização por electrospray, no modo positivo (3500 V). A separação foi promovida em uma coluna Fusion-RP (4 mm, 150 x 2,0 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA), utilizando as fases móveis (A) água contendo 5 mmol/L de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila. Com uma vazão de 200 µL/min, o gradiente linear de eluição foi de 10 a 60% de B em 30 minutos. Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador (35 psi) e gás de secagem (5 L/min a 200 °C) e argônio como gás de colisão (35%). O equipamento foi calibrado com padrão comercial (Agilent TuneMix Low, Agilent, EUA). Uma varredura (full scan) foi realizada na faixa de m/z 100-2000 antes da escolha do íon precursor para experimentos de dissociação induzida por colisão (CID). Os espectros de massas dos íons produto foram posteriormente analisados para determinar as sequências de aminoácidos.

Devido à falta de padrões analíticos, microgininas foram quantificadas como equivalentes de MC-LR em 225 nm, usando a curva de calibração da MC-LR, monitorada neste comprimento de onda. Como os coeficientes de absorção das microcistinas e microgininas em 225 nm são diferentes, os resultados quantitativos obtidos são uma estimativa da concentração real de microcistinas. Estes resultados, no entanto, são passíveis de serem mensurados por meio de mudanças na produção de microgininas em diferentes fases do crescimento (TONK et al., 2009). Os resultados obtidos foram corrigidos pelo número de células e são apresentados em fentograma/célula.

3.2.6 Produção de saxitoxinas por C. raciborskii

Para avaliação do efeito do glifosato sobre a produção de toxinas por *C.raciborskii* foram retiradas amostras do cultivo controle e daqueles contendo diferentes concentrações do herbicida aos 15, 40 e 60 dias de cultivo. Um volume definido das culturas foi filtrado a vácuo, em pré-filtros de fibra de vidro (47 mm de diâmetro, Sartorius), e estes envoltos em papel alumínio e mantidos em freezer (-20 °C) até análise.

Para análise, os filtros contendo a biomassa celular foram picotados e transferidos para tubos Falcon de 15 mL. Aos filtros foram adicionados 3 mL de ácido acético 3 mmol/L e a lise celular promovida em probe de ultrassom, com potência de 30%, por 1 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C, por 7 minutos e 1 mL do sobrenadante retirado e filtrado em membrana de PVDF de 0,45 µm (Millipore) para vials de 2 mL. 10 µL de extrato foram injetados no sistema cromatográfico. As análises foram realizadas por HPLC-FD (Shimadzu, Kyoto, Japão), com oxidação pós-coluna, segundo o protocolo descrito por Diener et al. (2007), utilizando-se uma coluna cromatográfica SeQuant ZIC[®]-HILIC (5 µm, 250 mm x 4,6 mm; Phenomenex) e pré-coluna SeQuant ZIC[®]-HILIC (5 µm, 20 x 2,1 mm; Phenomenex). A oxidação foi realizada usando-se uma solução contendo ácido periódico 10 mmol/L e hidróxido de amônio 550 mmol/L em água, e uma solução de ácido nítrico 0,75 mol/L, para baixar o pH das amostras para 2 a 3, ambos com fluxo de 0,3 mL/min. A detecção de fluorescência foi monitorada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 330 e 395 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de 2 eluentes, em que A: formiato de amônio 10 mmol/L e ácido fórmico 10 mmol/L e B: formiato de amônio 8 mmol/L:acetonitrila (20:80), com fluxo de 1 mL/min. O gradiente de fase móvel utilizado está descrito na Tabela 12.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0,01	18	82
24	18	82
24,1	30	70
35	30	70
35,01	35	65
50	35	65
55	30	70
55,1	18	82
70	18	82

 Tabela 12. Gradiente utilizado nas análises de saxitoxinas por HPLC-FD.

As goniautoxinas 2 e 3, produzidas pela cepa de estudo (HOFF-RISSETI et al., 2013), foram quantificadas pela integração das áreas dos picos cromatográficos usando uma curva de calibração construída com padrões analíticos de GTX2 e 3 (National Research Council, Marine Analytical Chemistry Standards Program (NRC-CRM), Institute for Marine Biosciences, Halifax, Nova Scotia, Canadá).

3.3 Efeito de produtos formulados de glifosato sobre o crescimento de cianobactérias

Uma das propostas deste projeto foi determinar a ecotoxicidade de formulações comerciais do herbicida glifosato às linhagens LTPNA 08 e CENA 302. Soluções estoque de glifosato (produto técnico, 98%) e de 5 formulações comerciais foram preparadas em água ultrapura, esterilizadas por filtração em membrana de PVDF 0,2 µm (Millipore), e adicionadas aos cultivos, de modo que se obtivessem como concentrações finais de 5, 10 e 15 mg/L. Como as formulações comerciais possuem quantidades distintas do ingrediente ativo, os volumes ou massas foram calculados e soluções preparadas de modo que se obtivesse o mesmo teor de equivalente ácido de N-(fosfonometil)glicina em todas elas. Segundo a bula dos fabricantes, as formulações, identificadas pelas letras A-E, possuem a composição descrita na Tabela 13.

Tabela 13. Composição das formulações comerciais, segundo a bula dos respectivos fabricantes, usadas na avaliação da toxicidade destes produtos sobre o crescimento das cianobactérias *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302.

Produto	Ingrediente ativo	Concentração	Equivalente ácido de glifosato	Outros ingredientes
Α	Glifosato - sal de isopropilamina	480 g/L	360 g/L	67,9% (m/v)
В	Glifosato - sal de isopropilamina	480 g/L	360 g/L	52% (m/v)
С	Glifosato - sal de isopropilamina	400,8 g/L	540 g/L	60,15% (m/v)
	+ Glifosato - sal de potássio	297,8 g/L		
D	Glifosato - sal de isopropilamina	480 g/L	360 g/L	68,4% (m/v)
E	Glifosato - sal de amônio	792,5 g/kg	720 g/kg	20,75% (m/m)

Inicialmente foram testadas as concentrações de 5, 10 e 15 mg/L de glifosato para todas as formulações. Para culturas em que não foi observado crescimento na presença de 5 mg/L de equivalente ácido de glifosato, foi testada a concentração de 1 mg/L. E para aquelas onde a maior concentração (15 mg/L) não afetou o crescimento, foi avaliada a concentração de 20 mg/L.

Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 50 mL, contendo 30 mL de meio ASM-1, previamente autoclavados. Adicionou-se inóculo para uma concentração final de 5 x 10^4 células/mL. Todos os tratamentos foram mantidos à temperatura de $24 \pm 2^{\circ}$ C, com um fotoperíodo de 14:10 horas (claro/escuro) e sob intensidade luminosa de 40 µmol fótons.m⁻².s⁻¹. Seis réplicas de culturas de mesma densidade celular, mantidas sem herbicida, foram usadas como controle. Controles negativos (sem adição de inóculo) e tratamentos foram realizados em triplicata (Figura 18).



Figura 18. Imagem da manutenção dos cultivos expostos a diferentes concentrações do herbicida glifosato (produto técnico) e formulações comerciais.

O crescimento foi monitorado por espectrofotometria (750 nm, Espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 200), a cada 3 dias, por um período de 18 dias para a cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08, e a cada 6 dias, por um período de 48 dias, para a cepa *C. raciborskii* CENA 302. As medidas foram realizadas em quintuplicata (com homogeneização das amostras entre as leituras), em cubetas de 1,5 mL, com caminho óptico de 1 cm, totalizando 15 leituras para cada condição testada.

3.4 Análise estatística

Os dados estão expressos como a média ± desvio padrão (DP). Os dados para cada variável experimental foram testados quanto à normalidade e as diferenças entre os desvios padrão foram determinados utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov e o teste de Bartlett, respectivamente. Quando os dados foram classificados como não normalizados, foi realizada a análise de variância (One-way ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas e pelo teste de Dunnet para comparar os tratamentos *versus* controle. Todos os testes foram realizados com uma significância de 95% (p<0,05) utilizando o software GraphPad Prisma (v5.0).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do glifosato sobre o crescimento de cianobactérias

Na avaliação do crescimento da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, acompanhado a cada 2 dias por um período de 18 dias, pode-se verificar que, na presença de glifosato nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mg/L, não houve diferença nas taxas de crescimento, sendo este estatisticamente igual para os 4 tratamentos testados (Figura 19). Pode-se inferir, portanto, que estas concentrações são muito baixas para causar alteração, seja por inibição ou estímulo do crescimento.



Figura 19. Variação do crescimento celular de *M. aeruginosa* LTPNA 08 na condição controle, e sob diferentes concentrações de glifosato. Crescimento determinado por contagem celular em microscopia ótica. As barras de erro indicam as médias ± desvio-padrão (n=6 para controle e n=3 para os tratamentos).

Em cultivos contendo concentrações maiores do que 20 (30 e 50 mg/L), não foi verificado crescimento celular. Por esta razão, uma concentração intermediária (15 mg/L) foi avaliada.

Há diversos relatos na literatura que evidenciam efeitos deste herbicida sobre organismos aquáticos. Peterson et al. (1994), na avaliação do efeito de praguicidas, inclusive glifosato, sobre as cianobactérias *M. aeruginosa*, *Oscillatoria* sp., *Pseudoanabaena* sp., *Anabaena inaequalis* e *Aphanizomenon* *flos-aquae*, além de outros organismos aquáticos, observaram efeitos inibitórios significativos no crescimento, fotossíntese e síntese de clorofila-a dessas espécies na presença de 2,848 mg/L de glifosato (Roundup[®]). Os autores verificaram percentuais de inibição de glifosato bastante variáveis, mesmo entre cepas da mesma espécie. Enquanto a linhagem WPC7820 da espécie *M. aeruginosa* apresentou uma inibição de 16% na presença de 2,848 mg/L de glifosato, a linhagem U2063 teve seu crescimento estimulado em 41%.

Forlani et al. (2008), na avaliação do efeito do glifosato sobre o crescimento de seis cepas de cianobactérias (M. aeruginosa, Anabaena sp., Arthrospira fusiformis, Leptolyngbya boryana, Nostoc punctiforme e Spirulina platensis), testaram concentrações crescentes de glifosato (na faixa de 10 µmol/L a 10 mmol/L, ou seja, 1,69 mg/L a 1,69 g/L, respectivamente), adicionadas ao meio de cultura e avaliadas através do aumento de biomassa durante 21 dias de incubação. Todas as cianobactérias demonstraram notável tolerância ao herbicida em concentrações superiores à ordem de µmol/L (mg/L) e duas delas mostraram-se resistentes ao glifosato. Quatro cepas foram capazes de utilizar o fosfonato como única fonte de fósforo, contudo, evidências experimentais de metabolização de glifosato também foram observadas em cepas aparentemente incapazes de usar o fosfonato. Ainda que algumas cepas possuam a habilidade de metabolizar o fosfonato, esta capacidade parece estar limitada à baixa permeabilidade celular ao glifosato e este é rapidamente reprimido quando fosfato inorgânico está disponível (TERNAN et al., 1998; FORLANI et al., 2008). Já Saxton et al. (2011), verificaram uma redução na abundância de Microcystis spp. em detrimento da cianobactéria Planktothrix, que se tornou dominante, em uma concentração de apenas 1 µmol/L (0,169 mg/L) de glifosato.

López-Rodas et al. (2007) avaliaram a adaptação da espécie *M. aeruginosa* ao herbicida glifosato (120 mg/L) e demonstraram a existência de uma rápida evolução em populações desta espécie, como resultados de mutações pré-seletivas de células sensíveis à resistentes. Os autores concluíram que, em um cenário de mudanças globais causadas pela atividade antrópica (essencialmente pela inserção de biocidas nos ecossistemas), células resistentes podem se desenvolver em ambientes contaminados com glifosato.

100

Embora não tenham encontrado evidências de degradação do glifosato, Balakumar e Ravi (2001) isolaram e identificaram duas cepas das espécies *Westiellopsis* sp. e *Nostoc* sp. que, em condição de privação de fosfato, foram capazes de detoxificar glifosato pela quebra da ligação C-P (por ação de C-P liases), que é altamente estável e resistente à hidrólise química, decomposição térmica e fotólise.

Ainda com relação à espécie *M. aeruginosa*, Lürling e Roessink (2006) avaliaram o efeito do herbicida metribuzin na concentração de 100 µg/L sobre o crescimento competitivo entre esta cianobactéria e a alga verde *Scenedesmus obliquus* e demonstraram que na ausência do herbicida a alga foi competitivamente superior, ocorrendo uma completa inversão no crescimento quando metribuzin foi fornecido aos organismos, tornando-se a *M. aeruginosa* a espécie dominante. Com base nesses resultados os autores concluem que herbicidas inibidores da fotossíntese não apenas afetam comunidades algais, como também provêm a possibilidade de dominância às cianobactérias, desenvolvendo um importante papel na promoção de florações destes organismos. As espécies *M. aeruginosa* e *M. flos-aquae* (assim como a *Anabaena flos-aquae*) também tiveram sua sensibilidade testada na presença de herbicidas (diclofop, triclopir, ametrina, simazina, prometrina, cianazina e simetrina) por Ma et al. (2010). Os autores afirmam que a sensibilidade entre diferentes cianobactérias pode variar em até uma ordem de magnitude.

Vera et al. (2010), na investigação dos efeitos do glifosato (8 mg/L do princípio ativo da formulação comercial Roundup[®]) sobre perifíton em mesocosmos, verificaram um aumento na concentração de fósforo total, devido à degradação de Roundup[®], o que favoreceu a eutrofização do ambiente. Apesar de ter sido observada a mortalidade de algas (principalmente diatomáceas), o crescimento de cianobactérias foi favorecido. Estes efeitos corroboram os resultados encontrados por Perez et al. (2007), que também demonstram que o glifosato afeta a composição das comunidades de fitoplâncton e perifíton, estimulando o desenvolvimento de cianobactérias em mesocosmos em até 40 vezes.

Já com relação à linhagem *C. raciborskii* CENA 302, o crescimento foi acompanhado a cada 5 dias por um período de 60 dias (Figura 20). Pôde-se verificar que as concentrações de de glifosato de 5, 10 e 15 mg/L foram

estatisticamente iguais (p>0,05) na maior parte dos tempos amostrados, porém chegando a se mostrar maiores entre 35 e 45 dias. Ou seja, a presença destas concentrações parece ter estimulado o crescimento da cepa. Na presença de 20 mg/L de glifosato, no entanto, o crescimento foi reduzido em relação ao controle até o 30º dia, quando a cepa parece ter se adaptado ao meio, assumindo o mesmo perfil de crescimento que a cultura sem o herbicida. Concentrações maiores (30 e 50 mg/L) impediram totalmente o crescimento da linhagem no período analisado.



Figura 20. Variação do crescimento celular de *C. raciborskii* CENA 302 na condição controle, e sob diferentes concentrações de glifosato. Crescimento determinado por contagem celular em microscopia ótica. As barras de erro indicam as médias ± desvio-padrão (n=6 para controle e n=3 para os tratamentos).

Com base na comparação do efeito das concentrações avaliadas em ambas linhagens, pode-se perceber que a espécie *C. raciborskii* mostrou mais tolerante ao herbicida do que espécie *M. aeruginosa* LTPNA 08.

Conforme já descrito na literatura, enquanto que a espécie *M. aeruginosa* é capaz de utilizar glifosato (QIU et al., 2013), segundo BAI et al. (2014), a espécie *C. raciborskii* apresenta baixas taxas de crescimento na presença deste herbicida, sugerindo que não é capaz de utilizá-lo como fonte de fósforo. O metabolismo de ésteres de fosfato na cepa *C. raciborskii* é codificado pelo gene *phoA*, indicando que este gene é capaz de catalisar a hidrólise desses ésteres a

fósforo inorgânico, que é responsável pelo crescimento dessa espécie (STUCKEN et al., 2014).

A resposta de cianobactérias ao glifosato tem demonstrado variar desde organismos altamente suscetíveis a organismos altamente resistentes. Lipok et al. (2007) atribuem a tolerância da cianobactéria *Spirulina platensis (Arthrospira)* à expressão de rotas de degradação de glifosato, já que o organismo possui a enzima EPSPS. Segundo López-Rodas et al. (2007), organismos podem sobreviver em ambientes quimicamente contaminados através da adaptação fisiológica (aclimatação), normalmente resultante de modificações da expressão gênica; e através da adaptação pela seleção natural se mutações fornecerem a variabilidade genética apropriada.

Embora as concentrações testadas (na ordem de mg/L) não sejam frequentemente encontradas em corpos d'água, e dada a elevada tolerância de ambas as linhagens testadas observada, pode-se inferir que estas cianobactérias podem se tornar dominantes em ambientes impactados com o herbicida, já que outros organismos aquáticos (como microalgas e zooplâncton) são mais sensíveis ao glifosato (RELYEA, 2009), conforme já observado por Powell et al. (1991), Perez et al. (2007), Lipok et al. (2010) e Vera et al. (2010 e 2012).

4.2 Efeito do glifosato sobre a viabilidade celular de cianobactérias

A avaliação da integridade da membrana celular pode ser considerada um indicador de funcionamento da célula, uma vez que se presume que as células com membranas intactas sejam capazes de reproduzir e realizar atividades metabólicas, a menos que o DNA esteja danificado. Segundo Mikula et al. (2012), células com membrana danificada têm suas estruturas internas livremente expostas ao meio e podem ser classificadas como mortas.

Na presença do reagente SYTOX[®] Green, é possível verificar a viabilidade celular através da avaliação da integridade da membrana celular, baseada na permeabilidade do corante à membrana. Este marcador possui alta afinidade ao ácido nucléico, penetrando seletivamente apenas em membranas celulares danificadas (MACHADO e SOARES, 2012). Esse corante tem sido

bastante utilizado em estudos com cianobactérias e outros grupos do fitoplâncton.

No estudo da viabilidade celular das cepas *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302 por citometria de fluxo, foi possível avaliar a permeabilidade e resistência das células após exposição a concentrações de glifosato de 5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg/L, por 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h, pelo emprego do marcador SYTOX[®] Green.

A autofluorescência das células foi verificada nos canais de leitura de FITC, PerCP, APC e PE, que correspondem às leituras de SYTOX[®] Green, clorofila, ficocianina e ficoeritrina, respectivamente. Os histogramas e os respectivos valores de mediana de intensidade da fluorescência (MIF) de cada um dos quatro canais estão representados na Figura 21.



Figura 21. Representação da autofluorescência das células de (1) *M. aeruginosa* LTPNA 08 e (2) *C. raciborskii* CENA 302 (sem SYTOX). Os histogramas representam a intensidade da fluorescência dos diferentes pigmentos com seus respectivos valores de mediana, avaliados nos canais de leitura de (A) FITC; (B) PerCP; (C) APC; e (D) PE, que correspondem às leituras de SYTOX[®] Green, clorofila, ficocianina e ficoeritrina, respectivamente.

Pela análise dos histogramas 1A e 2A (Figura 21) pode-se observar que não foi detectada nenhuma fluorescência no canal de FITC (já que o marcador SYTOX não havia sido adicionado). Nos histogramas B e C foi possível verificar

MIFs intensas de clorofila (PerCP) e ficocianina (APC), pigmentos naturalmente presentes em ambas as linhagens. A ficoeritrina (PE), representada nos histogramas 1E e 2E, contudo, apresentou uma MIF desprezível.

Como controles, foram avaliadas também células sem marcação (células com e sem herbicida, ressuspendidas em 300 µL de PBS, apenas), e células não expostas ao glifosato, porém marcadas com SYTOX. Estas últimas, dão informação sobre a morte basal das células sem o herbicida. Valores de morte basal das células variaram de aproximadamente 5% (nos menores tempos analisados) a 25% (em 96 e 120 h). Este aumento nos maiores tempos possivelmente se deve à manutenção das células em um sistema fechado (para que permanecessem sob condições assépticas), em que trocas gasosas com o ambiente externo não eram possíveis. A ausência de agitação dos tubos também pode ter sido um fator determinante na falta de aeração dos cultivos. Porém, como trata-se de um estudo relativo, em que as diferentes concentrações do herbicida foram comparadas com a condição controle, esta variação não compromete a validade dos resultados.

Considerando que o perfil de ambas as linhagens em todos os tempos amostrados para as concentrações de glifosato de 5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg/L mostrou-se extremamente semelhante, sem efeito na permeabilidade celular mesmo na concentração mais alta (p>0,05), gráficos representativos das condições controle e um representante de cada concentração foram construídos para as linhagens *M. aeruginosa* LTPNA 08 (Figura 22) e *C. raciborskii* CENA 302 (Figura 23).



Figura 22. Gráficos do tipo *countour plot* representando (A) o percentual de morte basal das células de *M. aeruginosa* LTPNA 08 sem marcação e (B) com marcação pelo corante SYTOX[®] Green, e (C-F) percentual de clorofila, com marcação, após um período de exposição de 120 h, às concentrações de 5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg/L, respectivamente.



Figura 23. Gráficos do tipo *countour plot* representando (A) o percentual de morte basal das células de *C. raciborskii* CENA 302 sem marcação e (B) com marcação pelo corante SYTOX[®] Green, e (C-F) percentual de clorofila, com marcação, após um período de exposição de 96 h, às concentrações de 5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg/L, respectivamente.

O percentual de clorofila, avaliado pela soma dos valores de Q1 e Q2, foram próximos a 100% em todos os tempos amostrados para ambas as linhagens (dados não demonstrados), evidenciando que este pigmento fotossintético não foi liberado para o meio em nenhuma das concentrações de glifosato ensaiadas.

A partir da soma dos valores obtidos em Q2 e Q3, pôde-se calcular o percentual de células que tiveram sua permeabilidade comprometida em cada uma das concentrações de glifosato testadas. Estes valores foram plotados em gráficos em função dos diferentes tempos analisados e estão representados nas Figura 24 (*M. aeruginosa* LTPNA 08) e Figura 25 (*C. raciborskii* CENA 302).



Figura 24. Percentuais de permeabilidade celular da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, avaliados por citometria de fluxo, após exposição a 5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg/L de glifosato por 24, 48, 72, 96 e 120 h.



Figura 25. Percentuais de permeabilidade celular da linhagem *C. raciborskii* CENA 302, avaliados por citometria de fluxo, após exposição a 5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg/L de glifosato por 24, 48, 72, 96 e 120 h.

Como não foi observado efeito entre as concentrações testadas (somente entre os tempos), ensaios com concentrações ainda mais altas (100, 250, 500 e 1000 mg/L) foram conduzidos, com um período de exposição de 24 e 48 h.

A aparente ausência de efeito da concentração de 100 mg/L em ambas as linhagens foi visualmente perceptível já nas características das células nos tubos, uma vez que estas permaneceram com coloração verde, da mesma forma que a condição controle (Figura 26). A partir de 250 mg/L a coloração das células tornou-se levemente amarronzada, ficando ainda mais escura em 500 e 1000 mg/L. No caso da CENA 302, especificamente, que não decanta nem por meio de centrifugação, as células nas 3 concentrações mais elevadas deixaram de flutuar, sedimentando no fundo do tubo.



Figura 26. Imagem dos tubos contendo as células de (A) *M. aeruginosa* LTPNA 08 e (B) *C. raciborskii* CENA 302 para avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo em concentrações de glifosato de 100, 250, 500 e 1000 mg/L após exposição por 48 h. Os quadros em vermelho evidenciam onde as células estão concentradas, mesmo sem centrigugação.

Os gráficos de tipo *countour plot* desses testes nas linhagens LTPNA 08 (Figura 27) e CENA 302 (Figura 28) estão representados a seguir.

111



Figura 27. Gráficos do tipo *countour plot* representando (A) o percentual de morte basal das células de *M. aeruginosa* LTPNA 08 sem marcação; (B) com marcação pelo corante SYTOX[®] Green; e (C-F) percentual de clorofila, com marcação, após um período de exposição de 48 h, às concentrações de 100, 250, 500 e 1000 mg/L, respectivamente.



Figura 28. Gráficos do tipo *countour plot* representando (A) o percentual de morte basal das células de *C. raciborskii* CENA 302 sem marcação; (B) com marcação pelo corante SYTOX[®] Green; e (C-F) percentual de clorofila, com marcação, após um período de exposição de 48 h, às concentrações de 100, 250, 500 e 1000 mg/L, respectivamente.

Conforme pode ser observado nos gráficos de ambas as cepas, somente a partir de 250 mg/L de glifosato ocorre o deslocamento total da população das células de *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302 do quadrante Q1 (células intactas) para o quadrante Q2, onde se concentram as células marcadas com o SYTOX. Na presença de 100 mg/L, enquanto que a cepa LTPNA 08 parece não sofrer influência do herbicida, a cepa CENA 302 tem sua população dividida em células marcadas e não marcadas.

A partir dos valores de porcentagens de permeabilidade celular, foram construídos os gráficos representados na Figura 29.



Figura 29. Percentuais de permeabilidade celular das linhagens (A) *M. aeruginosa* LTPNA 08 e (B) *C. raciborskii* CENA 302, avaliados por citometria de fluxo, após exposição a 100, 250, 500 e 1000 mg/L de glifosato por 24 e 48 h. Os asteriscos representam valores de p<0,05.

Pela análise da Figura 29 fica evidente que a concentração de glifosato de 100 mg/L não foi capaz de causar danos às células de *M. aeruginosa* LTPNA 08, já que o percentual de célular marcadas foi o mesmo da condição sem o
herbicida. Essa concentração foi capaz de causar danos a aproximadamente 30% das células de *C. raciborskii* CENA 302 após 24 h de exposição. Ainda com relação à LTPNA 08 (Figura 29 A), na presença de 250 mg/L de glifosato, aproximadamente 30% das células sofreram efeito sob ação do herbicida nas primeiras 24 h, sendo esse percentual aumentado para 100% após 48 h de exposição. No caso da CENA 302 (Figura 29 B), nenhuma das concentrações chegou a provocar danos a 100% das células nas primeiras 24 h (embora o percentual fosse próximo a 95% em 250, 500 e 1000 mg/L).

A lise das células, evidenciada pela ausência de corante no interior das mesmas, e consequente migração da concentração celular do quadrante Q2 para o quadrante Q3 nos gráficos *countour plot*, assim como a redução da autofluorescência de clorofila (PerCP) e ficocianina (APC), não foram observadas em nenhuma das concentrações de glifosato ensaiadas. Essa ausência de efeito sobre a eficiência de lise do glifosato sobre as células pode ser justificada pelo caráter zwitteriônico da molécula, que dificulta sua difusão através das membranas lipídicas das células. E é para possibilitar que o glifosato permeie as membranas das células que surfactantes são adicionados aos produtos formulados.

Embora o uso da citometria de fluxo em estudos de ciências aquáticas tenha se intensificado nos últimos anos (BECKER et al., 2002), não foram encontrados trabalhos na literatura acerca da viabilidade celular de cianobactérias expostas ao glifosato usando essa ferramenta.

A citometria de fluxo, que possui a vantagem de ser uma técnica extremamente rápida, sendo capaz de analisar centenas de milhares de células em poucos segundos (VAN DIJK et al., 2010), permite a obtenção de informações quali- e quantitativas sobre a composição fitoplanctônica de amostras de água ambientais, especialmente nos estudos de monitoramento de florações de microalgas e cianobactérias (GAN et al., 2010; VAN DER MERWE et al., 2014). Em substituição ao monitoramento por medidas de biomassa algal total (avaliando-se a clorofila-a), comumente usadas em estudos de florações, KONG et al. (2014) descrevem a vantagem do uso de um sensor de fluorescência de ficocianina (um pigmento específico de cianobactérias), no monitoramento de *M. aeruginosa* e *C. raciborskii* em um reservatório em Macau, China. Pelo emprego desse sensor, associado a leituras de clorofila-a, é possível

saber qual a proporção entre os organismos e demais microalgas que compõem a floração.

A viabilidade das células e a integridade da membrana da espécie *M. aeruginosa*, exposta a diferentes formas de estresse, foram avaliadas por citometria de fluxo por alguns autores (FAN et al., 2014; GAN et al., 2010; LOU et al., 2013).

Hadjoudja et al. (2009) avaliaram, por citometria de fluxo, o efeito do algicida sulfato de cobre à espécie *M. aeruginosa* e observaram que o aumento das concentrações de cobre induz uma diminuição na taxa de divisão celular e da autofluorescência, com diferenças na sensibilidade de acordo com o tempo de exposição ao cobre (24 ou 48 h). Recentemente, Su et al. (2014) também usaram a citometria de fluxo para testar o efeito algicida da palha de arroz sobre a espécie *M. aeruginosa*.

Chang et al. (2011b), na avaliação do efeito de β -cyclocitral sobre a integridade da membrana celular de *M. aeruginosa* exposta a diferentes concentrações deste composto, observaram que concentrações crescentes de β -cyclocitral (de 5 a 1000 mg/L) induzem o deslocamento da população de células do quadrante Q1 para o Q2, e por fim para o Q3 e Q4. Este deslocamento de Q3 para Q4 não foi observado no presente estudo.

4.3 Efeito do glifosato no perfil de ácidos graxos de cianobactérias

Para avaliação do perfil de ácidos graxos, foi inicialmente padronizada a metodologia de análise destes compostos por GC-MS. Neste sentido, corridas cromatográficas foram realizadas com diferentes rampas de temperatura e tempos de aquisição. A condição escolhida, com tempo de corrida e resolução cromatográfica satisfatórios (cujos parâmetros estão descritos no item 3.2.4), apresentou o cromatograma representado na Figura 30.



Figura 30. Cromatograma representativo do padrão analítico FAME Mix (Supelco), obtido por GC-MS, em coluna VF-23ms (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm), no modo *full scan*, na faixa de 50-450 m/z.

Os compostos contidos neste padrão de metil-ésteres de ácidos graxos e seus respectivos tempos de retenção estão representados na Tabela 14.

N° pico	t _r (min)	FAME	Nome do composto
1	5,402	C4:0	Metil butanoato (Metil butirato)
2	6,807	C6:0	Metil hexanoato (Metil caproato)
3	8,318	C8:0	Metil octanoato (Metil caprilato)
4	10,061	C10:0	Metil decanoato (Metil caprato)
5	11,062	C11:0	Metil undecanoato
6	12,159	C12:0	Metil dodecanoato (Metil laureato)
7	13,333	C13:0	Metil tridecanoato
8	14,568	C14:0	Metil tetradecanoato (Metil miristato)
9	15,352	C14:1	Metil cis-9-tetradecenoato (Metil miristoleato)
10	15,831	C15:0	Metil pentadecanoato
11	16,641	C15:1	Metil cis-10-pentadecenoato
12	17,105	C16:0	Metil hexadecanoato (Metil palmitato)
13	17,764	C16:1	Metil cis-9-hexadecenoato (Metil palmitoleato)
14	18,357	C17:0	Metil heptadecanoato (Metil margarato)
15	19,029	C17:1	Metil cis-10-heptadecenoato
16	19,593	C18:0	Metil octadecanoato (Metil estearato)
17	19,952	C18:1n9t	Metil trans-9-octadecenoato (Metil elaidato)
18	20,162	C18:1n9c	Metil cis-9-octadecenoato (Metil oleato)
19	20,569	C18:2n6c	Metil cis-9,12-octadecadienoato (Metil linoleato)
20	21,055	C18:2n6t	Metil trans-9,12-octadecadienoato (Metil linolelaidato)
21	21,666	C18:3n6	Metil cis-6,9,12-octadecatrienoato (Metil γ-linolenato)
22	21,949	C20:0	Metil eicosanoato (Metil araquidato)
23	22,083	C18:3n3	Metil cis-9,12,15-octadecatrienoato (Metil linolenato)
24	22,513	C20:1n9	Metil cis-11-eicosenoato
25	23,065	C21:0	Metil heneicosanoato
26	23,394	C20:2n6	Metil cis-11,14-eicosadienoato
27	24,022	C20:3n6	Metil cis-8,11,14-eicosatrienoato
28	24,207	C22:0	Metil docosanoato (Metil behenato)
29	NI	C20:3n3	Metil cis-11,14,17-eicosatrienoato
30	24,473	C20:4n6	Metil cis-5,8,11,14-eicosatetraenoato (Metil araquidonato)
31	24,847	C22:1n9	Metil cis-13-docosenoato (Metil erucato)
32	25,423	C23:0	Metil tricosanoato
33	25,694	C20:5n3	Metil cis-5,8,11,14,17-eicosapentenoato
34	25,901	C22:2n6	Metil cis-13,16-docosadienoato
35	26,780	C24:0	Metil tetracosanoato (Metil lignocerato)
36	27,628	C24:1n9	Metil cis-15-tetracosenoato (Metil nervonato)
37	29,673	C22:6n3	Metil cis-4,7,10,13,16,19-docosahexenoato

Tabela 14. Analitos contidos no padrão analítico usado na identificação dos ácidos graxos nas amostras de cianobactérias por GC-MS.

NI: não identificado

Conforme pode ser observado na Figura 30, a aquisição dos íons pelo espectrômetro de massas foi iniciada somente aos 5 minutos pois o solvente clorofórmio, contido nas amostras, é eluído da coluna antes deste tempo. É

importante que seja respeitado esse solvent delay porque uma sobrecarga de solventes pode danificar o filamento e/ou a multiplicadora de elétrons do equipamento.

O pico cujo tempo de retenção está identificado com a sigla NI não foi detectado no padrão contendo a mistura de 37 ácidos graxos. Não foi observada coeluição com picos próximos.

Uma vez otimizado o método de análise, promoveu-se a extração e derivatização dos ácidos graxos. Como o perfil de ácidos graxos das culturas foi o mesmo (tanto na condição controle quando nas culturas expostas às concentrações de glifosato ensaiadas), com uma pequena variação na intensidade dos picos, apenas um cromatograma representativo da condição controle de cada linhagem está representado na Figura 31.



Figura 31. Cromatogramas representativos do perfil de ácidos graxos das cepas M. aeruginosa LTPNA 08 (A) e C. raciborskii CENA 302 (B), na condição controle, obtidos por GC-MS, em coluna VF-23ms (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Pela integração dos picos cromatográficos obtidos, pôde-se determinar o teor dos ácidos graxos encontrados. A composição destes compostos presentes

na linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, exposta a diferentes concentrações de glifosato e na condição controle, está representada na Figura 32.



Figura 32. Teor relativo de ácidos graxos da cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08 na condição controle (sem herbicida) e na presença de 1, 10 e 15 mg/L de glifosato (produto técnico). As barras de erro indicam as médias ± desvio-padrão (n=3). Os asteriscos representam valores de p<0,05.</p>

Pela análise da Figura 32, que representa o perfil de ácidos graxos da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, pode-se observar que 8 ácidos graxos foram identificados: ácido palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9c), linoleico (C18:2n6c), gama-linolênico (C18:3n6), linolênico (C18:3n3) e estearidônico (C18:4n3). Embora o metil-éster deste último ácido graxo não estivesse contido no mix usado para definição dos tempos de retenção, a identidade deste composto foi obtida pela comparação do espectro de massas com espectros de referência disponíveis na biblioteca NIST 08.

Apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa (p>0,05) na alteração do percentual de síntese da maior parte dos ácidos graxos, na presença de 10 mg/L de herbicida ocorreu redução do teor de ácido linoleico (C18:2n6c) e aumento do teor do ácido estearidônico (C18:4n3). Em todas as condições manteve-se um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), de 42,0%, 41,6%, 44,9% e 44,6%, nas amostras controle, e contendo 1, 10 e 15 mg/L de glifosato, respectivamente. Os teores de ácidos graxos saturados (SAFAs) foram ainda maiores (52,6%, 52,6%, 51,7% e 51,8%) e de

ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) de 5,4%, 5,8%, 3,3% e 3,6% para as condições controle e 1, 10 e 15 mg/L de glifosato, respectivamente.

Segundo Guil-Guerrero et al. (2000), os lipídeos de cianobactérias são fontes dos ácidos graxos essenciais linoleico (C18:2), α-linolênico (C18:3n3), γlinolênico (C18:3n6), ácido octadecatetranoico (C18:4n3) е ácido eicosapentaenoico (C20:5n3). Pela análise da Figura 32, pode-se observar que as culturas expostas ao herbicida mostraram um perfil lipídico similar, com os ácidos C16:0 (49,5 - 50,3%), C18:2 (5,7 - 11,2%), C18:3n3 (21,1 - 25,2%) e C18:4n3 (5,8 - 10,3%) detectados em maior quantidade. Como resposta ao estresse provocado pelas concentrações crescentes do herbicida, uma pequena diminuição no teor dos ácidos oleico (C18:1n9) e linoleico (C18:2n6) e leve aumento dos ácidos y-linolênico (C18:3n6) e ácido estearidônico (C18:4n3) foram observados. Estas diferenças, no entanto, não foram estatisticamente significativas.

Na avaliação do perfil de ácidos graxos da espécie *M. aeruginosa* sob diferentes concentrações de nitrogênio, Piorreck et al. (1984) observaram uma pequena variação nos percentuais dos FAMEs. Os ácidos detectados e seus respectivos valores médios foram C14:0 (0,5%), C14:1 (0,1%), C16:0 (47,9%), C16:1 (4,2%), C18:0 (1%), C18:1 (2,3%), C18:2 (9,9%), C18:3n6 (31,6%). A análise quantitativa dos FAMEs realizada por Da Rós et al. (2012) demonstrou concentração elevada de SAFAs (50%), com os ácidos palmítico (C16:0, 24,34%) e ácido láurico (C12:0, 13,21%) como os principais componentes. Os 50% restantes foram ácidos graxos insaturados, essencialmente os ácidos C18:1 (26,88%) e C18:2 (12,53%), demonstrando que os lipídeos da cianobactéria *M. aeruginosa* NPCD-1 têm propriedades interessantes para a produção de biocombustíveis.

A composição dos ácidos graxos presentes na linhagem *C. raciborskii* CENA 302, exposta às concentrações de glifosato de 5, 10, 15 e 20 mg/L, e na condição controle, está representada na Figura 33.

120



Figura 33. Teor relativo de ácidos graxos da cepa *C. raciborskii* CENA 302 na condição controle (sem herbicida) e na presença de 1, 10 e 15 mg/L de glifosato (produto técnico). As barras de erro indicam as médias ± desvio-padrão (n=3).

De acordo com o perfil de produção de ácidos graxos pela cepa *C. raciborskii* CENA 302 (Figura 33), pode-se observar que apenas 4 ácidos graxos foram identificados nas análises dessa linhagem. Dentre eles, há apenas um saturado (ácido palmítico, C16:0), um monoinsaturado (ácido palmitoleico, C16:1), um di-insaturado (ácido linoleico, C18:2n6c) e um com três insaturações (ácido linolênico, C18:3n3). Enquanto que o teor de SAFAs para a cultura controle e culturas contendo 1, 10, 15 e 20 mg/L de glifosato foi de 38,0, 38,1, 36,7 e 37,3%, respectivamente, os teores de MUFAs e PUFAs foram de 13,8, 14,8, 16,2 e 15,7%, e 48,2, 47,1, 47,1 e 46,9%, respectivamente.

Com relação aos percentuais dos ácidos graxos, isoladamente, observouse uma tendência de redução nos teores dos ácidos palmítico e linoleico em concentrações crescentes de glifosato, com o aumento na produção dos ácidos palmitoleico e linolênico. No entanto, os valores não se mostraram estatisticamente significativos.

Na determinação dos padrões de insaturação dos lipídeos de *C. raciborskii* em células cultivadas a 35°C e 25 °C, Várkonyi et al. (2000) verificaram que uma redução na temperatura de crescimento, de 35 a 25 °C, resultou no acúmulo considerável de PUFAs. Enquanto que os teores de C18:1n9 e C18:2 (que na temperatura de 25 °C eram de 3 e 2%, respectivamente), aumentaram para 11 e 19% a 35 °C, o percentual de C18:3n3

e C18:4 foram reduzidos de 23 e 26 para apenas 9 e 2%, respectivamente, na temperatura mais alta.

Os ácidos graxos polares C14:0, C14:1, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3 foram os mais frequentemente observados em cepas de Calothrix doliolum, Westiellopsis brevissima, Anabaena Anabaena sp., sp., Cylindrospermum musicola, Nostoc spongiaeforme, Nostoc muscorum, Nostoc calcicola, Scytonema bohnerii, Anabaena oryzae, Anabaena PCC 7120 e Hapalosiphon welwitschii (SHUKLA et al., 2012). Dado que, dentre as espécies de cianobactérias estudadas, foram observados perfis quali- e quantitativos de FAMEs muito distintos para diferentes espécies pertencentes ao mesmo gênero, os autores sugerem que a presença e ausência de ácidos graxos podem ser utilizadas como um marcador quimiotaxonômico para diferenciar as cepas em gêneros e espécies.

4.4 Efeito do glifosato sobre a produção de pigmentos fotossintéticos

Análises de clorofila-a e carotenoides foram realizadas por HPLC-DAD, em uma única corrida cromatográfica, pelo monitoramento desses pigmentos em 665 e 480 nm, respectivamente. Apesar de não estar presente em cianobactérias, a astaxantina foi utilizada como padrão analítico de carotenoides. Cromatogramas representativos dos padrões analíticos usados na quantificação de clorofila-a e carotenoides estão representados na Figura 34.



Figura 34. Cromatograma representativo obtido por HPLC-DAD dos padrões analíticos (A) clorofila-a (2,5 μg/L, 665 nm) e (B) astaxantina (10 μg/L, 480 nm), usados na quantificação de clorofila-a e carotenoides, respectivamente.

As curvas de calibração usadas na análise das amostras, construídas com padrões analíticos de clorofila-a e astaxantina, apresentaram valores de R² superiores a 0,99 (Figura 35).



Figura 35. Curvas de calibração de (A) clorofila-a e (B) carotenoides construídas com padrões analíticos de clorofila-a e astaxantina, em análises realizadas por HPLC-DAD em 665 e 480 nm, respectivamente.

Para a quantificação dos carotenoides totais foram considerados todos os picos com espectro de absorção idêntico ao da astaxantina (Figura 36).



Figura 36. Espectros de absorção da clorofila-a (A) e do carotenoide astaxantina (B), usado na identificação de carotenoides na análise de pigmentos por HPLC-DAD em 480 nm.

Cromatogramas representativos das análises de clorofila-a e carotenoides nas amostras de *M. aeruginosa* LTPNA 08 são apresentados nas Figura 37 e de *C. raciborskii* CENA 302, na Figura 38.



Figura 37. Cromatograma representativo, obtido por HPLC-DAD (480 nm) para análise de carotenoides na linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, na condição controle, aos 18 dias de cultivo. Os picos numerados (não identificados) foram usados na quantificação de carotenoides totais.



Figura 38. Cromatograma representativo, obtido por HPLC-DAD (480 nm) para análise de carotenoides na linhagem *C. raciborskii* CENA 302, na condição controle, aos 48 dias de cultivo. Os picos numerados (não identificados) foram usados na quantificação de carotenoides totais.

A variação dos pigmentos fotossintéticos, avaliada a cada 6 dias, por 18 dias, na condição controle e em diferentes concentrações de glifosato durante o crescimento celular de *M. aeruginosa* LTPNA 08 está demonstrada na Figura 39. Tanto para a clorofila-a quanto para os carotenoides totais parece não haver alterações drásticas quando comparados os tratamentos controle e aqueles contendo glifosato nas concentrações de 0,1 e 1 mg/L. Na presença de 10 mg/L do herbicida, observou-se um leve aumento na produção de clorofila-a e carotenoides aos 6 dias de cultivo, permanecendo o nível de clorofila superior ao controle até os 12 dias. Quando expostas a 15 mg/L de glifosato, as culturas demonstraram uma produção bastante aumentada de ambos pigmentos fotossintéticos aos 6 dias de cultivo, caindo drasticamente nos tempos subsequentes.



Figura 39. Variação da cota celular de pigmentos fotossintéticos na cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08 nas condições controle e sob diferentes concentrações de glifosato. (A) concentração de clorofila-a por célula; (B) concentração de carotenoides totais em equivalentes de astaxantina por célula. As barras de erro indicam as médias ± desvio-padrão (n=6, para controle e n=3 para os tratamentos).

Com relação à linhagem *C. raciborskii* CENA 302, se analisada a produção de clorofila ao longo dos dias amostrados (15, 40 e 60), pode-se observar uma tendência de aumento na concentração desse pigmento fotossintético, justificado pelo maior número de células em cultivos mais velhos (Figura 40). Curvas de clorofila-a *versus* tempo são usualmente adotadas como curvas de crescimento como alternativa à quota celular, que requer contagens do número de células por microscopia, ou biomassa seca.

Quando considerado o efeito das concentrações de glifosato testadas, diferença estatística significativa (p<0,05) foi observada, em comparação aos respectivos controles, nas culturas contendo 10 e 15 mg/L de glifosato aos 40 dias de cultivo, e culturas contendo 10, 15 e 20 mg/L de glifosato aos 60 dias de cultivo. Curiosamente, todas essas concentrações foram capazes de promover estímulo na síntese de clorofila-a. Apenas na presença da concentração mais alta do herbicida (20 mg/L), a síntese de clorofila-a aos 15 e 40 dias de cultivo parece reduzida, porém é estatisticamente equivalente à condição controle. Aos 60 dias, quando a cultura parece estar adaptada ao herbicida, a concentração de clorofila-a na cultura contendo 20 mg/L de glifosato também se mostrou superior à da condição controle.



Figura 40. Concentrações de clorofila-a em culturas de *C. raciborskii* CENA 302, aos 15, 40 e 60 dias de cultivo, na condição controle e expostas a diferentes concentrações de glifosato.

Estes valores estão em consonância à curva de crescimento desta linhagem (Figura 20), onde fica evidente que as culturas expostas a 10 e 15 mg/L de glifosato apresentam crescimento igual ou superior ao controle, enquanto que na presença de 20 mg/L de herbicida o crescimento é retardado até o 35º dia, quando a cultura parece estar adaptada, crescendo de forma similar ao controle aos 40 dias e com densidade celular superior aos 60 dias de cultivo.

A normalização dos dados de clorofila-a, que pode ser feita pelo número de células (WONG et al., 2000) ou biomassa seca ou fresca (KIELAK et al., 2011), por exemplo, nem sempre é adotada (INDERJIT et al., 2010; ABDEL-ATY e EL-DIB, 2009). Conforme observado por Carneiro et al. (2013), na avaliação da influência de diferentes intensidades de luz na produção de cilindrospermopsina por duas cepas de *C. raciborskii*, diferentes formas de normalização dos dados levam a interpretações distintas sobre a toxicologia, fisiologia e ecologia de *C. raciborskii*. Os autores avaliaram os dados das análises de toxina como quota celular (ng/célula) e como proporção relativa entre a concentração de toxina e clorofila-a (cilindrospermopsina/Chl-a).

Quando a concentração de clorofila-a é normalizada pela densidade celular (medida por espectrofotometria), um padrão de síntese similar entre todos os tratamentos é observado (Figura 41).



Figura 41. Concentrações de clorofila-a em culturas de *C. raciborskii* CENA 302, aos 15, 40 e 60 dias de cultivo, na condição controle e expostas a diferentes concentrações de glifosato, normalizadas pela densidade ótica. O asterisco representa valor de p<0,05.

Pela análise da Figura 41 pode-se observar que uma concentração média de clorofila-a semelhante entre o controle e as concentrações de glifosato testadas, e entre os diferentes tempos analisados. A única condição que se mostrou estatisticamente diferente (p<0,05) do controle foi a cultura contendo 20 mg/L de glifosato que, curiosamente, mostrou-se mais elevada na presença do herbicida aos 15 dias de cultivo. Este dado é contraditório se considerado que, apesar da fotossíntese não ser o modo primário de ação do glifosato, há

evidências de que o glifosato prejudica a síntese de ácido aminolevulínico, um precursor na biossíntese de clorofila (KITCHEN et al., 1981) e atua lentamente nos processos fotossintéticos (SPRANKLE et al., 1975). Por esta razão, pode-se concluir que essa concentração de glifosato foi capaz de estimular o acúmulo de clorofila-a. Já em concentrações maiores do herbicida (30 e 50 mg/L), como não houve crescimento celular, não foi possível realizar a análise de pigmentos fotossintéticos.

Resultado semelhante foi obtido por Qiu et al. (2013), que observaram que quando fornecido em doses que não são tóxicas, o glifosato é capaz de estimular o crescimento e o acúmulo de clorofila-a. Segundo Inderjit (2010), concentrações de glifosato de 20, 40 e 80 mg/L do ingrediente ativo foram capazes de suprimir significativamente a produção de clorofila-a na cianobactéria *Anabaena fertilissima* após 96 h (os dados, porém, não foram normalizados). Na presença de 10 mg/L do herbicida, o autor não observou diferença entre o controle e tratamento.

Em contrapartida, um estímulo na síntese de clorofila-a (assim como no crescimento e fotossíntese) foi observado por Wong (2000) quando baixas concentrações de glifosato (0,02 e 0,2 mg/L) foram testadas na clorofícea *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. Assim como também observado por Kielak et al. (2011), a concentração de 2 mg/L de glifosato foi significativamente inibitória aos 3 parâmetros avaliados e na presença de 20 mg/L não foi verificado nenhum aumento no conteúdo de clorofila-a da fase lag para fase estacionária, indicando a completa inibição da síntese de clorofila-a pela *S. quadricauda* Berb 614. Na avaliação do efeito do herbicida cianazina no conteúdo de clorofila-a da fase lag para fase estacionária, termos de eleito do herbicida cianazina no conteúdo de clorofila-a da cianobactéria *Anabaena flos-aquae* e clorofícea *Scenedesmus obliquus*, AbdEl-Aty e El-Dib (2009) também verificaram que baixas concentrações do herbicida foram capazes de estimular a síntese do pigmento em ambos os organismos.

No estudo dos efeitos do glifosato sobre a cianobactéria fixadora de nitrogênio *Mastigocladus laminosus* Cohn., Kannan et al. (1999) observaram uma redução significativa nas concentrações de clorofila e ficobilina, mesmo em concentrações de 10 nM, enquanto que o conteúdo de carotenoides nas células permaneceu inalterado.

Com relação ao conteúdo de carotenoides na linhagem *C. raciborskii* CENA 302 em culturas na condição controle e expostas a diferentes concentrações de glifosato, a soma das concentrações de 2 carotenoides bastante intensos, cuja identidade não foi confirmada, está representada na Figura 42, para os diferentes tempos amostrados (15, 40 e 60 dias de cultivo).



Figura 42. Concentrações de carotenoides totais em culturas de *C. raciborskii* CENA 302, aos 15, 40 e 60 dias de cultivo, na condição controle e expostas a diferentes concentrações de glifosato. Os asteriscos representam valores de p<0,05.

O perfil de produção de carotenoides da cepa *C. raciborskii* CENA 302 mostrou-se praticamente idêntico ao observado para a síntese de clorofila-a, com um aumento na concentração desses pigmentos ao longo dos dias, e em concentrações crescentes de glifosato, com exceção da concentração mais alta do herbicida (Figura 42). Todavia, enquanto que no caso da síntese de clorofila-a, as concentrações de 10 e 15 mg/L de glifosato promoveram o estímulo na síntese deste pigmento, para os carotenoides, apenas na presença de 15 mg/L do herbicida a concentração de carotenoides foi estatisticamente diferente do controle aos 40 e 60 dias de cultivo (p<0,05). Quando comparado com a clorofila-a, no entanto, enquanto que as concentrações de carotenoides totais variaram 4 vezes (de aproximadamente 0,5 a 2,0 μ g/mL), as concentrações de clorofila-a medidas em culturas expostas e não expostas ao glifosato variaram 6 vezes (de aproximadamente 1,0 a 6,0 μ g/mL).

Quando normalizada pela densidade celular, a síntese de carotenoides totais resultou no padrão representado na Figura 43.



Figura 43. Concentrações de carotenoides totais em culturas de *C. raciborskii* CENA 302, aos 15, 40 e 60 dias de cultivo, na condição controle e expostas a diferentes concentrações de glifosato, normalizadas pela densidade ótica. O asterisco representa valor de p<0,05.

Pela normalização dos dados de carotenoides totais de culturas de *C. raciborskii* CENA 302 expostas a diferentes concentrações de glifosato, pode-se observar que somente na maior concentração do herbicida (20 mg/L) um aumento significativo na síntese desses pigmentos foi observado aos 15 dias de cultivo (p<0,05). Embora não tenham sido conduzidos testes que possam comprovar o efeito de estresse oxidativo, esse aumento pode ser justificado como resposta antioxidante dos carotenoides, na proteção das células aos danos oxidativos causados pelo glifosato. Após o período de 15 dias a cultura parece estar adaptada, com a concentração de carotenoides totais equivalente ao controle e demais tratamentos nos tempos subsequentes.

Herbicidas têm efeitos prejudiciais sobre o crescimento, pigmentos fotossintéticos, teor de proteínas e estresse oxidativo em células de cianobactérias (CEDERGREEN e STREIBIG, 2005) e seu uso pode diminuir o teor de pigmentos, destruir cloroplastos, tilacoides e fotossistema II (PSII), e até mesmo causar danos ao DNA em organismos (CHEN et al., 2012). Embora esse efeito não tenha sido observado nesse estudo, CHRISTENSEN et al. (2003) sugerem que apesar de não ser um inibidor da fotossíntese *per se*, o glifosato atua de forma similar aos herbicidas que afetam o aparato fotossintético, podendo mediar uma redução drástica e inibição do PSII, inibindo, ao mesmo tempo, a síntese de carotenoides vitais necessários para proteger o PSII.

4.5 Efeito do glifosato sobre a produção de microcistinas

Amostragens para análise de microcistinas foram realizadas a cada 6 dias, nos dias 6, 12 e 18, representando amostragens nas fases lag, exponencial e estacionária, respectivamente. Na análise destes compostos, por HPLC-DAD (λ = 238 nm), verificou-se, além dos picos de MC-RR e MC-LR, outros três picos, bastante intensos, de identidade desconhecida (Figura 44.), sendo que dois deles apresentaram o mesmo espectro de absorção.



Figura 44. Cromatograma obtido por HPLC-DAD na análise de microcistinas, apresentando dois picos de microcistinas (MC-RR e MC-RR) e outros três, marcados com asteriscos, de identidade desconhecida. O monitoramento foi realizado em 238 nm.

Desta forma, para que a identificação destes compostos fosse realizada, análises por LC-MS foram necessárias. O cromatograma obtido na análise do extrato por LC-MS de alta resolução está representado na Figura 45.



Figura 45. Cromatograma obtido por ESI-LC-MS na análise do extrato da cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08. Os picos 1 a 4 tiveram sua identidade confirmada por ESI-LC-MS/MS, sendo: 1. MC-RR, 2. MG756, 3. MG-770 e 4. MC-LR. Picos marcados com asterisco possuem identidade desconhecida.

Os espectros de MS/MS típicos das microcistinas RR (Figura 46) e LR (Figura 47) foram obtidos nas frações 1 e 4, respectivamente.



Figura 46. Espectro de MS/MS (varredura de íon produto) obtido em um equipamento do tipo Q-TOF para o íon de m/z 519,8, correspondente à MC-RR na cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08.



Figura 47. Espectro de MS/MS (varredura de íon produto) obtido em um equipamento do tipo Q-TOF para o íon de m/z 995, correspondente à MC-LR na cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08.

O pico mais abundante observado para a MC-RR (Figura 46), de m/z 519,8, refere-se ao íon [M+2H]²⁺ deste composto, que possui massa molar de 1036 Da. A dupla carga é conferida, provavelmente, pela presença de dois resíduos de arginina na molécula. Já para a MC-LR, o íon mais abundante é 995,6, que corresponde à molécula protonada (Figura 47). Em ambos os espectros, o íon produto de m/z 135 foi observado. Este íon origina-se pela a clivagem alfa da cadeia lateral do resíduo Adda e é considerada como diagnóstico da estrutura geral de microcistinas (YUAN et al., 1999).

Não foi possível determinar a identidade do composto presente na fração marcada com asterisco na Figura 45. Já as frações 2 e 3, apresentaram picos mais intensos com m/z 756 (Figura 48) e m/z 770 (Figura 49), respectivamente.

Para que fosse possível a elucidação estrutural destes compostos, o isolamento e fragmentação dos íons majoritários foram promovidos. Os espectros de MS/MS obtidos também estão representados nessas figuras.



Figura 48. Espectros de massas obtidos para o composto presente na fração 2. A. Espectro de varredura (*scan*) com o pico base m/z 756. B. Espectro de MS/MS (varredura de íon produto) do precursor de m/z 756.



Figura 49. Espectros de massas obtidos para o composto presente na fração 3. A. Espectro de varredura (*scan*) com o pico base m/z 770. B. Espectro de MS/MS (varredura de íon produto) do precursor de m/z 770.

Com base na análise dos espectros de MS/MS obtidos para os íons m/z 756 e 770 (a discussão detalhada está descrita no artigo publicado - Anexo 2), foram propostas as estruturas de dois novos congêneres de microgininas: 756 e 770 (Figura 50), com a seguinte sequência de aminoácidos: MeAhda-Val-Leu-HTY-Tyr (770) e MeAhda-Val-Leu-HTY-Tyr (756). Estes compostos ainda não haviam sido descritos na literatura.



Figura 50. Estruturas propostas para as microgininas MG756 (R = H) e MG770 (R = CH₃) de acordo com a sequência de aminoácidos.

Uma vez confirmada a identidade das microgininas MG756 e MG770, promoveu-se a quantificação das microcistinas e microgininas.

As microcistinas produzidas pela cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08 foram analisadas por HPLC-DAD aos 6, 12 e 18 dias de cultivo, e tiveram sua absorção monitorada em 238 nm. Um cromatograma representativo destas toxinas na cepa LTPNA 08 (primeiro e último pico) está representado na Figura 51.



Figura 51. Cromatograma representativo obtido por HPLC-DAD na análise de microcistinas MC-LR e MC-RR, monitoradas em 238 nm, produzidas pela cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08, aos 18 dias de crescimento. A identidade do pico marcado com asterisco é desconhecida.

A identidade dos picos de microcistinas foi confirmada pela análise dos espectros de absorção e dos tempos de retenção (comparados com padrões comerciais). Os espectros de absorção dos picos observados estão representados na Figura 52.



Figura 52. Espectros de absorção (A) das microcistinas LR e RR; (B) das microgininas MG756 e MG770; e (C) composto desconhecido obtidos na análise por HPLC-DAD da cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08, aos 18 dias de crescimento.

Microcistinas foram quantificadas pela integração das áreas dos picos cromatográficos em 238 nm usando uma curva de calibração construída com padrões analíticos de MC-RR e MC-LR (Figura 53).



Figura 53. Curvas de calibração das microcistinas RR e LR, obtidas com padrões analíticos. Análises realizadas por HPLC-DAD em 238 nm. A. MC-RR; B. MC-LR.

Por meio da análise da Figura 54, que ilustra a variação da produção de microcistinas totais (dada pela soma de MC-LR e MC-RR) nas condições controle e na presença de 0,1, 1, 10 e 15 mg/L de glifosato, aos 6 dias de cultivo, pode-se observar um estímulo na produção de toxinas das culturas expostas a 0,1 e 1 mg/L de glifosato, com inibição na presença de 15 mg/L. No tempo amostral de 12 dias, verificou-se uma produção menor de microcistinas nas culturas expostas a 1 e 10 mg/L, sendo que na presença de 15 mg/L não há diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Aos 18 dias de cultivo, com as células já na fase estacionária, todas as concentrações de glifosato avaliadas foram capazes de promover a inibição da síntese de toxinas, quando comparadas ao grupo controle.



Figura 54. Box plot da variação da cota celular de microcistinas totais (RR+LR) em *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08 na condição controle e sob diferentes concentrações de glifosato no meio. Análises feitas por HPLC-DAD. Dados não avaliados em concentrações acima de 15 mg/L de glifosato devido à morte celular a partir de 4 dias de cultivo. A linha pontilhada marca a mediana do controle no tempo zero.

Apesar de Wiedner et al. (2003) afirmarem que o conteúdo de microcistinas é bastante variável durante as diferentes fases do crescimento, amostragens da condição controle aos 6, 12 e 18 dias de cultivo apresentaram valores de toxinas bastante semelhantes nos diferentes tempos amostrais. Alterações na produção de variantes distintas de microcistinas também foram verificadas em diferentes fases do crescimento da espécie *Microcystis aeruginosa* quando mantida em cultivo em laboratório por LYCK (2004). Estas variações foram observadas apenas quando as culturas foram expostas a um xenobiótico. Segundo Repka et al. (2004), maiores valores de microcistinas são observados no meio da fase exponencial.

Diversos estudos têm avaliado o efeito de nutrientes (como nitrogênio e fósforo), luz, temperatura, pH e metais traço sobre a produção de microcistinas, e alguns sugerem que a produção é maior em condições ótimas de crescimento (BORTOLI et al., 2014; KAEBERNICK et al., 2000; LUKAC e AEGERTER, 1993; ORR e JONES, 1998; SIVONEN, 1990; TSUJI et al., 1995).

Gong et al. (2011) verificaram que a presença de elevadas concentrações de arsênio inorgânico favorece a sobrevivência da linhagem *M. aeruginosa* FACHB 905 em um lago na China, estimulando a produção de microcistina LR e

a toxicidade da célula. Os autores sugerem que proteínas de estresse em cianobactérias são induzidas e auxiliam no reparo de proteínas desnaturadas e protegem as células de danos sob condições de estresse. Os fatores que controlam o crescimento e o conteúdo de toxinas ainda são desconhecidos, mas podem estar relacionados com a regulação gênica da produção de cianotoxinas. Verificou-se que as microcistinas estavam associadas com as membranas tilacoides de *M. aeruginosa*, o que sugere uma estreita associação fisiológica entre as microcistinas e o aparato fotossintético das células (GONG et al., 2011).

Estudos observaram que as microcistinas estão associadas aos tilacoides das membranas da célula através do resíduo Adda, permitindo que o anel polar da estrutura livre no citoplasma para, via C=O das ligações peptídicas, coordenar ou quelar metais. Foi demonstrado que a MC-LR tem a habilidade de se ligar a metais como cobre, zinco e ainda por suas propriedades ionofóricas a outros elementos, como cálcio, magnésio, manganês e ferro. Esta associação das microcistinas aos tilacoides pode sugerir uma união da toxina com outros elementos diretamente regulados pela luz, como clorofila, com a função de receber e de certa forma armazenar a energia luminosa (LYCK, 2004), podendo ser, ainda, um mecanismo de resposta adaptativa (CAMPOS e VASCONCELOS, 2010). Estudos conduzidos em diferentes intensidades luminosas por WIEDNER et al. (2003) e CARNEIRO et al. (2009) observaram diferenças significativas na produção de toxinas.

Horst et al. (2014) observaram que a limitação de nitrogênio leva à uma redução substancial na produção de microcistina, quando comparado com condições em que o fósforo é limitado ou saturada de nutrientes. Os autores afirmam que esses resultados são consistentes com a estequiometria na qual a microcistina, um metabólito rico em nitrogênio, é reduzido sob limitação desse elemento.

4.6 Efeito do glifosato sobre a produção de microgininas

O efeito do glifosato sobre a produção de microgininas foi acompanhado, por HPLC-DAD, aos 6, 12 e 18 dias de cultivo. Um cromatograma representativo obtido por HPLC-DAD (225 nm) na análise das microgininas está representado na Figura 55.



Figura 55. Cromatograma representativo obtido por HPLC-DAD na análise das microgininas 756 e 770, monitoradas em 225 nm, produzidas pela cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08, aos 18 dias de cultivo. A identidade do pico marcado com asterisco é desconhecida.

Conforme dito anteriormente, devido à falta de padrões analíticos, microgininas foram quantificadas em equivalentes de MC-LR em 225 nm. A curva de calibração usada na quantificação das microgininas 756 e 770 está representada na Figura 56.



Figura 56. Curva de calibração construída para quantificação das microgininas MG756 e MG770 em equivalentes de MC-LR. Análises realizadas por HPLC-DAD com padrão analítico de MC-LR, monitorado em 225 nm.

No que concerne à produção de microgininas totais, conforme pode ser visto na Figura 57, verificou-se que concentrações na faixa de 0,1 a 10 mg/L de glifosato não afetaram a produção destes metabólitos. Na presença de 15 mg/L do herbicida, em contrapartida, houve um aumento significativo destes valores em todos os tempos amostrais avaliados.



Figura 57. Box plot da variação da cota celular de microgininas totais na cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08 na condição controle e sob diferentes concentrações de glifosato no meio. Análises feitas por HPLC-DAD. Dados não avaliados em concentrações acima de 15 mg/L de glifosato devido à morte celular a partir de 4 dias de cultivo. A linha pontilhada marca a mediana do controle no tempo zero.

Embora diversas cepas brasileiras de *Microcystis* já tenham sido investigadas com relação à produção de microcistinas, há poucos trabalhos que reportem a co-ocorrência de peptídeos bioativos. Carvalho et al. (2008) descreveram uma floração de cianobactérias em um reservatório no sul do Brasil, com *M. protocystis* e *Sphaerocavum* cf. *brasiliensis* como espécies dominantes, e confirmaram a presença de MC-RR, MC-LR, anabaenopeptina B e anabaenopeptina F. Recentemente, Silva-Stenico et al. (2011), em uma varredura de agentes antimicrobianos em cianobactérias isoladas de ambientes brasileiros, descreveram peptídeos putativos de microgininas em duas cepas de *Microcystis*. Apesar destes estudos, a avaliação de cianobactérias brasileiras como fonte de compostos naturais com potencial farmacêutico ainda é de grande

interesse, principalmente se consideradas as atividades biológicas atribuídas a oligopeptídeos.

4.7 Efeito do glifosato sobre a produção de saxitoxinas

O efeito do glifosato sobre a produção de STXs pela cepa *C. raciborskii* CENA 302 foi acompanhado aos 15, 40 e 60 dias de cultivo. Um cromatograma representativo obtido por HPLC-FD na análise das STXs está representado na Figura 58.



Figura 58. Cromatograma representativo obtido por HPLC-FD, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 330 e 395 nm, respectivamente na análise de saxitoxinas produzidas pela cepa C. raciborskii CENA 302, aos 15 dias de cultivo.

Ainda que a linhagem *C. raciborskii* CENA 302 tenha sido descrita como produtora de STX, dcSTX e GTX2 e GTX3 por Hoff-Risseti et al. (2013), apenas os epímeros GTX2 e GTX3 foram detectados nas análises de STXs dessa mesma cepa nesse estudo. Este fato pode estar associado a um menor limite de detecção do método, perda da habilidade da cepa de produzir essas toxinas, à biotransformação de STX para GTX, ou à degradação de STX e dcSTX.

Castro et al. (2004) observaram uma cinética de acumulação distinta de toxinas no interior das células quando cultivaram a linhagem *C. raciborskii* C10 (também produtora de STX, GTX2 e GTX3) em diferentes temperaturas. Os autores sugerem que o processo de liberação das STXs não está relacionado à lise celular, e que o aumento dessa toxina no meio extracelular em temperatura mais baixa (19 °C) sugere a biotransformação da STXs nos epímeros GTX2 e GTX3. Eles afirmam, ainda, que as STXs produzidas por esta cepa

permaneceram estáveis no meio após 30 dias a 25 °C e 50 dias a 19 °C. Neste trabalho, no entanto, as condições de cultivo foram as mesmas descritas por Hoff-Risseti et al. (2013).

Já Alfonso et al. (1994), também no estudo sobre a estabilidade de STXs em função da temperatura, mostraram que a STX é relativamente estável por até dois anos, tanto em solução ácida, como seca por liofilização, em temperaturas de -80 °C, -20 °C e 4 °C. Jones e Negri (1997) demonstraram que STXs persistem por até três meses em rios, águas de irrigação e por longo período em água destilada, a 25 °C. A meia-vida calculada para as toxinas, estudadas dissolvidas em água destilada foi de 21 dias para CTX1 e CTX2, 27 dias para dcGTX2 e dcGTX3, e 46 dias para GTX2 e GTX3.

Segundo Merel et al. (2010), STXs são estáveis e solúveis em água, capazes de persistir em água doce por mais de 90 dias, e estáveis em pH ácido e instáveis e facilmente oxidadas em pH alcalino (com exceção das variantes N-sulfocarbamoil).

As curvas de calibração usadas na quantificação das goniautoxinas GTX2 e 3 estão representadas na Figura 59.



Figura 59. Curvas de calibração das goniautoxinas GTX2 e GTX3, obtidas com padrões analíticos. Análises realizadas por HPLC-FD, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 330 e 395 nm, respectivamente. A. GTX2; e B. GTX3.

No que concerne à produção das GTXs, apesar da possível degradação das demais STXs, observadas por Hoff-Risseti et al. (2013), provocada pela baixa estabilidade relatada por outros autores, deve-se levar em conta que somente as variantes GTX2 e 3 foram observadas aos 15 dias de cultivo neste estudo (enquanto que Hoff-Risseti et al. (2013) analisaram a cultura em um único tempo amostral, aos 20 dias de cultivo). Tanto a GTX2 quanto a GTX3 foram continuamente produzidas ao longo do experimento, sendo quantificadas em

concentrações crescentes em todos os tempos analisados no caso da GTX2 e com um leve decréscimo produção após 60 dias de cultivo no caso da GTX3 (Figura 60).



Figura 60. Concentração de goniautoxinas GTX2 (A) e GTX3 (B), normalizada pela densidade ótica, em culturas de *C. raciborskii* CENA 302, aos 15, 40 e 60 dias de cultivo, na condição controle e exposta a diferentes concentrações de glifosato. Os asteriscos representam valores de p<0,05.

Pela análise da condição controle na Figura 60 A, pode-se observar que a concentração de GTX2 é continuamente aumentada durante o crescimento da cepa *C. raciborskii* CENA 302. Quando comparado ao controle, aos 15 dias de cultivo, nenhuma das concentrações de glifosato testadas exerceram influência sobre a produção de GTX2. Aos 40 dias foi observado aumento na produção da variante na cultura exposta à 20 mg/L de glifosato (p=0,0236), enquanto que aos 60 dias, as concentrações de GTX2 observadas em todos os tratamentos foram

menores do que na condição controle, sendo que na presença de 5, 15 e 20 mg/L, e de 10 mg/L de glifosato, os valores de p foram p<0,01 e p<0,05, respectivamente.

Com relação à produção da GTX3, enquanto que aos 15 dias de crescimento as concentrações de glifosato de 15 e 20 mg/L promoveram aumento na produção da toxina (p<0,05 e p<0,001, respectivamente), aos 40 dias de cultivo, somente na presença de 20 mg/L de glifosato foi observado aumento (p<0,001). Aos 60 dias, no entanto, nenhum dos tratamentos teve diferença na produção de GTX3 quando comparados ao controle.

Quando avaliada a produção de STXs totais (Figura 61), é possível observar que o perfil de produção de STXs é o mesmo que o observado para a GTX3, dado que esta apresenta-se em concentração mais elevada. Da mesma forma que para a GTX3, a concentração de STXs foi aumentada na presença de 15 e 20 mg/L de glifosato (p<0,05) aos 15 dias de cultivo, mantendo-se significativamente elevada aos 40 dias na cultura contendo 20 mg/L de glifosato (p<0,05). Aos 60 dias não foi observada diferença estatística entre as concentrações avaliadas.



Figura 61. Concentração de saxitoxinas totais, normalizada pela densidade ótica, em culturas de *C. raciborskii* CENA 302, aos 15, 40 e 60 dias de cultivo, na condição controle e exposta a diferentes concentrações de glifosato. Os asteriscos representam valores de p<0,05.

Apesar de inferirem que STXs e cilindrospermopsina são metabólitos constitutivos, cuja biossíntese está correlacionada ao crescimento celular e não

diretamente a fatores ambientais, Stucken et al. (2014) afirmam que ainda não se sabe como e se genes responsáveis pela síntese dessas toxinas são regulados. Ainda assim, alguns autores associaram a produção de STXs à concentração de nutrientes e temperatura, e observaram que ela ocorre em um ciclo circadiano, modulado pela luz (CARNEIRO et al., 2009; CASTRO et al., 2004; CHISLOCK et al., 2014). Segundo Neilan et al. (2013), os poucos estudos que avaliaram a regulação de STXs até hoje, por investigarem diferentes organismos e com métodos distintos, não são suficientes para afirmar que fatores ambientais exercem influência sobre a produção desses metabólitos.

Não foram encontrados dados na literatura acerca do efeito de glifosato sobre a produção de STXs.

4.8 Efeito de formulações comercias de glifosato sobre o crescimento de cianobactérias

Ensaios de inibição de crescimento com as cepas *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302 foram realizados com diferentes concentrações de glifosato técnico e cinco produtos formulados contendo esse herbicida, e o crescimento monitorado por espectrofotometria (750 nm). As curvas de crescimento das linhagens *M. aeruginosa* LTPNA 08 (Figura 62) e *C. raciborskii* CENA 302 (Figura 63) expostas aos produtos formulados e produto técnico estão representadas a seguir.



Figura 62. Variação do crescimento celular da cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08 na condição controle e exposta a glifosato (produto técnico) e a 5 formulações comerciais, identificadas pelas letras A, B, C, D e E, em diferentes concentrações. Crescimento determinado por espectrofotometria (750 nm). As barras de erro indicam as médias ± desvio-padrão (n=3).



Figura 63. Variação do crescimento celular da cepa *C. raciborskii* CENA 302 na condição controle e exposta a glifosato (produto técnico) e a 5 formulações comerciais, identificadas pelas letras A, B, C, D e E, em diferentes concentrações. Crescimento determinado por espectrofotometria (750 nm). As barras de erro indicam as médias ± desvio-padrão (n=3).

Na avaliação do efeito de diferentes formulações comerciais de glifosato sobre o crescimento da cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08, pôde-se observar respostas bastante distintas entre os produtos formulados (que teoricamente deveriam mostrar toxicidade semelhante, considerando que todos foram preparados de forma que se obtivesse o mesmo teor de equivalente ácido de glifosato).

No que concerne aos produtos formulados, 1 mg/L (equivalente ácido de glifosato) dos produtos A e D já provocaram uma redução significativa nos

crescimentos das culturas (com inibição, aos 15 dias, de 51,7 e 40,4% respectivamente). Na dose mais alta (20 mg/L), apenas a cultura exposta ao produto E não teve seu crescimento afetado. Curiosamente, até mesmo o produto técnico, livre de adjuvantes, mostrou-se mais tóxico.

Enquanto que as culturas de *M. aeruginosa* expostas à concentração de 5 mg/L de produto técnico e produto formulado E tiveram crescimento semelhante ao observado para a condição controle, as demais formulações comerciais mostraram-se bastante tóxicas, sendo os produtos A e D os que mais inibiram o crescimento celular.

Com relação à linhagem *C. raciborskii* CENA 302, pela análise da Figura 63, é possível observar um perfil de crescimento semelhante das culturas expostas aos produtos formulados A e D, os mais tóxicos, em que crescimento é observado apenas na menor concentração testada (1 mg/L de equivalente ácido de glifosato). O crescimento das culturas expostas aos produtos B e E também se mostrou similar, em que inibição é percebida na presença de 15 mg/L, e ausência de crescimento na presença de 20 mg/L de glifosato. A cultura contendo 20 mg/L de E, no entanto, começa a apresentar uma tendência de crescimento a partir do 42º dia. Culturas expostas ao produto formulado C, por sua vez, foram as que tiveram o crescimento menos comprometido entre as formulações testadas (sendo apenas menos afetadas do que as culturas expostas ao produto técnico). Em ambas, mesmo na presença de 20 mg/L de glifosato, embora retardado, foi observado crescimento.

Com base nas curvas de crescimento obtidas, considerando o crescimento da condição controle 100% (0% de inibição sobre o crescimento), pôde-se calcular os valores de CE₅₀ para ambas as linhagens para o produto técnico e produtos formulados, plotando-se o log (concentração) *versus* o percentual de inibição. Os valores de CE₅₀ estão representados na Tabela 15.
Agente tóxico	CE ₅₀ 15 dias (mg/L)	mg/L) CE ₅₀ 48 dias (mg/L)	
	M. aeruginosa LTPNA 08	C. raciborskii CENA 302	
Produto técnico	11,3	23,89	
Produto formulado A	1,0	2,08	
Produto formulado B	2,3	15,73	
Produto formulado C	3,2	ND	
Produto formulado D	1,5	2,50	
Produto formulado E	ND	ND	

 Tabela
 15. Toxicidade de glifosato (produto técnico e produtos formulados) às cianobactérias *M. aeruginosa* LTPNA 08 e *C. raciborskii* CENA 302.

ND: não definido

Os produtos C e E não puderam ter o valor de CE₅₀ definido pois não foi observada inibição em nenhuma das concentrações testadas. Pode-se assumir, portanto, que este valor é superior a 20 mg/L.

Se considerada a composição dos 5 produtos formulados a base de glifosato (Tabela 13), tem-se, teoricamente, que: $A = B = D \neq C \neq E$. No entanto, assumindo-se que, uma vez que a concentração dos produtos formulados foi corrigida, de modo que se obtivesse a mesma concentração de equivalente ácido em todas elas nos testes de toxicidade, estima-se que o efeito possa ser resultado da diferença na composição dos adjuvantes. Apenas o produto E, que se mostrou o menos tóxico de todos, não é um sal de isopropilamina (e sim um sal de amônio).

Observou-se uma resistência distinta entre as cepas e toxicidade também variável entre as formulações comerciais. Enquanto que para a cepa LTPNA 08 observou-se a seguinte ordem de toxicidade: A > D > B > C > PT > E, para a cepa CENA 302 obteve-se a ordem: A > D > B > PT > E > C.

Em estudos de ecotoxicidade de herbicidas o foco é dado especialmente ao princípio ativo, já que é dele que se espera o efeito fitotóxico. Entretanto, herbicidas são formulados pela associação de outros componentes, para que sua estabilidade e ação contra as plantas-alvo sejam aumentadas (CEDERGREEN e STREIBIG, 2005; PEREIRA et al., 2009), o que significa que problemas toxicológicos podem estar associados à presença de surfactantes nas formulações comerciais (BORGGAARD e GIMSING, 2008). Estudos têm demonstrado que aditivos e ingredientes inertes usados em produtos formulados, normalmente negligenciados em ensaios de ecotoxicidade, podem ser mais tóxicos do que o glifosato *per se* (SOLOMON e THOMPSON, 2003; RELYEA, 2005b; PEREIRA et al., 2009). O surfactante polioxietileno-amina (POEA), por exemplo, é usado no Roundup[®] com o objetivo de permitir que o glifosato permeie a cutícula cerosa das folhas das plantas (devido ao caráter zwitteriônico da molécula, o glifosato tem sua difusão através das membranas lipídicas das células dificultada).

Recentemente, Qiu et al. (2013), na avaliação da resposta bioquímica e fisiológica de uma cepa de *M. aeruginosa* ao glifosato e à formulação Roundup[®], fornecidos como única fonte de fósforo, verificaram, pelo aumento no número de células e concentração de clorofila-a, que a espécie foi capaz de utilizar glifosato, enquanto que o Roundup[®] demonstrou um efeito hormético no crescimento celular. Esta característica não foi observada na espécie *C. raciborskii* por Bai et al. (2014).

Em um estudo realizado com diferentes organismos, dentre eles as cianobactérias *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria aeruginosa*, *Pseudoanabaena* sp., *Anabaena inaequalis* e *Aphanizomenon flos-aquae*, Peterson et al. (1994) verificaram que, embora o glifosato tenha se mostrado bastante tóxico à espécie *Aphanizomenon flos-aquae*, houve estimulação no crescimento de cepas das espécies *Microcystis aeruginosa* e *Oscillatoria* sp. na presença do herbicida, fornecido através da formulação comercial Roundup[®], na concentração de 2,848 mg/L.

Muitos dos organismos testados por Forlani et al. (2008) foram também avaliados com relação à ecotoxicidade do glifosato, da formulação comercial Roundup[®] 360 SL, isopropilamina (IPA; um composto presente em concentração equimolar ao glifosato nas formulações comerciais do Roundup[®]) e do sal de isopopilamina de glifosato (GIPA; 1:1) por Lipok et al. (2010). Dentre as cianobactérias testadas (*M. aeruginosa, Anabaena catenula, Arthrospira fusiformis, Leptolyngbya boryana, Nostoc punctiforme, Spirulina platensis* e *Synechocistis aquatilis*, além da microalga *Chlorella vulgaris*), os autores verificaram que, exceto para a espécie *S. aquatilis*, o glifosato revelou-se menos tóxico do que o IPA, tratado como um simples adjuvante. Para a espécie *M.*

aeruginosa, especificamente, Lipok et al. (2010) encontraram valores de EC₅₀ de 6,7, 251,4, 2,5 e 10,7 mg/L para o Roundup[®], glifosato, IPA e GIPA, respectivamente. Esta espécie, juntamente com *L. boryana* e *A. catenula*, estava entre os organismos mais sensíveis. No presente trabalho, no entanto, mesmo uma concentração mais do que 10 vezes menor já foi capaz de inibir totalmente o crescimento de uma cepa do gênero *Microcystis*.

Espécies de cianobactérias tolerantes a altos níveis de glifosato (tanto na forma de ácido livre, como sal de isopropilamina e na formulação comercial Roundup[®]) também foram observados por Powell et al. (1991). A ordem de toxicidade às espécies *Synechocystis* e *Anabaena variabilis*, correlacionada às taxas de consumo, foi Roundup[®] > sal de isopropilamina > ácido livre.

No estudo comparativo da toxicidade aguda de glifosato grau técnico, seu sal de isopropilamina, Roundup[®] e POEA à bactéria Microtox[®] (*Vibrio fischeri*), microalgas *Selenastrum capricornutum* e *Skeletonema costatum*, protozoários *Tetrahymena pyriformis* e *Euplotes vannus* e aos crustáceos *Ceriodaphnia dubia* e *Acartia tonsa*, Tsui e Chu (2003) verificaram que o POEA foi responsável por mais de 86% da toxicidade do Roundup[®] para os microrganismos testados (com exceção das microalgas). A ordem de toxicidade do POEA foi: invertebrados > protozoários > bactéria > microalgas, sendo inversa para o sal de isopropilamina de glifosato. Dentre as microalgas testadas, a *Skeletonema costatum* (diatomácea) mostrou-se 7 a 10 vezes mais sensível do que a *Selenastrum capricornutum* (alga verde) para o glifosato (produto técnico e na forma de sal). Já os organismos não fotossintéticos (bactéria, protozoários e crustáceos) mostraram-se muito mais tolerantes à toxicidade do sal de isopropilamina de glifosato, do produto técnico e do Roundup[®].

Dentre os requisitos na Avaliação de Risco Ecológico de praguicidas a espécies não-alvo, geralmente estão relacionados unicamente ao(s) ingrediente(s) ativo(s), não sendo considerando o potencial tóxico de adjuvantes nas formulações comerciais. Como dito anteriormente, surfactantes e outros ingredientes ditos inertes (e de identidade e percentuais não revelados), são adicionados ao ingrediente ativo para aumentar sua eficácia química e física, muitas vezes contribuindo significativamente para sua toxicidade. Por esta razão, testes de toxicidade tanto com a formulação comercial quanto com o ingrediente ativo deveriam ser realizados, de modo que se obtivessem resultados mais

fidedignos sobre o impacto ecotoxicológico de formulações em tanto nos organismos-alvo quanto naqueles não-alvo. Esta abordagem garantiria um suporte mais abrangente e robusto para as agências regulatórias e autoridades competentes sobre o manejo destes compostos em práticas agrícolas e áreas correlatas, uma vez que pode subestimar o potencial de formulações comerciais.

Deve-se considerar, ainda, que herbicidas raramente ocorrem isoladamente no ambiente, já que pulverizações são frequentemente realizadas com combinações de diferentes compostos. Sendo assim, mesmo compostos agir presentes em concentrações supostamente não-tóxicas, podem sinergisticamente, afetando o equilíbrio de organismos aquáticos.

5 CONCLUSÕES

No estudo do efeito de glifosato sobre o crescimento e produção de metabólitos secundários de 2 linhagens de cianobactérias de água doce brasileiras, observou-se que concentrações entre 0,1 e 1 mg/L não apresentaram efeito significativo sobre nenhuma das variáveis testadas na cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08. Além disso, diminuição na produção de microcistinas e aumento significativo na produção de microgininas foram observados na concentração de 15 mg/L de glifosato, que foi capaz de inibir em quase 50% o crescimento dessa cepa, que não foi capaz de crescer em concentrações superiores a 20 mg/L.

Já para a cepa *C. raciborskii* CENA 302, enquanto que concentrações de glifosato entre 1 e 15 mg/L não apresentaram efeito significativo sobre nenhuma das variáveis testadas, a concentração de 20 mg/L promoveu estímulo no crescimento e síntese de clorofila-a, carotenoides e saxitoxinas. Concentrações superiores a 30 mg/L do herbicida impediram o crescimento celular e, por consequência, a avaliação dos demais parâmetros fisiológicos. Com base nos efeitos das concentrações de glifosato testadas, pôde-se observar que a espécie *C. raciborskii* é mais resistente ao herbicida do que a *M. aeruginosa*.

Os testes de viabilidade celular pelo emprego da citometria de fluxo como ferramenta para avaliação da integridade da membrana das linhagens avaliadas demonstraram que concentrações bastante elevadas de glifosato (da ordem de 50 mg/L), não são capazes de promover dano às células, mesmo após longos períodos (até 120 h) de exposição. Pode-se inferir que o fator determinante da baixa toxicidade do glifosato às células expostas reside no caráter zwitteriônico da molécula, que dificulta sua difusão através das membranas lipídicas das células.

A exposição da cepa *M. aeruginosa* LTPNA 08 a 10 mg/L de glifosato demonstrou diminuição do teor do ácido linoleico (18:2n6) e aumento do ácido estearidônico (18:4n3), apenas nos primeiros dias de cultivo. Alterações no perfil de ácidos graxos, que desempenham um papel fundamental na habilidade de adaptação do organismo às condições de estresse e estão relacionadas às funções e fluidez da membrana celular e processos metabólicos, não foram

identificadas em nenhuma das concentrações de glifosato avaliadas na cepa *C. raciborskii* CENA 302.

Mesmo produtos formulados que apresentam o mesmo teor de glifosato em sua composição apresentaram toxicidades distintas às linhagens avaliadas. Alguns desses mostraram-se muito mais tóxicos do que o glifosato *per se*, demonstrando que o caráter tóxico é dependente não apenas do ingrediente ativo, mas também dos adjuvantes contidos na formulação.

Considerando-se que microalgas e cianobactérias são os principais produtores primários de ecossistemas aquáticos (além de serem a base da maioria das cadeias alimentares aquáticas, desempenham papel essencial na ciclagem de nutrientes e produção de oxigênio, fundamentais para todos os ecossistemas), a tolerância desses organismos em ambientes contaminados é bastante relevante do ponto de vista ecológico. Além disso, a avaliação da exposição de cianobactérias a herbicidas tem relevância para a saúde pública, tendo em vista a possibilidade de prevenir ou minimizar a incidência de doenças e efeitos adversos decorrentes da interação destas substâncias com os organismos do sistema aquático (algas, peixes, plantas) e com o homem.

Embora as concentrações testadas (na ordem de mg/L) não sejam frequentemente encontradas em corpos d'água, diante da elevada resistência das cianobactérias *M. aeruginosa* e *C. raciborskii* ao glifosato, e considerando-se a elevada interferência antrópica através de práticas agrícolas, pode-se inferir que o uso excessivo e frequente de herbicidas pode ser capaz de estimular o crescimento e dominância desses organismos, e afetar a síntese de metabólitos secundários, podendo comprometer a qualidade da água, e modificando a estrutura e funcionalidade de ecossistemas aquáticos.

Além disso, como os trabalhos na literatura que descrevem o efeito de glifosato sobre cianobactérias são escassos, não tendo sido encontrado nenhum relato da influência desse ou outro herbicida na produção de cianotoxinas e microgininas, investigações adicionais em outras espécies talvez possam contribuir para a compreensão das causas da produção de cianotoxinas e microgininas, até hoje desconhecidas.

156

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-ATY, A. M.; EL-DIB, M. A. Uptake and the effects of cyanazine on *Scenedesmus obliquus* and *Anabaena flos-aquae*. **Desalination**, v. 249, n. 3, p. 1294-1297, 2009.

ABDULLAH, M. P.; DAUD, J.; HOGN, K. S.; YEW, C. H. Improved method for the determination of glyphosate in water. **Journal of Chromatography A**, v. 697, n.1-2, p. 363-369, 1995.

ABOU-WALY, H.; ABOU-SETTA, M. M.; NIGG, H. N.; MALLORY, L. L. Growth response of freshwater algae, *Anabaena flos-aquae* and *Selenastrum capricornutum* to atrazine and hexazinone herbicides. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 46, p. 223-229, 1991.

ALFONSO, A.; LOUZÃO, M. C.; VIEYTES, M. R.; BOTANA, L. M. Comparative study of the stability of saxitoxin and neosaxitoxin in acidic solutions and lyophilized samples. **Toxicon**, v. 32, n. 12, 1593-1598, 1994.

ACQUAVELLA, J. F.; ALEXANDER, B. H.; MANDEL, J. S.; GUSTIN, C.; BAKER, B.; CHAPMAN, P.; BLEEKE, M. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 3, p. 321-326, 2004.

AMARANTE JUNIOR, O. P. D.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, p. 589-593, 2002.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A.; CASTELLANO, V. J.; MARTÍNEZ, M.; MARTIN, M. T.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**, v. 190, n. 1, p. 91-95, 2009.

ANDREU, V.; PICÓ, Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 10-11, p. 772-789, 2004.

ANJOS, F. M. D.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; ZAJAC, M. P.; HILLER, S.; CHRISTIAN, B.; ERLER, K.; LUCKAS, B.; PINTO, E. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. **Toxicon**, v. 48, n. 3, p. 239-245, 2006.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos e Toxicologia. 2010. **Monografias: G01-Glifosato**. Resolução RE nº 4.452 de 23/09/10. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6e4005004745948 99c26dc3fbc4c6735/G01.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 nov. 2014.

APARICIO, V. C.; DE GERONIMO, E.; MARINO, D.; PRIMOST, J.; CARRIQUIRIBORDE P.; COSTA, J. L. Environmental fate of glyphosate and

aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 1866-1873, 2013.

ARREGUI, M. C.; LENARDÓN, A.; SANCHEZ, D.; MAITRE, M. I.; SCOTTA, R.; ENRIQUE, S. Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. **Pest Management Science**, v. 60, n. 2, p. 163-166, 2003.

ASLIM, B.; OZTURK, S. Toxicity of herbicides to cyanobacterial isolates. **Journal** of Environmental Biology, v. 30, n. 3, p. 381-384, 2009.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2002. **Exposure Investigation Spring Valley Neighborhood**. Disponível em: http://www.atsdr.cdc.gov/sites/springvalley/mar02ei.html. Acesso em: 20 dez. 2012.

AVIGLIANO, L., A.; FASSIANO, V.; MEDESANI, D. A.; RIOS DE MOLINA, M. C.; RODRIGUEZ E. M. Effects of glyphosate on growth rate, metabolic rate and energy reserves of early juvenile crayfish, *Cherax quadricarinatus* M. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 92, n 6, p. 631-635, 2014.

AZEVEDO, S.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.

AZEVEDO, S. M. F. O.; EVANS, W. R.; CARMICHAEL, W. W.; NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Journal of Applied Phycology, v. 6, n. 3, p. 261-265, 1994.

AZEVEDO, M. T. D.; SANT'ANNA, C. L. Morfologia e reprodução. In: SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. D.; et al. (Ed.). Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias de águas continentais brasileiras. 1ª ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2006.

BAI, F.; LIU, R.; YANG, Y.; RAN, X.; SHI, J.; WU, Z. Dissolved organic phosphorus use by the invasive freshwater diazotroph cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii.* **Harmful Algae**, v. 39, p. 112-120, 2014.

BALAKUMAR, T.; RAVI. V. Catalytic degradation of the herbicide glyphosate by the paddy field isolates of cyanobacteria. *In:* **Algae and Their Biotechnological Potential**. 1st ed., Springer, 2001. 316p.

BANKER, R.; TELTSCH, B.; SUKENIK, A.; CARMELI, S. 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 387-389, 2000.

BAPTISTA, M. G.; NIXDORF, B. Low disturbances favor steady state: case of cyanobacterial monodominance in a Brazilian coastal lagoon. **Inland Waters**, v. 4, n. 2, p. 243-254, 2014.

BATTAGLIN, W. A.; KOLPIN, D. W.; SCRIBNER, E. A.; KUIVILA, K. M.; SANDSTROM, M. W. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 2002. **JAWRA Journal of the American Water Resources Association**, v. 41, n. 2, p. 323-332, 2005.

BATTAGLIN, W. A.; RICE, K. C.; FOCAZIO, M. J.; SALMONS, S.; BARRY; R. X. The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa, and Wyoming, 2005-2006. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 155, n. 1-4, p. 281-307, 2009.

BAYLIS, A. D. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. **Pest Management Science**, v. 56, n. 4, p. 299-308, 2000.

BECKER, A.; MEISTER, A.; WILHELM, C. Flow cytometric discrimination of various phycobilin-containing phytoplankton groups in a hypertrophic reservoir. **Cytometry**, v. 48, n. 1, p. 45-57, 2002.

BENACHOUR, N.; SIPAHUTAR, H.; MOSLEMI, S.; GASNIER, C.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, G. E. Time- and dose-dependent effects of Roundup on human embryonic and placental cells. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 126-33, 2007.

BERRY, J. P.; GANTAR, M.; PEREZ M. H.; BERRY, G.; NORIEGA, F. G. Review. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. **Marine Drugs**, v. 6, p. 117-146, 2008.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. 2ª ed. São Carlos: RiMa, 502 p., 2006.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Detection of potencial microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a mcyB molecular marker. **Harmful Algae**, v. 2, p. 51-60, 2003.

BORGGAARD, O. K.; GIMSING, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 441-456, 2008.

BÖRJESSON, E.; TORSTENSSON, L. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. **Journal of Chromatography A**, v. 886, n. 1-2, p. 207-216, 2000.

BORTOLI, S.; OLIVEIRA-SILVA, D.; KRÜGER, T.; DÖRR, F. A.; COLEPICOLO, P.; VOLMER, D. A.; E. PINTO, E. Growth and microcystin production of a Brazilian *Microcystis aeruginosa* strain (LTPNA 02) under different nutrient conditions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 389-398, 2014.

BORTOLI, S.; VOLMER, D.A. Account: characterization and identification of microcystins by mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1-19, 2014.

BOTTA, F.; LAVISON, G.; COUTURIER, G.; ALLIOT, F.; MOREAU-GUIGON, E.; FAUCHON, N.; GUERY, B.; CHEVREUIL, M.; BLANCHOUD, H. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. **Chemosphere**, v. 77, n. 1, p. 133-139, 2009.

BOUVY, M.; FALCÃO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A. Occurrence of *Cylindrospermopis raciborskii* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, p. 13-27, 1999.

BRANCO, C. W.; SENNA, P. A. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. **Algological Studies**, v. 75, p. 85-96, 1994.

BRASIL. 2002. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002.** Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 8 jan. 2002. Seção 1, pt1.

BRASIL. 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. **Culturas/Tolerâncias – Glifosato**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_ cons. Acesso em: 02 jan. 2015.

BRASIL. 2004. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS 518/2004**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ portaria_518_2004.pdf>. Acesso em: 12 set. 2010.

BRASIL. 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA 357/2005**. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/res/ res05/res35705.pdf>. Acesso em: 12 set. 2010.

BRASIL. 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS 2914/2011**. Disponível em: http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/ Portaria_MS_2914-11.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2012.

BRASIL. 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Listagem de OGM autorizados no Brasil. Disponível em: http://www.agricultura.gov. br/portal/pls/portal/!PORTAL.wwpob_page.show?_docname=1324452.PDF>. Acesso em: 11 jan. 2015.

BREWSTER, D. W.; WARREN, J.; HOPKINS, W. E. Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: Tissue distribution, identification, and quantitation of

glyphosate-derived materials following a single oral dose. Fundamental and Applied Toxicology, v. 17, n. 11, p. 43-51, 1991.

BRYANT, D. A.; GUGLIELMI, G.; TANDEAU DE MARSAC, N.; CASTETS, A. M.; COHEN-BAZIRE, G. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. **Archives of Microbiology**, v. 123, p. 113-127, 1979.

BURFORD, M. A.; DAVIS, T. W. Physical and chemical processes promoting dominance of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 29, p. 883-891, 2011.

BYER, J. D.; STRUGER, J.; KLAWUNN, P.; TODD, A.; SVERKO, E. Low Cost Monitoring of Glyphosate in Surface Waters Using the ELISA Method: An Evaluation. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 16, p. 6052-6057, 2008.

CAMPOS, E.; VASCONCELOS, V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 1, p. 268-287, 2010.

CARDOZO, K. H. M.; Guaratini, T.; Barros, M. P.; Falcão, V. R.; Tonon, A. P.; Lopes, N. P.; Campos, S.; Torres, M. A.; Souza, A. O.; Colepicolo, P.; Pinto, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 60-78, 2007.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites - The cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V.; BUNNER, D. L.; ELOFF, J. N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.; KRISHNAMURTHY, T.; MIN-JUAN, Y.; MOORE, R. E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O. M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, n. 11, p. 971-973, 1988.

CARNEIRO, R. L.; DÖRR, F. A.; DÖRR, F.; BORTOLI, S.; DELHERBE, N.; VÁSQUEZ, M.; PINTO, E. Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 3, p. 692-702, 2012.

CARNEIRO, R. L.; SILVA, A. P. R.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Use of the cell quota and chlorophyll content for normalization of cylindropermopsin produced by two *Cylindrospermopsis raciborskii* strains grown under different light intensities. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 1, p. 93-100, 2013.

CARNEIRO, R. L.; VENANCIO DOS SANTOS, M. E.; FURLANETTO PACHECO, A. B.; FELICIANO DE OLIVEIRA E AZEVEDO, S. M. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production

in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Journal of Plankton Research**, v. 3, n. 5, 481-488, 2009.

CARVALHO, L. R.; PIPOLE, F.; WERNER, V. R.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; CAMARGO, A. C. M.; RANGEL, M.; KONNO, K.; SANT'ANNA, C. L. A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do Sul State, southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 761-769, 2008.

CASTRO, D.; VERA, D.; LAGOS, N.; GARCÍA, C.; VÁSQUEZ, M. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. **Toxicon**, v. 44, n. 5, p. 483-489, 2004.

CATTANEO, R.; CLASEN, B.; LORO, V. L.; DE MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; BALDISSEROTTO, B.; SANTI, A.; DE AVILA, L. A. Toxicological responses of Cyprinus carpio exposed to a commercial formulation containing glyphosate. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 597-602, 2011.

CEDERGREEN, N.; STREIBIG, J. C. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. **Pest Management Science**, v. 61, n. 12, p. 1152-1160, 2005.

CHANG, D.-W.; HSIEH, M.-L.; CHEN, Y.-M.; LIN, T.-F.; CHANG, J.-S. Kinetics of cell lysis for *Microcystis aeruginosa* and *Nitzschia palea* in the exposure to β -cyclocitral. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 2-3, 1214-1220, 2011b.

CHANG, F. C.; SIMCIK, M. F.; CAPEL, P. D. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 548-555, 2011a.

CHEN, L.; XIE, M.; BI, Y.; WANG, G.; DENG, S.; LIU, Y. The combined effects of UV-B radiation and herbicides on photosynthesis, antioxidant enzymes and DNA damage in two bloom-forming cyanobacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 224-230, 2012.

CHISLOCK, M. F.; SHARP, K. L.; WILSON, A. E. *Cylindrospermopsis raciborskii* dominates under very low and high nitrogen-to-phosphorus ratios. **Water Research**, v. 49, n. 0, p. 207-214, 2014.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water – a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 3rd ed.: Publisher on behalf of WHO – World Health Organization. 1999.

CHRISTENSEN, M. G.; TEICHER, H. B.; STREIBIG, J. C. Linking fluorescence induction curve and biomass in herbicide screening. **Pest Management Science**, v. 59, n. 12, p. 1303-1310, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS. 2014. **Pesticides residues in food and feed. Maximum Residue Limits for Glyphosate**. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/details.html?id=158&print=true>. Data de acesso: 12 jan. 2015.

CORBERA, M.; HIDALGO, M.; SALVADÓ, V. Extraction and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases. **Microchimica Acta**, v. 153, n. 3, p. 203-209, 2006.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. European Community Council Directive concerning the quality of water intended for human consumption. 1998. Official Journal of the European Communities, L330:32-54.

COUPE, R. H.; KALKHOFF, S. J.; CAPEL, P. D.; GREGOIRE, C. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. **Pest Management Science**, v. 68, n. 1, p. 16-30, 2012.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, C. S. P.; SILVA-STENICO, M. E.; FIORE, M. F.; DE CASTRO, H. F. *Microcystis aeruginosa* lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 8, p. 177-182, 2012.

DE FIGUEIREDO, D. R.; AZEITEIRO, U. M.; ESTEVES, S. M.; GONCALVES, F. J. M.; PEREIRA, M. J. Microcystin-producing blooms - a serious global public health issue. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 2, p. 151-163, 2004.

DEO, S. P.; SHETTY, P. Accidental chemical burns of oral mucosa by herbicide. **Journal of the Nepal Medical Association**, v. 52, n. 1, p. 40-42, 2012.

DE SOLLA, S. R.; STRUGER, J.; MCDANIEL, T. V. Detection limits can influence the interpretation of pesticide monitoring data in Canadian surface waters. **Chemosphere**, v. 86, n. 6, p. 565-571, 2012.

DEVINE, M. D. Why are there not more herbicide-tolerant crops? **Pest Management Science**, v. 61, n. 3, p. 312-317, 2005.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach, 3rd ed., Chichester, UK: Wiley, 550 p., 2009. p. 7-39

DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 545-550, 1995.

DIENER, M.; ERLER, K.; CHRISTIAN, B.; LUCKAS, B. Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 12, p. 1821-1826, 2007.

DILL, G. M.; CAJACOB, C. A.; PADGETTE, S. R. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 326-331, 2008.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. **AgBioForum**, v. 12, n. 3-4, p. 346-357, 2009.

EDGE, C.; GAHL, M.; THOMPSON, D.; HAO, C. Y.; HOULAHAN J. Variation in amphibian response to two formulations of glyphosate-based herbicides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 11, p. 2628-2632, 2014.

EDWARDS, W. M.; TRIPLETT, G. B.; KRAMER, R. M. A Watershed study of glyphosate transport in runoff. **Journal of Environmental Quality**, v. 9, n. 4, p. 661-665,1980.

ERHARD, M.; VON DOHREN, H.; JUNGBLUT, P. R. Rapid identification of the new anabaenopeptin G from *Planktothrix agardhii* HUB 011 using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, p. 337-343, 1999.

FAN, G.; LUO, J.; CHEN, J.; LIN, Q.; CHEN, L.; LIN, R. Influence of ultrasonic intensity on *Microcystis* sp. viability: a flow cytometric analysis. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 8, p. 519-524, 2014.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. **FAO Specifications and Evaluations for Glyphosate**. FAO Specification 284 / TC (November 2014). Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/ agphome/documents/Pests_Pesticides/ Specs/Glypho_2014.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2015.

FASTNER, J., HEINZE, R., HUMPAGE, A.R., MISCHKE, U., EAGLESHAM, G.K., CHORUS, I. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. **Toxicon**, v. 42, p. 313-321, 2003.

FERRÃO-FILHO, A. D. S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2729-2772, 2011.

FORLANI, G.; MANGIAGALLI, A.; NIELSEN, E.; SUARDI, C. M. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 7, p. 991-997, 1999.

FORLANI, G.; PAVAN, M.; GRAMEK, M.; KAFARSKI, P.; LIPOK, J. Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, n. 3, p. 443-456, 2008.

FRIAS, H. V.; MENDES, M. A.; CARDOZO, K. H. M.; CARVALHO, V. M.; TOMAZELA, D.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Use of *electrospray* tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 344, n. 3, p. 741-746, 2006.

FROSCIO, S. M.; HUMPAGE, A. R., BURCHAM, P. C., FALCONER, I. R. Cellfree protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin. **Environmental Toxicology**, v. 16, p. 408-412, 2001.

FROSCIO, S. M.; HUMPAGE, A. R.; BURCHAM, P. C.; FALCONER, I. R. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. **Environmental Toxicology**, v. 18, 243-251, 2003.

FUNKE, T.; HAN, H.; HEALY-FRIED, M. L.; FISCHER, M.; SCHÖNBRUNN, E. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 35, p. 13010-13015, 2006.

GAN, N. Q.; HUANG, Q.; ZHENG, L. L.; SONG, L. R. Quantitative assessment of toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural environments using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. **Science China-Life Sciences**, v. 53, n. 8, p. 973-980, 2010.

GARRY, V. F.; HARKINS, M. E.; ERICKSON, L. L.; LONG-SIMPSON, L. K.; HOLLAND, S. E.; BURROUGHS, B. L. Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 441-449, 2002.

GIESY, J. P.; SOLOMON, K. R.; DOBSON, S. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GLOZIER, N. E.; STRUGER, J.; CESSNA, A. J.; GLEDHILL, M.; RONDEAU, M.; ERNST, W. R.; SEKELA, M. A.; CAGAMPAN, S. J.; SVERKO, E.; MURPHY, C.; MURRAY, J. L.; DONALD, D. B. Occurrence of glyphosate and acidic herbicides in select urban rivers and streams in Canada, 2007. Environmental Science and Pollution Research, v. 19, n. 3, p. 821-834, 2012.

GONG, Y.; AO, H.; LIU, B.; WEN, S.; WANG, Z.; HU, D.; ZHANG, X.; SONG, L.; LIU, J. Effects of inorganic arsenic on growth and microcystin production of a *Microcystis* strain isolated from an algal bloom in Dianchi Lake, China. **Chinese Science Bulletin**, v. 56, n. 22, p. 2337-2342, 2011.

GORHAN, P. R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U. T.; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lingb.). Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie, v. 15, p. 796-804, 1964.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. Algae. Prentice Hall, Inc.: New Jersey, 695 p., 2000.

GROVER, J. P.; ROELKE, D. L.; BROOKS, B. W. Modeling of plankton community dynamics characterized by algal toxicity and allelopathy: A focus on historical *Prymnesium parvum* blooms in a Texas reservoir. **Ecological Modelling**, v. 227, n. 0, p. 147-161, 2012.

GUIL-GUERRERO, J. L.; BELARBI, E. I. H.; REBOLLOSO-FUENTES, M. M. Eicosapentaenoic and arachidonic acids purification from the red microalga *Porphyridium cruentum*. **Bioseparation**, v. 9, p. 299-306, 2000.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. 2015. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: http://www.algaebase.org. Acesso em: 10 jan. 2015.

HADJOUDJA, S.; VIGNOLES, C.; DELUCHAT, V.; LENAIN, J.-F.; LE JEUNE, A.-H.; BAUDU, M. Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 4, p. 255-264, 2009.

HAANDE, S.; ROHRLACK, T.; BALLOT, A.; ROBERG, K.; SKULBERG, R.; BECK, M.; WIEDNER, C. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. **Harmful Algae**, v. 7, p. 692-701, 2008.

HAMILTON, P. B.; LEY L.; DEAN, S.; PICK, F. R. The occurrence of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Constance Lake: an exotic cyanoprokaryote new to Canada. **Phycologia**, v. 44, n. 1, p. 17-25, 2005.

HANKE, I.; SINGER, H.; HOLLENDER, J. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 6, p. 2265-2276, 2008.

HAUGHTON, A. J.; BELL, J. R.; BOATMAN, N. D.; WILCOX, A. The effect of the herbicide glyphosate on non-target spiders: Part II. Indirect effects on *Lepthyphantes tenuis* in field margins. **Pest Management Science**, v. 57, n. 11, p. 1037-1042, 2001.

HELANDER, M.; SALONIEMI, I.; SAIKKONEN, K. Glyphosate in northern ecosystems. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 10, p. 569-574, 2012.

HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A. M.; FLORES, E. Nitrogen control in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 2, p. 411-425, 2001.

HERRMANN, K. M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Phisiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 473-503, 1999.

HIETANEN, E; LINNAINMAA, K.; VAINIO, H. Effects of phenoxy herbicides and glyphosate on the hepatic and intestinal biotransformation activities in the rat. **Acta Pharmacology and Toxicology**, v. 53, n. 2, p. 103-112, 1983.

HOFF-RISSETI, C.; DORR, F. A.; SCHAKER, P. D. C.; PINTO, E.; WERNER, V. R.; FIORE, M. F. Cylindrospermopsin and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. 1-14, 2013.

HORST, G. P.; SARNELLE, O.; WHITE, J. D.; HAMILTON, S. K.; KAUL, R. B.; BRESSIE, J. D. Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 54, n. 0 p. 188-198, 2014.

HUDNELL, H. K. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of science and research needs. Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 619, USA: Springer, 950 p., 2008.

HUED, A. C.; OBERHOFER, S.; DE LOS ÁNGELES BISTONI, M. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup[®]) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of Jenynsia multidentata (Anablepidae, cyprinodontiformes). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, n. 1, p. 107-117, 2012.

IBÁÑEZ, M.; POZO, Ó. J.; SANCHO, J. V.; LÓPEZ, F. J.; HERNÁNDEZ, F. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, n. 2, p. 145-155, 2005.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2011. **Atlas de Saneamento**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtm. Acesso em: 24 dez. 2014.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **2015.** Brasil lidera o ranking de consumo de agrotóxicos. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/comunicacaoinformacao/site/home/n amidia/brasil_lidera_ranking_consumo_agrotoxicos>. Acesso em: **15 abr. 2015.**

INDERJIT, S. K. Effect of herbicides with different modes of action on physiological and cellular traits of *Anabaena fertilissima*. **Paddy and Water Environment**, v. 8, n. 3, p. 277-282, 2010.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (IEA). 2014. Defensivos Agrícolas: comercialização recorde em 2013 e expectativas de acréscimo nas vendas em 2014. Disponível em: http://www.iea.sp.gov.br/out/ LerTexto.php? codTexto=13467>. Acesso em: 24 dez. 2014.

ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. ISAAA Brief 46-2013: Biotech Crop Adoption in 2013. 2014. Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/biotechinfomercials/brief46-013/default.asp>. Acesso em: 11 jan. 2015.

ISHIDA, K.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, K. Microginins 299-A and -B, leucine aminopeptidase inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (NIES-299). **Tetrahedron**, v. 53, n. 30, p. 10281-10288, 1997.

ISHIDA, K.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M. Four new microginins, linear peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron**, v. 54, n. 44, p. 13475-13484, 1998.

ISHIDA, K.; KATO, T.; MURAKAMI, M.; WATANABE, M.; WATANABE, M. F. Microginins, zinc metalloproteases inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron**, v. 56, n. 44, p. 8643-8656, 2000.

ISSA, A. A. Interference of glyphosate with the shikimate pathway by Cyanobacteria in chemostat culture. **Microbios**, v. 100, n. 395, p. 47-55, 1999.

JACOB, G. S.; GARBOW, J. R.; HALLAS, L. E.; KIMACK, N. M.; KISHORE, G. M.; SCHAEFER, J. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 2953-2958, 1988.

JIANG, J.; LUCY, C. A. Determination of glyphosate using off-line ion exchange preconcentration and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection. **Talanta**, v. 72, n. 1, 113-118, 2007.

JOCHIMSEN E. M.; CARMICHAEL W. W.; AN J.S, CARDO D.M., COOKSON S.T., HOLMES C.E., ANTUNES M.B., DE MELO FILHO, D.A., LYRA T.M, BARRETO V.S., AZEVEDO S.M., JARVIS W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v.338, p.873–878, 1998.

JODLOWSKA, S.; LATALA, A. Simultaneous separation of chlorophylls and carotenoids by RP-HPLC in some algae and cyanobacteria from the Southern Baltic. **Oceanological and Hydrobiological Studies**, v. 32, n. 2, p. 81-89, 2003.

KAEBERNICK, M. K.; NEILAN, B. A.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3387-3392, 2000.

KANNAN, V.; SRINIVASAN, S.; KATHIRAVAN, G.; RAJU, K.; SUBRAMANIAN, K.; SIVAKUMAR, D. Influence of glyphosate on *Mastigocladus laminosus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 20, n. 3, p. 199-206, 1999.

KAYA, B.; Creus, A.; Yanikoglu, A.; Cabre, O.; Marcos, R. Use of the Drosophila wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 6, n. 1, p. 40-46, 2000.

KEARNS, K. D.; HUNTER, M. D. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 291-297, 2000.

KIELAK, E.; SEMPRUCH, C.; MIODUSZEWSKA, H.; KLOCEK, J.; LESZCZYŃSKI, B. Phytotoxicity of Roundup Ultra 360 SL in aquatic ecosystems: Biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 3, p. 237-243, 2011.

KIER, L. D.; KIRKLAND, D. J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. **Critical Reviews in Toxicology**, Early Online, p. 1-33, 2013.

KISHORE, G. M.; JACOB, G. S. Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 25, p. 12164-12168, 1987.

KITCHEN, L. M.; WITT, W. W.; RIECK, C. E. Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 29, p. 513-516, 1981.

KONG, Y.; LOU, I.; ZHANG, Y.; LOU, C.; MOK, K. Using an online phycocyanin fluorescence probe for rapid monitoring of cyanobacteria in Macau freshwater reservoir. **Hydrobiologia**, v. 741, n. 1, 33-49, 2014.

KJAER, J.; Olsen, P.; Ullum, M.; Grant, R. Leaching of glyphosate and aminomethylphosphonic acid from Danish agricultural field sites. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, n. 2, p. 608-620, 2005.

KOLPIN, D. W.; THURMAN, E. M.; LEE, E. A.; MEYER, M. T.; FURLONG, E. T.; GLASSMEYER, S. T. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. **Science of the Total Environment**, v. 354, n. 2–3, p. 191-197, 2006.

KOMAREK, J.; KLING, H. Variation in six planktonic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa). **Algological Studies**, v. 88, p. 21-46, 1991.

KONONOVA, S. V.; NESMEYANOVA, M. A. Phosphonates and their degradation by microorganisms. **Biochemistry (Moscow)**, v. 67, n. 2, p. 184-195, 2002.

KRZYŚKO-ŁUPICKA, T.; ORLIK, A. The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. **Chemosphere**, v. 34, n. 12, p. 2601-2605, 1997.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P. A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S. M. F. O., OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil. **Toxicon**, v. 37, p. 1359-1373, 1999.

LARSEN, K.; NAJLE, R.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 811-818, 2012.

LEE, H. L.; CHEN, K. W.; CHI, C. H.; HUANG, J. J.; TSAI, L. M. Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate-surfactant herbicide intoxication: A review of 131 cases. **Academic Emergency Medicine**, v. 7, n. 8, p. 906-910, 2000.

LEWIS, J.; JOHNSON, K. A.; ANDERSON, K. S. The catalytic mechanism of EPSP synthase revisited. **Biochemistry**, v. 38, p. 7372-7379, 1999.

LIPOK, J.; OWSIAK, T.; MLYNARZ, P.; FORLANI, G.; KAFARSKI, P. Phosphorus NMR as a tool to study mineralization of organophosphonates - The ability of *Spirulina* spp. to degrade glyphosate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 286-291, 2007.

LIPOK, J.; STUDNIK, H.; GRUYAERT, S. The toxicity of Roundup[®] 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 7, p. 1681-1688, 2010.

LÓPEZ-RODAS, V.; FLORES-MOYA, A.; MANEIRO, E.; PERDIGONES, N.; MARVA, F.; GARCÍA, M.; COSTAS, E. Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of pre-selective mutations. **Evolutionary Ecology**, v. 21, n. 4, p. 535-547, 2007.

LOU, L. P.; YUE, Q. K.; LIU, F. X.; CHEN, F.; HU, B. L.; CHEN, Y. X. Ecotoxicological analysis of fly ash and rice-straw black carbon on *Microcystis aeruginosa* using flow cytometry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 92, p. 51-56, 2013.

LUKAC, M.; R. AEGERTER. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v. 31, p. 293–305, 1993.

LÜRLING, M.; ROESSINK, I. On the way to cyanobacterial blooms: Impact of the herbicide metribuzin on the competition between a green alga (*Scenedesmus*) and a cyanobacterium (*Microcystis*). **Chemosphere**, v. 65, n. 4, p. 618-626, 2006.

LYCK, S. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis* aeruginosa. **Journal of Plankton Research**, v. 26, p. 727-736, 2004.

MA, J.; TONG, S.; WANG, P.; CHEN, J. Toxicity of seven herbicides to the three cyanobacteria *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa*. International Journal of Environmental Research, v. 4, n. 2, p. 347-352, 2010.

MACHADO, M. D.; SOARES, E. V. Development of a short-term assay based on the evaluation of the plasma membrane integrity of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 1035-1042, 2012.

MACKINTOSH, C., BEATTIE, K. A., KLUMPP, S., COHEN, P.; CODD, G. A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2a from both mammals and higher-plants. **Febs** Letters, v. 264, n. 2, p. 187-192, 1990.

MAIBACH, H. I. Irritation sensitization photo irritation and photosensitization assays with a glyphosate herbicide. **Contact Dermatitis**, v.15, n. 3, p. 152-156, 1986.

MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. Journal of Chromatography **A**, v. 823, n. 1-2, p. 129-136, 1998.

MALHOTRA, R. C.; GHIA, D. K.; CORDATO, D. J.; BERAN, R. G. Glyphosatesurfactant herbicide-induced reversible encephalopathy. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 11, p. 1472-1473, 2010.

MATTOS, M. L. T.; PERALBA, M. C. R.; DIAS, S. L. P.; PRATA, F.; CAMARGO, L. Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. **Pesticidas: Revista de Toxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 169-179, 2002.

MAULE, A.; WRIGHT, S. J. L. Herbicide effects on the population growth of some green algae and cyanobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 369–379, 1984.

MEHNERT, G.; RUECKER, J.; WIEDNER, C. Population dynamics and akinete formation of an invasive and a native cyanobacterium in temperate lakes. **Journal of Plankton Research**, v. 36, n. 2, p. 378-387, 2014.

MENSAH, P. K.; MULLER W. J.; PALMER, C. G. Acetylcholinesterase activity in the freshwater shrimp Caridina nilotica as a biomarker of Roundup (R) herbicide pollution of freshwater systems in South Africa. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 2, p. 402-408, 2012.

MEREL, S., CLÉMENT, M., THOMAS, O. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. **Toxicon**, v.55, p.677-691, 2010.

MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SERALINI, G. E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**, v. 313, n. 2-3, p.122-128, 2013.

MIHALI, T. K.; KELLMANN, R.; MUENCHHOFF, J.; BARROW, K. D.; NEILAN, B. A. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin

biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 716-722, 2008.

MIKULA, P., ZEZULKA, S., JANCULA, D., MARSALEK, B. Metabolic activity and membrane integrity changes in *Microcystis aeruginosa* – new findings on hydrogen peroxide toxicity in cyanobacteria. **European Journal of Phycology**, v. 47, n. 3, p. 195-206, 2012.

MINK, P. J. et al. Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 440-452, 2012.

MOISANDER, P. H.; CHESHIRE, L. A.; BRADDY, J.; CALANDRINO, E. S.; HOFFMAN, M.; PIEHLER, M. F.; PAERL, H. W. Facultative diazotrophy increases *Cylindrospermopsis raciborskii* competitiveness under fluctuating nitrogen availability. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 3, p. 800-811, 2012.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 229-246, 2009.

MOLICA, R. J. R.; ONODERA, H.; GARCIA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S.; MERGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S. M. F. O.; LAGOS, N. Toxins in freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, v. 41, p. 606-611, 2002.

MONSANTO. **Company History**. 2009. Disponível em: http://www.monsanto.com/whoweare/Pages/monsanto-history.aspx. Acesso em: 12 set. 2010.

MÖRTL, M.; NÉMETH, G.; JURACSEK, J.; DARVAS, B.; KAMP, L.; RUBIO, F.; SZÉKÁCS, A. Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. **Microchemical Journal**, 2012.

MOSCHINI-CARLOS, V.; Bortoli, S.; Pinto, E.; Nishimura, P. Y.; De Freitas, L. G.; Pompêo, M. L. M.; Dörr, F. Cyanobacteria and cyanotoxin in the Billings reservoir (São Paulo, SP, Brazil). **Limnetica**, v. 28, n. 2, p. 273-282, 2009.

NEILAN, B. A.; PEARSON, L. A.; MUENCHHOFF, J.; MOFFITT, M. C.; DITTMANN, E. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 1239-1253, 2013.

NEILAN, B. A.; SAKER, M. L.; FASTNER, J.; TÖRÖKNÉ, A.; BURNS, B. P. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 1, p. 133-140, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. (eds). Lehninger Priciples of Biochemistry. Third edition (translated to Portuguese), São Paulo, Sarvier. 2002.

NEUMANN, U.; FORCHERT, A.; FLURY, T.; WECKESSER, J. Microginin FR1, a linear peptide from a water bloom of *Microcystis* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, p. 475-478, 1997.

NEWCOMBE, G.; CHORUS, I.; FALCONER, I.; LIN, T. F. Cyanobacteria: Impacts of climate change on occurrence, toxicity and water quality management. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1347-1348, 2012.

NORGAARD, T.; MOLDRUP, P.; FERRE, T. P. A.; OLSEN, P.; ROSENBOM, A. E.; DE JONGE, L. W. Leaching of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid from an Agricultural Field over a Twelve-Year Period. **Vadose Zone Journal**, v. 13, n. 10, p. 18, 2014.

NORRIS, R. L. G.; EAGLESHAM, G. K.; PIERENS, G.; SHAW, G. R.; SMITH, M. J.; CHISWELL, R. K.; SEAWRIGHT, A. A.; MOORE, M. R. Deoxy-cylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis* raciborskii. Environmental Toxicology, v. 14, 163-165, 1999.

NORRIS, R. L. G.; SEAWRIGHT, A. A.; SHAW, G. R.; SENOGLES, P.; EAGLESHAM, G. K.; SMITH, M. J.; CHISWELL, R. K.; MOORE, M. R. Hepatotoxic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. **Toxicon**, v. 40, p. 471-476, 2002.

NTP - National Toxicology Program. 1992. **Toxicity studies of glyphosate**. National Toxicology Program Toxicity Report Series. 39 p.

OCAÑA, M. F.; FRASER, P. D.; PATEL, R. K.; HALKET, J. M.; BRAMLEY, P. M. Mass spectrometric detection of CP4 EPSPS in genetically modified soya and maize. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 3, p. 319-328, 2007.

OHTANI, I.; MOORE, R. E. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. Journal of the American Chemical Society, v. 114, p. 7941-7942, 1992.

OKINO, T.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, K. Microginin, an angiotensin converting enzyme inhibitor from the blue green alga *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 34, p. 501-504, 1993.

OLORUNSOGO, O. O.; BABABUNMI, E. A.; BASSIR, O. Effect of glyphosate on rat liver mitochondria *in vivo*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 357-364, 1979.

ORR, P. T.; JONES, G. J. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen limited *Microcystis aeruginosa* cultures. **Limnology and Oceanography**, v. 43, p. 1604-1614, 1998.

OSHIMA, Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. **Journal of AOAC International**, v. 78, p. 528-532, 1995.

PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosynska) Seenaya et Subba Raju, an expading, higly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 107, p. 563-593, 1997. PANNARD, A.; LE ROUZIC, B.; BINET F. Response of phytoplankton community to low-dose atrazine exposure combined with phosphorus fluctuations. Archives of Environmental Contamination Toxicology, v. 57, p. 50-59, 2009.

PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1650-1680, 2010.

PEREIRA, J.; ANTUNES, S.; CASTRO, B.; MARQUES, C.; GONÇALVES, A.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 4, p. 455-463, 2009.

PÉREZ, G. L.; TORREMORELL, A.; MUGNI, H.; RODRÍGUEZ, P.; VERA, M. S.; NASCIMENTO, M.; ALLENDE, L.; BUSTINGORRY, J.; ESCARAY, R.; FERRARO, M.; IZAGUIRRE, I.; PIZARRO, H.; BONETTO, C.; MORRIS, D. P.; ZAGARESE, H. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. **Ecological Applications**, v. 17, n. 8, p. 2310-2322, 2007.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 1, p. 61-66, 2008.

PESCE, S.; FAJON, C.; BARDOT, C.; BONNEMOY, F.; PORTELLI, C.; BOHATIER, J. Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 352-360, 2008.

PETERSON, H. G.; BOUTIN, C.; MARTIN, P. A.; FREEMARK, K. E.; RUECKER, N. J.; MOODY, M. J. Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. **Aquatic Toxicology**, v. 28, n. 3-4, p. 275-292, 1994.

PICCINI, C.; AUBRIOT, L.; FABRE, A.; AMARAL, V.; GONZALEZ-PIANA, M., GIANI, A.; FIGUEREDO, C. C.; VIDAL, L.; KRUK, C.; BONILLA, S. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. **Harmful Algae**, v. 10, n. 6, p. 644-653, 2011.

PIORRECK, M.; BAASCH, K. -H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 1984.

POWELL, H. A.; KERBBY, N. W.; ROWELL, P. Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. **New Phytologist**, v. 119, n. 3, p. 421-426, 1991.

QIU, H.; GENG, J.; REN, H.; XIA, X.; WANG, X.; YU, Y. Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to glyphosate and its Roundup[®] formulation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248-249, n. 0, p. 172-176, 2013.

RAMIREZ, C. E.; BELLMUND, S.; GARDINALI, P. R. A simple method for routine monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters using lyophilization and LC-FLD plus MS/MS. Case study: canal with influence on Biscayne National Park. **Science of the Total Environment**, v. 496, p. 389-401, 2014.

RAMOS, P. B.; DIEHL, F.; DOS SANTOS, J. M.; MONSERRAT, J. M.; YUNES, J. S. Oxidative stress in rats induced by consumption of saxitoxin contaminated drink water. **Harmful Algae**, v. 37, p. 68-74, 2014.

RAMWELL, C. T.; KAH, M.; JOHNSON, P. D. Contribution of household herbicide usage to glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in surface water drains. **Pest Management Science**, v. 70, n. 12, p. 1823-1830, 2014.

RANDO, T. A.; STRICHARTZ, G. R. Saxitoxin blocks batrachotoxin-modified sodium channels in the node of Ranvier in a voltage-dependent manner. **Biophysical Journal**, v. 49, n. 3, p. 785-794, 1986.

RANK, J.; JENSEN, A. G.; SKOV, B.; PEDERSEN, L. H.; JENSEN, K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test. **Mutation Research**, v. 300, n. 1, p. 29-36, 1993.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 521-539, 2009.

RAVI, V.; BALAKUMAR, H. Biodegradation of the C-P bond in glyphosate by the cyanobacterium *Anabaena variabilis* L. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 57, n. 10-11, p. 790-794, 1998.

RELYEA, R. A. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. **Ecological Applications**, v. 15, n. 4, p. 1118-1124, 2005a.

RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological Applications**, v. 15, n. 2, p. 618-627, 2005b.

RELYEA, R. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. **Oecologia**, v. 159, n. 2, p. 363-376, 2009.

REPKA, S.; KOIVULA, M.; HARJUNPA, V.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K. Effects of phosphate and light on growth of and bioactive peptide production by the cyanobacterium Anabaena strain 90 and its anabaenopeptilide mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4551-4560, 2004.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. E.Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

ROBERTS, D. M.; BUCKLEY, N. A.; MOHAMED, F.; EDDLESTON, M.; GOLDSTEIN, D. A.; MEHRSHEIKH, A.; BLEEKE, M. S.; DAWSON, A. H. A perspective observation study of the clinical toxicology of glyphosate containing herbicides in adults with acute self-poisoning. **Clinical Toxicology** (Philadelphia, Pa.), v. 48, n. 2, p. 129-136, 2010.

RUEPPEL, M. L.; BRIGHTWELL, B. B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, J. T. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 517-528, 1977.

RUNNEGAR, M. T.; XIE, C.; SNIDER, B. B.; WALLACE, G. A.; WEINREB, S. M.; KUHLENKAMP, J. *In vitro* hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. **Toxicological Sciences**, v. 67, p. 81-87, 2002.

RZYMSKI, P.; PONIEDZIALEK, B.; KOKOCINSKI, M.; JURCZAK, T.; LIPSKI, D.; WIKTOROWICZ, K. Interspecific allelopathy in cyanobacteria: Cylindrospermopsin and *Cylindrospermopsis raciborskii* effect on the growth and metabolism of *Microcystis aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 35, p. 1-8, 2014.

SÁENZ, M. E.; DI MARZIO, W. D. Ecotoxicidad del herbicida Glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. **Limnetica**, v. 28, n. 1, p. 149-158, 2009.

SAFARPOUR, H.; ASIAIE, R. Determination of Glyphosate as cross-contaminant in a commercial herbicide by capillary electrophoresis-electrospray ionizationmass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 26, n. 7-8, p. 1562-1566, 2005.

SAKER, M. L.; NOGUEIRA, I. R.; VASCONCELOS, V. M.; NEILAN, B. A.; EAGLESHAM, G. K.; PEREIRA, P. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 243-250, 2003.

SANCHÍS, J.; KANTIANI, L.; LLORCA, M.; RUBIO, F.; GINEBREDA, A.; FRAILE, J.; GARRIDO, T.; FARRÉ, M. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 7, p. 2335-2345, 2012.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 71, n. 3-4, p. 359-385, 2000.

SANT'ANNA, C. L.; BRANCO, L. H. Z.; GAMA JÚNIOR, W. A.; WERNE, V. R. Lista de Cyanobacteria do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1a, p. 1-41, 2012.

SANT'ANNA, C. L.; CARVALHO, L. R.; FIORE, M. F.; SILVA-STENICO, M. E.; LORENZI, A. S.; RIOS, F. R.; KONNO, K.; GARCIA, C.; LAGOS, N. Highly toxic *Microcystis aeruginosa* strain, isolated from São Paulo-Brazil, produce hepatotoxins and paralytic shellfish poison neurotoxins. **Neurotoxicity Research**, v. 19, n. 3, p. 389-402, 2011.

SAXTON, M. A.; MORROW, E. A.; BOURBONNIERE, R. A.; WILHELM, S. W. Glyphosate influence on phytoplankton community structure in Lake Erie. **Journal of Great Lakes Research**, v. 37, n. 4, p. 683-690, 2011.

SCHNEIDER, M. I.; SANCHEZ, N.; PINEDA, S.; CHI, H.; RONCO, A. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. **Chemosphere**, v. 76, n. 10, p. 1451-1455, 2009.

SCRIBNER, E. A.; BATTAGLIN, W. A.; GILLIOM, R. J.; MEYER, M. T. Concentrations of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate in ground- and surface-water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001–2006. Scientific Investigations Report 2007-5122. U.S. Geological Survey, Washington, D.C., USA. 121 p., 2007.

SEIGLER, D. S. Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic Publishers: Norwell, MA, p. 759, 1998.

SERA - Syracuse Environmental Research Associates, Inc. 2011. **Glyphosate -Human Health and Ecological Risk Assessment, Final Report**. SERA TR-052-22-03b. Manlius, New York. Disponível em: <http://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/Glyphosate_SERA_TR-052-22-03b.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2012.

SÉRALINI, G. E.; CLAIR, E.; MESNAGE, R.; GRESS, S.; DEFARGE, N.; MALATESTA, M.; HENNEQUIN, D.; DE VENDÔMOIS, J. S. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Food** and Chemical Toxicology, v. 50, n. 11, p. 4221-4231, 2012.

SHAFIK, H. M. Morphological characteristics of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynka) Seenaya et Subba Raju in laboratory cultures. **Acta Biologica Hungarica**, v. 54, n. 1, p. 121-136, 2003.

SHEN, J.; LUO, W. Effects of monosulfuron on growth, photosynthesis, and nitrogenase activity of three nitrogen-fixing cyanobacteria. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 1, p. 34-43, 2010

SILVA-STENICO, M. E.; SILVA, C. S. P.; LORENZI, A. S.; SHISHIDO, T. K.; ETCHEGARAY, A.; LIRA, S. P.; MORAES, L. A. B.; FIORE, M. F. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological Research**, v. 166, p. 161-175, 2011.

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. 2009b. **Importação de glifosato "trava" no país**. Disponível em: http://www.sindag.com.br/ noticia.php?News_ID=1749>. Acesso em: 09 set. 2010.

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. 2012. **Uso de defensivos é intensificado no Brasil**. Disponível em: http://www.sindag.com.br/ noticia.php?News_ID=2278>. Acesso em: 30 out. 2012.

SINGH, D. P.; SANDHU, B. S. Effect of anilofos on growth, photosynthetic pigments and stress enzymes of cyanobacterium *Oscillatoria simplicissima*. **Research Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2010.

SIVONEN, K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2658–2666, 1990.

SKARK, C.; ZULLEI-SEIBERT, N.; SCHÖTTLER, U.; SCHLETT, C. The Occurrence of glyphosate in surface water. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, v. 70, n. 1-4, p. 93-104, 1998.

SMITH, J. L.; BOYER, G. L.; ZIMBA, P. V. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. **Aquaculture**, v. 280, p. 5-20, 2008.

SOARES, M. C. S.; LUERLING, M.; HUSZAR, V. L. M. Growth and temperaturerelated phenotypic plasticity in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Phycological Research**, v. 61, n. 1, p. 61-67, 2013.

SOLOMON, K.; THOMPSON, D. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews, v. 6, n. 3, p. 289-324, 2003.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Absorption, action, and translocation of glyphosate. **Weed Science**, v. 23, p. 235-240, 1975.

SRIBANDITMONGKOL, P.; JUTAVIJITTUM, P.; PONGRAVEEVONGSA, P.; WUNNAPUK, K.; DURONGKADECH, P. Pathological and toxicological findings in glyphosate-surfactant herbicide fatality: A case report. **American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 33, n. 3, p. 234-237, 2012.

STALIKAS, C. D.; PILIDIS G. A. Development of a method for the simultaneous determination of phosphoric and amino acid group containing pesticides by gas chromatography with mass-selective detection: Optimization of the derivatization procedure using an experimental design approach. **Journal of Chromatography A**, v. 872, n. 1-2, p. 215-225, 2000.

STRANGE-HANSEN, R.; HOLM, P. E.; JACOBSEN, O. S.; JACOBSEN, C. S. Sorption, mineralization and mobility of *N*-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate) in five different types of gravel. **Pest Management Science**, v. 60, n. 6, p. 570-578, 2004.

STRAUB, C.; QUILLARDET, P.; VERGALLI, J.; DE MARSAC, N. T.; HUMBERT, J.-F. A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 16208-16208, 2011.

STRUGER, J.; THOMPSON, D.; STAZNIK, B.; MARTIN, P.; MCDANIEL, T.; MARVIN, C. Occurrence of Glyphosate in Surface Waters of Southern Ontario. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, n. 4, p. 378-384, 2008.

STUCKEN, K.; JOHN, U.; CEMBELLA, A.; SOTO-LIEBE, K.; VASQUEZ, M. Impact of Nitrogen Sources on Gene Expression and Toxin Production in the Diazotroph *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 and Non-Diazotroph *Raphidiopsis brookii* D9. **Toxins**, v. 6, n. 6, p. 1896-1915, 2014.

SU, W.; HAGSTRÖM, J.; JIA, Y.; LU, Y.; KONG, F. Effects of rice straw on the cell viability, photosynthesis, and growth of *Microcystis aeruginosa*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 32, n. 1, p. 120-129, 2014.

SUN, Y.; WANG, C.; WEN, Q.; WANG, G.; WANG, H.; QU, Q.; HU, X. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by LC using a new labeling reagent, 4-methoxybenzenesulfonyl fluoride. **Chromatographia**, v. 72, n. 7-8, p. 679-686, 2010.

TANDEAU DE MARSAC, N. T. DE; HOUMARD, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 104, p. 119-190, 1993.

TEIXEIRA, M. G. L. C.; COSTA, M. C. N.; CARVALHO, V. L. P.; PEREIRA, M. S.; HAGE, E. Epidemia de gastroenterite na área da barragem de Itaparica, Bahia. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 114, n. 6, p. 502-511, 1993.

TERAO, K.; OHMORI, S.; IGARASHI, K.; OHTANI, I.; WATANABE, M. F.; HARADA, K. I.; ITO, E.; WATANABE, M. Electron microscopic studies on

experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from the blue-green alga *Umezakia natans*. **Toxicon**, v. 32, p. 833-844, 1994.

TERNAN, N. G.; MC GRATH, J. W.; MC MULLAN, G.; QUINN, J. P. Review: Organophosphonates: Occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 635-647, 1998.

TONK, L.; WELKER, M.; HUISMAN, J.; VISSER, P. M. A Production of cyanopeptolins, anabaenopetins, and microcystins by the harmful cyanobacteria *Anabaena* 90 and *Microcystis* PCC 786. **Harmful Algae**, v. 8, p. 219-224, 2009.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1189-1197, 2003.

TSUJI, M.; AKIYAMA, Y.; YAN, M. Simultaneous determination of glufosinate and its metabolite, and glyphosate in crops. **Analytical Sciences**, v. 13, p. 283-285, 1997.

TSUJI, K., T. WATANUKI, F. KONDO, M. F. WATANABE, S. SUZUKI, H. NAKAZAWA, M. SUZUKI, J. UCHIDA, AND K. I. HARADA. Stability of microcystins from cyanobacteria. II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. **Toxicon**, v. 33, p. 1619-1631, 1995.

TSUNODA, N. Simultaneous determination of the herbicides glyphosate, glufosinate and bialaphos and their metabolites by capillary gas chromatographyion-trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 637, n. 2, p. 167-173, 1993.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1993. **Reregistration Decision Fact Sheet for Glyphosate**. EPA-738-F-93-011. Washington DC. Disponível em: http://www.epa.gov/ oppsrrd1/REDs/ factsheets/0178fact.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2012.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2009. **Problem formulation for the ecological risk and drinking water exposure assessments in support of the registration review of glyphosate and its salts**. Washington DC. Disponível em: http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/glyphosate/index.htm>. Acesso em: 25 nov. 2012.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2012. 2012 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. EPA 822-S-12-001. Washington DC. Disponível em: http://water.epa.gov/drink/contaminants/upload/mcl-2.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2012.

VAN APELDOORN, M. E.; VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J. A.; BAKKER, G. J. I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 1, p. 7-60, 2007.

VAN DER MERWE, R.; HAMMES, F.; LATTEMANN, S.; AMY, G. Flow cytometric assessment of microbial abundance in the near-field area of seawater reverse osmosis concentrate discharge. **Desalination**, v. 343, p. 208-216, 2014.

VAN DIJK, M. A.; GREGORI, G.; HOOGVELD, H. L.; RIJKEBOER, M.; DENIS, M.; MALKASSIAN, A.; GONS, H. J. Optimizing the setup of a flow cytometric cell sorter for efficient quantitative sorting of long filamentous cyanobacteria. **Cytometry A**, v. 77, n. 10, p. 911-924, 2010.

VASILUK, L.; PINTO, L. J.; MOORE, M. M. Oral bioavailability of glyphosate: studies using two intestinal cell lines. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 153-60, 2005.

VEIGA, F.; ZAPATA, J. M.; FERNANDEZ MARCOS, M. L.; ALVAREZ, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. **Science of the Total Environment**, v. 271, n. 1–3, p. 135-144, 2001.

VERA, M.; DI FIORI, E.; LAGOMARSINO, L.; SINISTRO, R.; ESCARAY, R.; IUMMATO, M.; JUÁREZ, A.; RÍOS DE MOLINA, M.; TELL, G.; PIZARRO, H. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor on freshwater microbial communities. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 7, p. 1805-1816, 2012.

VERA, M.; LAGOMARSINO, L.; SYLVESTER, M.; PÉREZ, G. L.; RODRÍGUEZ, P.; MUGNI, H.; SINISTRO, R.; FERRARO, M.; BONETTO, C.; ZAGARESE, H.; PIZARRO, H. New evidences of Roundup[®] (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 710-721, 2010.

VEREECKEN, H. Mobility and leaching of glyphosate: a review. **Pest Management Science**, v. 61, n. 12, p. 1139-1151, 2005.

VILA-AIUB, M. M.; VIDAL, R. A.; BALBI, M. C.; GUNDEL, P. E.; TRUCCO, F.; GHERSA C. M. Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 366-371, 2008.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4th ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

VREEKEN, R. J.; SPEKSNIJDER, P.; BOBELDIJK-PASTOROVA, I.; NOIJ. T. H. M. Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 794, n. 1-2, p. 187-199, 1998.

WAGNER, R.; WETZEL, S. J.; KERN, J.; KINGSTON, H. M. S. Improved sample preparation of glyphosate and methylphosphonic acid by EPA method 6800A and time-of-flight mass spectrometry using novel solid-phase extraction. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 2, p. 147-154, 2012.

WALSH, L. P.; MCCORMICK, C.; MARTIN, C.; STOCCO, D. M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769-776, 2000.

WELKER, M.; MARSALEK, B.; SEJNOHOVA, L.; VON DOEHREN, H. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. **Peptides**, v. 27, p. 2090-2103, 2006.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30 p. 530-563, 2006.

WESTER, R.C.; MELENDRES, J.; SARASON, R.; MCMASTER, J.; MAIBACH, H. I. Glyphosate skin binding, absorption, residual tissue distribution, and skin decontamination. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 16, n. 4, p. 725-732, 1991.

WHITON, B.A., POTTS, M. (eds.) **The ecology of Cyanobacteria: their diversity in time and space**. Kluwer Academic Publihers, Dordrecht, The Netherlands. 145p., 2000.

WHO - World Health Organization. 1994. **Glyphosate. Environmental Health Criteria 159**. 177 p.

WHO/FAO - World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. **Pesticides residues in food - Report 2013**. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticides Residues. Geneva, Switzerland, 17-26 Sep. 2013. FAO Plant Production and Protection Paper 219. Rome, 2014. Disponível em: http://www.fao.org/3/a-i3518e.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2015.

WIEDNER, C.; RÜCKER, J.; BRÜGGEMANN, R.; NIXDORF, B. Climate changes affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. **Oecologia**, v. 153, n. 3, p. 473-48, 2007.

WIEDNER, C.; VISSER, P.M.; FASTNER, J.; METCALF, J.S.; CODD, G.A.; MUR, L.R. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1475-1481, 2003.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, n. 3, p. 201-218, 2005.

WIESE, M.; D'AGOSTINO, P. M.; MIHALI, T. K.; MOFFITT, M. C.; NEILAN, B. A. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. **Marine Drugs**, v. 8, n. 7, p. 2185-2211, 2010.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for

humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WILLIAMS, A. L.; WATSON, R. E.; DESESSO, J. M. Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: A critical analysis. Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews, v. 15, n. 1, p. 39-96, 2012.

WIMMER, K. M.; STRANGMAN, W. K.; WRIGHT, J. L. C. 7-Deoxy-desulfocylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Harmful Algae**, v. 37, p. 203-206, 2014.

WOOD, S. A.; POCHON, X.; LUTTRINGER-PLU, L.; VANT, B. N.; HAMILTON, D. P. Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. **Harmful Algae**, v. 39, p. 64-74, 2014.

WONG, P. K. Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. **Chemosphere**, v. 41, n. 1-2, p. 177-182, 2000.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Efeito do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. **International Plant Nutrition Institute**. Encarte técnico: Informações Agronômicas, n. 119, 32 p., 2007.

YAMAMOTO, Y.; SHIAH, F.-K. Growth, trichome size and akinete production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) under different temperatures: Comparison of two strains isolated from the same pond. **Phycological Research**, v. 62, n. 2, p. 147-152, 2014.

YUAN, M.; NAMIKOSHI, M.; OTSUKI, A.; RINEHART, K. L.; SIVONEN, K.; WATANABE, M. F. Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 34, p. 33-43, 1999.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. 478 p.

ZELAYA, I. A.; ANDERSON, J. A. H.; OWEN, M. D. K.; LANDES, R. D. Evaluation of spectrophotometric and HPLC methods for shikimic acid determination in plants: Models in glyphosate-resistant and -susceptible crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2202-2212, 2011.

ZOUAOUI, K.; DULAURENT, S.; GAULIER, J. M.; MOESCH, C.; LACHÂTRE, G. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. **Forensic Science International**, v. 226, n. 1–3, p. e20-e25, 2013.

ANEXO 1

Produto	Ingrediente Ativo (Grupo Químico)	Titular de Registro	Formulação	Classe Toxicológica	Classe Ambiental
Alteza	Glifosato (GS) + Imazetapir (Imidazolinona)	BASF SA	SL	111	
Alteza 30	Glifosato (GS) + Imazetapir (Imidazolinona)	BASF SA	SL	II	III
Alteza 30 SL	Glifosato (GS) + Imazetapir (Imidazolinona)	BASF SA	SL	III	II
Credit	Glifosato (GS)	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica SA	SL	III	III
Fera	Glifosato (GS)	FMC Química do Brasil Ltda	SL	111	III
Gillanex	Glifosato (GS)	Adama Brasil SA	SC	IV	III
Gli Over	Glifosato (GS)	Iharabras SA Indústria Química	SL	111	III
Gliato	Glifosato (GS)	Prentiss Química Ltda	SL	II	III
Glifos	Glifosato (GS)	Cheminova Brasil Ltda	SL	II	III
Glifos Plus	Glifosato (GS)	Cheminova Brasil Ltda	SL	111	III
Glifosato Atar	Glifosato (GS)	Atar do Brasil Defensivos Agrícolas Ltda	SL	III	III
Glifosato Atar 48	Glifosato (GS)	Atar do Brasil Defensivos Agrícolas Ltda	SL	111	III
Glifosato CCAB 480 SL	Glifosato (GS)	CCAB Agro SA	SL	II	III
Glifosato Fersol 480.	Glifosato (GS)	Ameribrás Indústria e Comércio Ltda	SL	III	III
Glifosato Nortox	Glifosato (GS)	Nortox SA	SL	III	III
Glifosato Nortox WG	Glifosato (GS) + Glifosato-sal de amônio (GS)	Nortox SA	WG	IV	III
Glifosato Nortox 480 SL	Glifosato (GS)	Nortox SA	SL	111	III
Glifosato Nutritop	Glifosato (GS)	Cropchem Ltda	SL		III
					o <i>i</i> :

Produtos formulados registrados no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Continua

Produto	Ingrediente Ativo (Grupo Químico)	Titular de Registro	Formulação	Classe Toxicológica	Classe Ambiental
Glifosato Zamba	Glifosato (GS)	Atanor do Brasil Ltda	SL	III	
Glifosato 480 Agripec	Glifosato (GS)	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica SA	SL	II	
Glifosato 480 Helm	Glifosato (GS)	Helm do Brasil Mercantil Ltda	SL	IV	
Glifoxin	Glifosato (GS)	Helm do Brasil Mercantil Ltda	SL	III	
Gliphogan 480	Glifosato (GS)	Adama Brasil SA	SL	III	
Gliz 480 SL	Glifosato (GS)	Dow Agrosciences Industrial Ltda	SL		III
Glizmax NF	Glifosato (GS)	Dow Agrosciences Industrial Ltda	SL		
Glydur	Diurom (Ureia) + Glifosato (GS)	Adama Brasil SA	SC		11
GLYOX	Glifosato (GS)	Nortox SA	SL	IV	
Glyphotal	Glifosato (GS)	UPL do Brasil Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários SA	SL	II	III
Glyphotal TR	Glifosato (GS)	UPL do Brasil Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários SA	SL	II	III
Glyweed	Glifosato (GS)	Sabero Organics America SA	SL	I	III
Grassato	Glifosato (GS)	Disam Distribuidora de Insumos Agr. Sul América Ltda	SL	II	III
Grassato SL	Glifosato (GS)	Alamos do Brasil	SL	II	III
Grassato 480 SL	Glifosato (GS)	Allierbrasil Agro Ltda	SL	II	III
Mademato	Glifosato (GS)	Industria Quimica Dipil Ltda	SL	I	
ONESHOT	Glifosato (GS) + Imazaquim (Imidazolinona)	BASF SA	SL	I	III
Pilarsato	Glifosato (GS)	Pilarquim BR Comercial Ltda	SL	I	
Pocco 480 SL	Glifosato (GS)	Consagro Agroquímica Ltda	SL		
Polaris	Glifosato (GS)	Du Pont do Brasil SA	SL	IV	

186

Continua
Produto	Ingrediente Ativo (Grupo Químico)	Titular de Registro	Formulação	Classe Toxicológica	Classe Ambiental
Preciso	Glifosato (GS)	Consagro Agroquímica Ltda	WG		
Pretorian	Glifosato (GS)	Atanor do Brasil Ltda	SL	III	III
Radar WG	Glifosato (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	WG	III	III
Rodeo	Glifosato (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	SL	IV	III
Ronat-A	Glifosato (GS)	Atanor do Brasil Ltda	SL	111	III
Rustler	Glifosato (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	SL	III	III
Sequence	Glifosato (GS) + S-Metolacloro (Cloroacetanilida)	Syngenta Proteção de Cultivos Ltda	EW	I	Ш
Shadow 480 SL	Glifosato (GS)	Consagro Agroquímica Ltda	SL	III	III
Stinger	Glifosato (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	SL	IV	III
Sucession	Glifosato (GS) + Metolacloro (Cloroacetanilida)	Syngenta Proteção de Cultivos Ltda	EW	I	II
Tropazin	Glifosato (GS) + Simazina (Triazina)	Adama Brasil SA	SC	I	II
Tropuron	Diurom (Ureia) + Glifosato (GS)	Adama Brasil SA	SC	III	II
Direct	Glifosato-sal de amônio (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	WG	III	III
Glifosato Agripec 720 WG	Glifosato-sal de amônio (GS)	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica SA	WG	II	III
Glifosato Nortox WG	Glifosato (GS) + Glifosato-sal de amônio (GS)	Nortox SA	WG	IV	III
Roundup Ultra	Glifosato-sal de amônio (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	WG	II	III
Roundup WG	Glifosato-sal de amônio (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	WG	III	III
SCOUT	Glifosato-sal de amônio (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	WG	111	III
Roundup Original DI	Glifosato-sal de diamônio (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	SL	II	III
Crucial	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS) + Glifosato- sal de Potássio (GS)	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica SA	SL	Ι	111
Glifosato Atanor	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Atanor do Brasil Ltda	SL		III
Glifosato Atanor 48	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Atanor do Brasil Ltda	SL	III	III

Continua

Produto	Ingrediente Ativo (Grupo Químico)	Titular de Registro	Formulação	Classe Toxicológica	Classe Ambiental
Glifosato Nortox 480 BR	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Nortox SA	SL		
Glifosato Nufarm	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica SA	SL	II	III
Glifosato 408 SL Sinon	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Sinon do Brasil Ltda	SL	II	III
Glister	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Sinon do Brasil Ltda	SL	II	III
GLI-UP 480 SL	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Cropchem Ltda	SL	III	III
Gliz Plus	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Dow Agrosciences Industrial Ltda	SL	II	III
Glizmax	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Dow Agrosciences Industrial Ltda	SL	II	III
Radar	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	SL		III
Roundup Original	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	SL		III
Roundup Ready	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	SL	II	
Roundup Ready Milho	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	SL	II	III
Roundup Transorb	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	SL	II	III
Sumô	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Pilarquim BR Comercial Ltda	SL		III
Tradicional	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Du Pont do Brasil SA	SL		III
Тгор	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS)	Adama Brasil SA	SL		III
Crucial	Glifosato-sal de Isopropilamina (GS) + Glifosato- sal de Potássio (GS)	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica SA	SL	I	III
Roundup Transorb R	Glifosato-sal de Potássio (GS)	Monsanto do Brasil Ltda	SL	II	III
Touchdown	Glifosato-sal de Potássio (GS)	Syngenta Proteção de Cultivos Ltda	SL		III
Zapp QI 620	Glifosato-sal de Potássio (GS)	Syngenta Proteção de Cultivos Ltda	SL		

GS: Glicina substituída; SL: Concentrado solúvel; SC: suspensão concentrada; WG: granulado dispersível; EW: emulsão óleo em água

ARTIGO PUBLICADO

CARNEIRO, R. L., DÖRR, F. A., DÖRR, F., BORTOLI, S., DELHERBE, N., VÁSQUEZ, M. AND PINTO, E. Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 3, p. 692–702, 2012. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01439.



Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp.

Ronaldo Leal Carneiro¹, Felipe Augusto Dörr¹, Fabiane Dörr¹, Stella Bortoli¹, Nathalie Delherbe², Mónica Vásquez² & Ernani Pinto¹

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; and ²Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

Correspondence: Ernani Pinto, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 3091 2192; fax: +55 11 3031 9055; e-mail: ernani@usp.br

Received 1 April 2012; revised 7 June 2012; accepted 25 June 2012. Final version published online 30 July 2012.

DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01439.x

Editor: Riks Laanbroek

Keywords

cyanobacteria; microcystins; microginins; protease inhibitors; mass spectrometry; Q-TOF.

Introduction

Microcystis species are the most common bloom-forming cyanobacteria worldwide. They represent significant health concerns because of an increasing bloom frequency prediction and because of their ability to produce microcystins (Rouco *et al.*, 2011). Microcystins are cyclic heptapeptides and comprise a diverse group containing around 90 structurally similar congeners (Pearson *et al.*, 2010). These hepatotoxins are potent inhibitors of protein phosphatases from the serine/threonine family (types 1 and 2A) in eukaryotic organisms (Runnegar *et al.*, 1995).

In addition to toxins, cyanobacteria species are able to synthesize numerous other bioactive compounds (Singh *et al.*, 2005; Welker *et al.*, 2006; Cardozo *et al.*, 2007; Gademann & Portmann, 2008). Most of these secondary metabolites are oligopeptides containing unusual amino acids in their composition (Welker *et al.*, 2006). These unique peptides are presumably assembled by nonribosomal peptide synthetase (NRPS) or NRPS/polyketide

Abstract

Species of *Microcystis* are the most common bloom-forming cyanobacteria in several countries. Despite extensive studies regarding the production of bioactive cyanopeptides in this genus, there are limited data on isolated strains from Brazil. Three Microcystis sp. strains were isolated from the Salto Grande Reservoir (LTPNA01, 08 and 09) and investigated for the presence of mcy genes, microcystins and other cyanopeptides. Microcystin and microginin production was confirmed in two isolates using high-resolution tandem mass spectrometry after electrospray ionization (ESI-Q-TOF), and the structures of two new microginin congeners were proposed (MG756 Ahda-Val-Leu-Hty-Tyr and MG770 MeAhda-Val-Leu-Hty-Tyr). The biosynthesis profile of the identified cyanopeptides was evaluated at different growth phases via a newly developed HPLC-UV method. Results demonstrated no substantial differences in the production of microcystins and microginins after data normalization to cell quota, suggesting a constitutive biosynthesis. This study represents the first confirmed co-production of microginins and microcystins in Brazilian strains of Microcystis sp. and highlights the potential of Brazilian cyanobacteria as a source of natural compounds with pharmaceutical interest.

> synthetase (PKS) hybrid pathways and present a considerable array of biological activities (Welker & von Dohren, 2006). Among these activities, protease inhibition appears to be a common feature for several oligopeptides, such as the anabaenopeptins (cyclic hexapeptides) (Harada *et al.*, 1995; Murakami *et al.*, 1997; Erhard *et al.*, 1999) and the microginins (linear peptides) (Okino *et al.*, 1993; Ishida *et al.*, 1997, 1998, 2000).

> The microginins are a peptide group consisting of more than 30 variants described in *Microcystis* strains or field samples. These linear peptides vary from four to six amino acids and usually present a decanoic acid derivative (Ahda; 3-amino-2-hydroxy-decanoic acid) at the *N*-terminus (Welker & von Dohren, 2006). Microginins are renowned inhibitors of the angiotensin-converting enzyme (ACE) (Okino *et al.*, 1993; Neumann *et al.*, 1997) and represent great interest as target compounds in the discovery of novel antihypertensive agents.

> Several Brazilian strains of *Microcystis* have been investigated for the production of microcystins. However,

there have been few reports documenting the co-occurrence of other bioactive peptides. Carvalho *et al.*(2008) described a cyanobacterial bloom in a southern Brazilian reservoir with *Microcystis protocystis* and *Sphaerocavum* cf. *brasiliensis* as the dominant species. The authors confirmed the presence of MC-RR, MC-LR, anabaenopeptin B, and anabaenopeptin F. Recently, Silva-Stenico *et al.* (2011) screened Brazilian cyanobacterial isolates for the production of antimicrobial agents. The authors described putative microginin peptides in two *Microcystis* strains but further structure confirmation is required. In spite of these reports, the assessment of Brazilian cyanobacteria as a source of natural compounds with pharmaceutical potential is still interesting, especially when the substantial array of biological activities attributed to oligopeptides is considered.

In this study, the production of microcystin and cyanopeptides in three Brazilian strains of *Microcystis* was investigated. The co-occurrence of microcystins and microginins in cyanobacteria isolated from the Salto Grande Reservoir in southeast Brazil is demonstrated, and the structures of two new microginin congeners are proposed (MG756 Ahda-Val-Leu-Hty-Tyr and MG770 MeAhda-Val-Leu-Hty-Tyr). Additionally, the analysis of the cyanopeptide biosynthesis profiles at various stages of growth revealed a constitutive production, providing valuable information concerning the cell harvesting period when biomass production and isolation of active compounds are intended.

Materials and methods

Isolation and strain selection

The Salto Grande Reservoir is located in Americana City in the São Paulo State (22°45'40" S and 47°09'15" W). Water samples were collected in 2007, and microscopic observations revealed the presence of Microcystis spp. colonies (primarily M. protocystis and Microcystis aeruginosa) (Kómarek & Anagnostidis, 1999). The samples were inoculated onto plates containing solidified ASM-1 medium in 1% agar (Gorham et al., 1964). Isolated colonies were transferred to liquid ASM-1 medium and incorporated into the culture collection of the Laboratory of Toxins and Natural Products of Algae (LPTNA-University of São Paulo). In addition to microscopic observations, the fact that the isolated strains never formed colonies in culturing conditions supported their classification as Microcystis sp. The isolated strains LPTNA01, LTPNA08, and LTPNA09 were selected for use in this study.

Maintenance and growth evaluation

Strains were maintained in ASM-1 medium at 24 ± 2 °C, with a 14 : 10-h light/dark cycle and photon flux of

40 μ mol photons m⁻² s⁻¹. Light was measured with a quanta sensor (QSL-2101 - Biospherical Instruments Inc.). To evaluate growth, a few milliliters of maintenance cultures from each strain (15 days of culture) were inoculated in Erlenmeyer flasks (2 L) containing 1.5 L of ASM-1 medium at an initial concentration of 10^4 cells mL⁻¹. Each strain was cultured in triplicate. Several milliliters were harvested every 3 days under sterilized conditions to evaluate cell growth using a Fuchs-Rosenthal hemocytometer under light microscopy. To determine the exponential growth period, exponential regressions were applied to the cell count data vs. sampling time. Duration of the exponential growth phase was considered when data adherence was higher than 98% ($r^2 \ge 0.98$). Growth rates were calculated according to Reynolds (2006) using the exponential regression formula $N = N_0^{\text{rn} \cdot t}$, where N is the number of cells at time t, N_0 is the initial number of

DNA extraction and PCR amplification

cells, and rn is the growth rate.

Genomic DNA was extracted from 20 mL of fresh cyanobacterial cultures from each strain using the CTAB method described by Ausubel *et al.* (1990). All PCR were performed in a Techne TC-312 thermocycler (Duxford Cambridge[®], UK) in a 30- μ L reaction mixture containing 1 μ L genomic DNA, 3 mL 1× PCR buffer, 0.9 μ L 1.5 mM MgCl₂, 1.5 μ L 0.5 mM of dNTPs, 0.25 μ L recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen[®], Brazil), 1.5 μ L 0.5 μ M (each) primer and PCR quality water (Apiroflex[®]; Sanderson Laboratory S.A., Chile).

Three fragments of *mcy* gene clusters were amplified (*mcy*A-cd, *mcy*AB and *mcy*B) with the primers described in Table 1 (Valerio *et al.*, 2010). Temperature cycling was performed at 94 °C for 5 min, 30 cycles at 94 °C for 1 min, annealing temperature at 50 °C for 1 min and 72 °C for 50 s, with a final extension step at 72 °C for 10 min. The aminotransferase domain of the *mcy*E (*mcy*E-AMT) was amplified (Table 1) with (GC-) HEPF and HEPR primers (Jungblut & Neilan, 2006). Preincubation was performed at 94 °C for 2 min, and a total of 35 cycles were performed at 94 °C for 50 s. Annealing temperatures of 52 °C for 1 min and 72 °C for 1 min were used. The temperature cycling was concluded with a final step at 72 °C for 10 min.

Cyanopeptide identification

Cellular material was obtained from cultures after centrifugation and lyophilization of the pellet. Fifty milligrams of dried cells from each strain were extracted with 5 mL aqueous 90% methanol in an ultrasonic bath (37 kHz) for 5 min. The samples were kept at room temperature

Gene	Primer	Sequence	Amplification product (pb)	Reference
mcy A	cd 1 F cd 1 R	5'-AAAATTAAAAGCCGTATCAAA-3' 5'-AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT-3'	300	Hisbergues <i>et al.</i> (2003)
тсу В	2156 F 311 R	5'-ATCACTTCAATCTAACGACT-3' 5'-AGTTGCTGCTGTAAGAAA-3'	955	Mikalsen <i>et al.</i> (2003)
mcy a-b	135 F 676 R	5'-GACTTATAGCCATCTCATCT-3' 5'-TTGACGCTCTGTTTGTAA-3'	541	Mikalsen <i>et al.</i> (2003)
mcy E	HEP F HEP R	5'-TTTGGGGTTAACTTTTTTGGGCATAGTC-3' 5'-AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT-3'	472	Jungblut & Neilan (2006)

Table 1. PCR sequencing primers and amplification product size

for 2 h with periodic agitation. The material was centrifuged at 10 000 g for 25 min at 4 °C. The supernatant was collected, filtered on 0.45 μ m PVDF filters (Millipore), and stored at -80 °C until analysis.

Analyses were performed in a Shimadzu Prominence liquid chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled with an electrospray source to a quadrupole timeof-flight instrument (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics, MA). Separation was achieved in a Fusion-RP column $(4 \ \mu m, 150 \times 2.0 \ mm;$ Phenomenex, Torrance, CA) at 200 μ L min⁻¹ using a linear gradient elution (10–60% B in 30 min). The mobile phases used were (A) water containing 5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid, and (B) acetonitrile. The column effluent was split (1:5) before entering the mass spectrometer source, which was operated in the positive mode (3500 V). Nitrogen was used as nebulizing (35 psi) and drying gas (5 L min⁻¹ at 200 °C). Argon was employed as a collision gas (35% normalized flow rate). The equipment was calibrated with a commercial standard solution (Agilent TuneMix Low; Agilents). Survey scans were performed from m/z 100 to 2000 before selecting a precursor ion for collision-induced dissociation (CID). Product ion spectra were inspected to determine the amino acid sequences. All solvents used were HPLC grade or higher.

Biosynthesis profiles of microcystins and microginins

Experimental cultures were sampled every 3 days in the middle of the day because of the reportedly higher production of cyanotoxins during this period (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2005; Carneiro *et al.*, 2009). Briefly, 200 mL of culture samples were filtered on glass fiber filters (Millipore) and the cell-containing filters stored at -80 °C until analyses. Extractions were performed as previously described by replacing the dried cellular material with the filters.

Considering that the classic method reported by Lawton *et al.* (1994) was unable to reliably separate

microcystins and microginins in our samples, a new chromatographic method was implemented to adequately separate these peptides. Different gradient elution profiles were tested using phosphoric acid as mobile phase additive in water (A) at a final concentration of 0.08%. The best peak resolution was obtained with a linear gradient from 10% to 50% B (acetonitrile) in 40 min (Supporting Information, Table S1). Analyses were carried out in a Shimadzu Prominence system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a LC-20AT quaternary pump and a SPD-M20A photodiode array detector. Separation was achieved in a Luna C18(2) column (5 μ m, 250 \times 4.6 mm; Phenomenex) at 1.0 mL min⁻¹. Microcystins were quantified by peak area at 238 nm using a calibration curve constructed with standard solutions of MC-RR and MC-LR (Sigma-Aldrich). Calculated detection limits were 15 ng to MC-RR ($r^2 = 0.9997$) and 31 ng to MC-LR $(r^2 = 0.9995)$. Because of the lack of analytical standards, microginins were quantified as MC-LR equivalents by peak area at 225 nm using a calibration curve of MC-LR monitored at this wavelength ($r^2 = 0.9991$). As the absorption coefficients of microginins and microcystins at 225 nm are likely different, the quantitative results here obtained are estimates of the true microginin concentration. Nevertheless, these results are suitable to assess the relative changes in microginin production at different growth phases (Tonk et al., 2009). All data are corrected to cell count and hence presented as cell quotas (fg per cell).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean values \pm standard deviation (SD). Data for each experimental variable were tested for normality, and differences between the standard deviations were determined using the Kolmogorov–Smirnov test and Barlett's test, respectively. An ANOVA was performed using the Kruskal–Wallis (KW) test followed by Dunn's *post hoc* test. All tests were performed with a significance of 95% (P < 0.05) using the STATISTICA for Windows (v9.0) application.

Results

Growth evaluation

Microcystis sp. cells under test conditions grew exponentially until the sixth day of culture (LPTNA01, $r^2 = 0.9834 \pm 0.002$; LTPNA08, $r^2 = 0.9897 \pm 0.011$; LTPNA09, $r^2 = 0.9876 \pm 0.051$). The growth rate of LTPNA01 (rn = 0.9183 \pm 0.003) was higher than the growth rates of LTPNA08 (rn = 0.8059 \pm 0.012) and LPTNA09 (rn = 0.8111 \pm 0.031) (Dunn test, P < 0.001) (Fig. 1).

Genetic analyses and peptide identification

The key marker genes (*mcy*A, *mcy*B, *mcy* a-b, and *mcy*E) of the toxigenic *mcy* cluster were amplified in the LTPNA08 and LTPNA09 strains but not in LTPNA01. These results indicate that LTPNA08 and LTPNA09 are able to synthesize microcystins, which was confirmed by mass spectrometry analyses.

A representative chromatogram of the LTPNA08 extract is depicted in Fig. 2, with the mass spectra of the major peptides identified. Mass spectra typical of microcystins were obtained for fractions 1 and 4. These compounds were identified as MC-RR (m/z 519.8) and MC-LR (m/z 995.5), respectively. In both spectra, the characteristic product ion at m/z 135 is observed. This product ion originates from the alpha cleavage of the lateral chain of the Adda residue and is considered diagnostic of the general structure of microcystins. The identity of fractions 1 and 4 was further confirmed via co-chromatography with commercial standards of MC-RR and



Fig. 1. Growth curves of *Microcystis* sp. isolated from the Salto Grande Reservoir in Southern Brazil. Error bars represent the standard deviation (n = 3).

MC-LR. Low-intensity ions typical of MC-YR (m/z 1045.5), MC-FR (m/z 1029.5), and MC-WR (m/z 1068.5) were also observed in the LTPNA08 and LTPNA09 strains (< 2% of total microcystins). Although the low intensity of these ions prevented the acquisition of adequate product ion spectra, in-source CID experiments showed ions at m/z 135 and neutral losses of 134 Da. These results strongly suggest that other microcystin isoforms are synthesized at low levels besides the major congeners MC-RR and MC-LR.

Product ion spectra of m/z 756.5 (fraction 2) and m/z770.5 (fraction 3) contain ions at m/z 128 and m/z 142, respectively (Fig. 2). These ions are characteristic to the general structure of microginins and originate from bond dissociation between C2 and C3 in the N-terminal residue 3-amino-2-hydroxydecanoic acid (Ahda) (Fig. 3). N-terminal methylation is a common occurrence and accounts for the product ion at m/z 142 (Welker *et al.*, 2006). Further ion assignment based on accurate mass measurements allowed the identification of the b and y ion series for both fractions (Fig. 3). As a result, we propose the sequences of two new microginin congeners: Ahda-Val-Leu-HTy-Tyr (MG756) and MeAhda-Val-Leu-HTy-Tyr (MG770). Interestingly, cell extracts from LTPNA09 and LTPNA08 provided similar chromatographic profiles, indicating that these isolates are clones of the same strain. As expected, no microcystin congeners could be identified in LTPNA01.

Microcystins and microginins biosynthesis profiles

Initial analyses of the extract from LTPNA08 using the method of Lawton *et al.* (1994) provided a nonconforming UV spectrum at the retention time corresponding to MC-LR (Fig. 4). The second absorption maximum observed at 278 nm suggests the co-elution of MC-LR with a microginin congener. Although different gradient profiles were tested using trifluoroacetic acid, reliable separation could not be achieved. However, the replacement of trifluoroacetic acid by phosphoric acid as the mobile phase additive in A (0.08% in ultrapure water) provided satisfactory separation. As shown in Fig. 5, a linear gradient from 10% to 50% acetonitrile in 40 min provided the best resolution between the peaks (Table S1).

The developed method was employed to monitor cyanopeptide production at different phases of growth. Microcystin total concentration varied from 30.2 to 53.9 fg per cell in LTPNA08 and from 20.9 to 30.8 fg per cell in LTPNA09 during the sampling period. As mentioned before, microginins were quantified as MC-LR equivalents at 225 nm. Total concentration of 696



Fig. 2. LC-MS base peak chromatogram for the LTPNA08 strain. (1) Product ion spectrum of *m*/*z* 518.9 (MC-RR); (2) Product ion spectrum of *m*/*z* 756.5 (MG756); (3) Product ion spectrum of *m*/*z* 770.5 (MG770); (4) Product ion spectrum of *m*/*z* 995.5 (MC-LR). *Unknown peptide.

these peptides ranged from 14.0 to 23.4 fg per cell in LTPNA08 and from 11.3 to 26.5 fg per cell in LTPNA09. As can be seen in Fig. 6, no significant varia-

tions are observed in total microcystins or microginins production during growth or between the two strains (KW test, P > 0.05).



Fig. 3. Proposed structures of MG756 and MG770 with ion assignments and sequence interpretations.

Discussion

Microcystis spp. blooms have been reported frequently in several Brazilian environments as reviewed by Dörr et al. (2010). In the State of São Paulo, for example, the eutrophicated reservoirs Guarapiranga and Billings are recurrently affected by toxic outbreaks of M. aeruginosa and Microcystis panniformis (Sant'Anna & Azevedo, 2000; Anjos et al., 2006; Frias et al., 2006; Moschini-Carlos et al., 2009; Silva-Stenico et al., 2011). The three Microcystis spp. strains used in this study were isolated from the Salto Grande Reservoir, which is located in the city of Americana, São Paulo State. This eutrophicated reservoir is intensively used for recreational activities, and previous reports have documented the occurrence of toxic Microcystis spp. blooms (Bittencourt-Oliveira, 2003). Despite several Brazilian strains of Microcystis have been investigated for the production of microcystins, few studies have explored the production of other cyanopeptides. Congeners of cyanopeptolins, aeruginosins, micropeptins, anabaenopeptins, and aeruginosides from twelve strains were recently described as putative cyanopeptides (Silva-Stenico et al., 2011). The authors also described putative microginins from the Brazilian Microcystis strains NPCD-1 and SPC804. In agreement with these observations, the strains LTPNA08 and LTPNA09 were characterized as microginin and microcystin producers.

Microcystins are synthesized non-ribosomally by large multienzyme complexes that comprise different modules: NRPS, PKS, and mixed peptide/polyketide synthases (Jungblut & Neilan, 2006). The microcystin biosynthesis gene cluster (*mcy*) spans 55 kb and is arranged as 10 genes that form two cross-transcribed operons, *mcy*A-C and *mcy*D-J (Pearson & Neilan, 2008). This gene cluster



Fig. 4. HPLC-DAD representative chromatogram for the LTPNA09 strain using the method of Lawton *et al.* (1994) (a) and the UV spectra of different microcystins (b). The typical UV absorbance spectrum of MC-RR is shown as well as the unusual spectrum of MC-LR with absorption in 278 nm.

has been sequenced and characterized in various cyanobacterial strains, including Microcystis, Anabaena, and Planktothrix (Pearson et al., 2010). In consequence, genetic analyses to detect the presence of mcy genes in environmental samples can provide rapid identification of a potentially toxic population of cyanobacteria. In general, nontoxic strains do not contain mcy genes and afford negative results, while toxic strains have different mcy copies and provide positive amplifications, especially for mcyE (Vaitomaa et al., 2003). However, caution should be used when interpreting results because there is no clear correlation between the presence of specific genes and the production of microcystins (Vaitomaa et al., 2003; Bittencourt-Oliveira et al., 2011). In our study, mass spectrometry experiments corroborated the genetic analyses results: microcystin congeners were detected only in strains LTPNA08 and LTPNA09.

Although the putative gene cluster for microginin synthesis has been sequenced (Welker et al., 2006; Rounge





et al., 2009), a clear and concise method to evaluate the presence of microginin genes in Microcystis has not been described. Therefore, production of these compounds was investigated only through high accuracy mass spectrometry. Typical product ion spectra of microginins were observed infractions 2 and 3 (Fig. 1) for both LTPN08 and LTPNA09 strains. Interestingly, the mass-to-charge ratio of the precursor ion in fraction 3 (m/z 770.5; Fig. 2) corresponds to a compound with the same molecular formula (C₄₁H₆₃N₅O₉) as microginin 478, a congener already described by Ishida et al. (2000). Microginin 478 contains three N-methylated residues in its sequence MeAhda-Val-MeVal-MeTyr-Tyr. On the basis of this assumption, the downshift of 14 Da in the product ion spectra of the peptide in fraction 2 (Fig. 2) could lead to the identification of a demethylated congener of microginin 478 (m/z 756.5). In this case, MeAhda in the N-terminal position would be replaced by an Ahda residue. However, inspection of the CID spectra for both variants reveals prominent y_1 and y_2 ions at m/z 182 and m/z 359, respectively (Fig. 2). These features are incompatible with the classic model of low-energy bond dissociation for peptides containing N-methylated residues. It is well accepted that N-methyl residues at low-energy CID conditions prevent the formation of y ions through the oxazolone fragmentation pathway because the proton transfer step in the dissociating proton-bound dimer is not permitted (Paizs & Suhai, 2005). As a result, the fixed charge in the oxazolone derivative leads to the exclusive formation of b ions (Fig. S1). It is worth mentioning that direct amide bond dissociation is not favored in lowenergy CID conditions, and the fragmentation pathways involve rearrangement-type reactions (Paizs & Suhai, 2005). Because of the observation of intense y_1 and y_2 ions, we believe that HTy (homotyrosine) and Leu are present in the peptide sequences, replacing MeTvr and MeVal, respectively, in microginin 478. Assignment of a Leu residue is supported by the observation of a weak d_3 ion at m/z 342.3 in the product ion spectra of peptide 3 (Fig. 2). Discrimination of Leu and Ile residues via observation of d ions has been reported previously (Johnson et al., 1988; Baptista-Saidemberg et al., 2011). Additionally, the following characteristic immonium ions were observed: m/z 72.1 for Val, m/z 86.1 for Leu (or MeVal), and m/z 150.1 for HTy (or MeTyr). On the basics of these results, we propose the sequences of the two microginin congeners as Ahda-Val-Leu-HTy-Tyr (MG756) and MeAhda-Val-Leu-HTy-Tyr (MG770) (Fig. 3). To the best of our knowledge, these two identified microginin congeners have not been previously described (Table 2).



Fig. 6. Box plot of microginin and MC variation during the growth of *Microcystis* sp. isolated from the Salto Grande Reservoir. (a) Microginins (756 + 770); (b) Microcystins (RR + LR).

Microginins are interesting molecules because they are able to inhibit enzymes, such as leucine aminopeptidase M and the ACE (Ishida *et al.*, 2000). ACE inhibitors are the most effective treatments for hypertension and congestive heart failure, making microginins interesting candidates for purification, and biological activity evaluation. In this study, initial chromatographic separation efforts using the method of Lawton *et al.* (1994) were unsuccessful (Fig. 4). Therefore, to adequately separate these peptides, a new chromatographic method based on the gradient elution with phosphoric acid as the mobile phase additive was implemented (Fig. 5).

The newly developed method was further employed to assess the biosynthesis profile of microcystins and microginins in strains LTPNA08 and LTPNA09. The evaluation of the peptide content per cell at different stages of growth allows the determination of the most appropriate harvesting period when purification is intended. Our results demonstrate that microcystin and microginin are constitutively produced. In this sense, biomass harvesting can be performed at any time during the growth period evaluated.

Associations between growth and MC production in Microcystis strains are common in the literature. During different phases of growth, the MC content can be quite variable (Wiedner et al., 2003). Changes in the production of different MC variants were verified at different growth phases in M. aeruginosa under batch culture conditions (Lyck, 2004). However, changes in microginin production during the growth phases of Microcystis strains have not been well studied. In Anabaena, production of anabaenopeptins and anabaenopeptilides varied according to the age of the cultures. The highest MC concentrations were observed in the middle of the growth phase, whereas the highest anabaenopeptin and anabaenopeptilide concentrations were observed at the stationary phase (Repka et al., 2004). In this study, microcystin and microginin production by the LTPNA08 and LTPNA09 strains under test conditions did not change during the different growth phases and did not differ between the two lineages (Dunn test, P > 0.05).

The cell harvesting for these analyses was performed always at the middle of the day. As previously reported, microcystins can vary threefold at the middle of the day in comparison with dark periods (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2005). Other cyanotoxins as paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins can vary from 2- to 4.5-fold from the first hours of light to the middle of the day (Carneiro *et al.*, 2009).

Most of the knowledge regarding the function of cyanotoxins has focused on microcystins. The original hypothesis was that microcystins may have an ecological function that protects cyanobacteria against grazing and suppression of light competitors (Rohrlack *et al.*, 1999; Babica *et al.*, 2007). Zilliges *et al.*. (2011) recently showed that microcystins bind to a number of proteins involved in basal metabolism and that the binding is strongly enhanced under high light and oxidative stress conditions. These observations led to the hypotheses that MC-protein interactions are responsible for the increased fitness of *Microcystis* in high light conditions.

In addition to the hepatotoxic microcystins, several other families of peptides have been identified from *Microcystis* and other genera of cyanobacteria. Because the biosynthesis of secondary metabolites, such as microcystins, aeruginosin, and cyanopeptolin, primarily occurs during the light period of the day, these metabolites may interact with molecules related to diurnal central metabolism (Straub *et al.*, 2011). Microginins may have a similar role and function. However, the relevance to the coproduction of toxic and nontoxic peptides in cyanobacteria requires further investigation.

Table 2. Amino acid sequence of microginins (MG) congeners

		Amino acid sequence*							
Mass [M + H]	MG	1	2	3	4	5	6	Reference	
575.36	91-A	ClAhda	lle	MeLeu	Pro	_	_	Ishida <i>et al.</i> (2000)	
585.30	AL584	ClAhda	Ala	MeVal	Tyr	_	_	Gesner-Apter & Carmeli (2008)	
609.32	91-B	Cl ₂ Ahda	lle	MeLeu	Pro	_	_	Ishida <i>et al.</i> (2000)	
698.38	T2	Ahda	Ala	Pro	Tyr	Tyr	_	Kodani <i>et al.</i> (1999)	
704.46	91-C	Ahda	lle	MeLeu	Pro	Tyr	_	Ishida <i>et al.</i> (2000)	
712.39	711	Ahda	Hty	Ala	Pro	Tyr	_	Welker <i>et al.</i> (2006)	
714.26	MG	Ahda	Ala	Val	MeTyr	Tyr	_	Okino <i>et al.</i> (1993)	
726.41	FR5	Ahda	Val	Pro	Tyr	Tyr	-	Welker <i>et al.</i> (2006)	
727	FR1	Ahda	Ala	MeLeu	Tyr	Tyr	_	Welker <i>et al.</i> (2006)	
728.39	FR3	Ahda	Thr	Pro	Tyr	Tyr	_	Welker <i>et al.</i> (2006)	
728.41	Cyanostatin A	Ahda	Ala	Val	MeTyr	Hty	_	Sano <i>et al.</i> (2005)	
732	T1	ClAhda	Ala	Pro	Tyr	Tyr	_	Kodani <i>et al.</i> (1999)	
738.42	91-D	ClAhda	lle	MeLeu	Pro	Tyr	_	Ishida <i>et al.</i> (2000)	
740.42	FR6	MeAhda	Val	Pro	Tyr	Tyr	_	Welker <i>et al.</i> (2006)	
742.40	FR4	MeAhda	Thr	Pro	Tyr	Tyr	_	Welker <i>et al.</i> (2006)	
751.40	FR9	MeAhda	Thr	Pro	Tyr	Trp	_	Welker <i>et al.</i> (2006)	
754.43	Cyanostatin B	Ahda	Melle	Pro	Tyr	Tyr	_	Sano <i>et al.</i> (2005)	
756.45	756	Ahda	Val	Leu	HTy	Tyr	_	This study	
756.45	755	Ahda	Val	MeVal	Tyr	Tyr	-	Ishida <i>et al.</i> (2000)	
758.43	757	Ahda	Thr	MeLeu	Tyr	Tyr	-	Welker <i>et al.</i> (2006)	
765.42	764	MeAhda	Thr	Pro	Tyr	Trp	-	Welker <i>et al.</i> (2006)	
768.45	767	MeAhda	Tyr	Melle	Pro	Tyr	-	Welker <i>et al.</i> (2006)	
770.46	770	MeAhda	Val	Leu	HTy	Tyr	-	This study	
770.47	478	MeAhda	Val	MeVal	Tyr	Tyr	-	Ishida <i>et al.</i> (2000)	
772.38	91-E	Cl ₂ Ahda	lle	MeLeu	Pro	Tyr	-	Ishida <i>et al.</i> (2000)	
773	99-A	ClAda	Tyr	Leu	MeTyr	Pro	-	Ishida <i>et al.</i> (1997)	
757	299-D	Cl ₂ Ahda	Val	MeVal	MeTyr	Pro	-	Ishida <i>et al.</i> (1997)	
806	99-B	Cl_2Ada	Tyr	Leu	MeTyr	Pro	-	Ishida <i>et al.</i> (1997)	
810.38	GH787	ClAhda	Tyr	Melle	Pro	Tyr	-	Lifshits et al. (2011)	
852	299-C	Ahda	Val	MeVal	MeTyr	Pro	Tyr	Ishida <i>et al.</i> (1997)	
887	299-A	ClAhda	Val	MeVal	MeTyr	Pro	Tyr	Ishida <i>et al.</i> (1997)	
917.49	51-A	Ahda	Tyr	MeVal	MeTyr	Pro	Tyr	Ishida <i>et al.</i> (2000)	
921	299-B	Cl ₂ Ahda	Val	MeVal	MeTyr	Pro	Tyr	Ishida et al. (1997)	
931.51	51-B	MeAhda	Tyr	MeVal	MeTyr	Pro	Tyr	Ishida et al. (2000)	

*From *N*-terminal to C-terminal; Ahda, 3-amino-2-hydroxy-decanoic acid; ClAhda, 10-chloro-3-amino-2-hydroxy-decanoic acid; Cl₂Ahda, 10-dichloro-3-amino-2-hydroxy-decanoic acid; Me, *N*-metil.

In summary, this study represents the first confirmed co-production of microginins and microcystins in strains from the Salto Grande Reservoir. The structures of two new microginin variants, MG756 (Ahda-Val-Leu-HTy-Tyr) and MG770 (MeAhda-Val-Leu-HTy-Tyr), are also proposed. The occurrence of microginins with microcystins in the strains LTPNA08 and LTPNA09 highlights the potential of Brazilian cyanobacteria as a source of natural compounds with pharmaceutical interest.

Acknowledgements

The authors thank J. Sampaio for cell culturing assistance and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; grants: 2010/15651-9 and 2010/15696-2 – Carneiro R.L. fellowship), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CONICYT (Programa de Cooperación Científica Internacional) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for research funding and financial support.

Authors' contribution

R.L.C. and F.A.D. contributed equally to this paper.

References

Anjos FM, Bittencourt-Oliveira MC, Zajac MP, Hiller SC, Erler K, Luckas B & Pinto E (2006) Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. *Toxicon* **48**: 239–245.

Ausubel F, Brent R, Kingston R, Seidman J, Smith J & Struhl K (eds) (1990) *Preparation of Genomic DNA. Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, New York.

Babica P, Hilscherova K, Bartova K, Blaha L & Marsalek B (2007) Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. *Phycologia* **46**: 137–142.

Baptista-Saidemberg NB, Saidemberg DM & Palma MS (2011) Profiling the peptidome of the venom from the social wasp *Agelaiapallipespallipes. J Proteomics* **74**: 2123–2137.

Bittencourt-Oliveira MC (2003) Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a mcyB molecular marker. *Harmful Algae* 2: 51–60.

Bittencourt-Oliveira MC, Kujbida P, Cardozo KHM, Carvalho VM, Moura AD, Colepicolo P & Pinto E (2005) A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komarek et al. *Biochem Biophys Res Commun* **326**: 687–694.

Bittencourt-Oliveira MC, Oliveira MC & Pinto E (2011) Diversity of microcystin-producing genotypes in Brazilian strains of *Microcystis* (Cyanobacteria). *Braz J Biol* **71**: 209–216.

Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP *et al.* (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **146**: 60–78.

Carneiro RL, Santos MEV, Pacheco ABF & Azevedo SMFO (2009) Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *J Plankton Res* **31**: 481–488.

Carvalho LR, Pipole F, Werner VR, Laughinghouse IVHD, Camargo ACM, Rangel M, Konno K & Sant'Anna CL (2008) A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do Sul state, southern Brazil. *Braz J Microbiol* **39**: 761–769.

Dörr FA, Pinto E, Soares RM & Azevedo SMFO (2010) Microcystins in South American aquatic ecosystems: occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon* **56**: 1247–1256.

Erhard M, von Dohren H & Jungblut PR (1999) Rapid identification of the new anabaenopeptin G from *Planktothrixagardhii* HUB 011 using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**: 337–343.

Frias HV, Mendes MA, Cardozo KHM, Carvalho VM, Tomazela D, Colepicolo P & Pinto E (2006) Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event. *Biochem Biophys Res Commun* **344**: 741–746.

Gademann K & Portmann C (2008) Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. *Curr Org Chem* **12**: 326–341.

Gesner-Apter S & Carmeli S (2008) Three novel metabolites from a bloom of the cyanobacterium. *Tetrahedron* **64**: 6628–6634.

Gorham PR, McLachlan J, Hammer UT & Kim WK (1964) Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lynbg). *Int Assoc Theor Appl Limnol* **15**: 8. Harada K, Fujii K, Shimada T, Suzuki M, Sano H, Adachi K & Carmichael WW (1995) 2 cyclic-peptides, anabaenopeptins, a 3rd group of bioactive compounds from the cyanobacteium *Anabaena flosaquae* NRC 525-17. *Tetrahedron Lett* **36**: 1511–1514.

Hisbergues M, Rouhiainen GCL, Sivonen K & Borner T (2003) PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol* **180**: 402–410.

Ishida K, Matsuda H, Murakami M & Yamaguchi K (1997) Microginins 299-A and -B, leucineaminopeptidase inhibitors from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (NIES-299). *Tetrahedron* **53**: 10281–10288.

Ishida K, Matsuda H & Murakami M (1998) Four new microginins, linear peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa. Tetrahedron* **54**: 13475–13484.

Ishida K, Kato T, Murakami M, Watanabe M & Watanabe MF (2000) Microginins, zinc metalloproteases inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* **56**: 8643–8656.

Johnson RS, Martin SA & Biemann K (1988) Collisioninduced fragmentation of (M+H)⁺ions of peptides – sidechain specific sequence ions. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **86**: 137–154.

Jungblut AD & Neilan BA (2006) Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Arch Microbiol* **185**: 107–114.

Kodani S, Suzuki S, Ishida K & Murakami M (1999) Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of lake Teganuma (Japan). *FEMS Microbiol Lett* **178**: 343– 348.

Kómarek J & Anagnostidis K (1999) Cyanoprokaryota 1.
Chroococcales. Süsswasserflora von Mitteleuropa, Vol. 19 (Ettl H, Gärtner G, Heynig H & Mollenhauer D, eds).
Spektrum, Aka. Verl., Berlin.

Lawton LA, Edwards C & Codd GA (1994) Extraction and high performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* **119**: 1525–1530.

Lifshits M, Zafrir-Ilan E, Raveh A & Carmeli S (2011) Protease inhibitors from three fishpond water blooms of *Microcystis* spp. *Tetrahedron* **67**: 4017–4024.

Lyck S (2004) Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa. J Plankton Res* **26**: 727–736.

Mikalsen B, Boison G, Skulberg OM, Fastner J, Davies W, Gabrielsen TM, Rudi K & Jakobsen KS (2003) Natural variation in the microcystinsynthetase operon mcyABC and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *J Bacteriol* **185**: 2774–2785.

Moschini-Carlos V, Bortoli S, Pinto E, Nishimura PY, de Freitas LG, Pompeo MLM & Dörr FA (2009) Cyanobacteria and cyanotoxin in the Billings Reservoir (São Paulo, SP, Brazil). *Limnetica* **28**: 273–282. Murakami M, Shin HJ, Matsuda H, Ishida K & Yamaguchi K (1997) A cyclic peptide, anabaenopeptin B, from the cyanobacterium *Oscillatoriaagardhii. Phytochemistry* **44**: 449–452.

Neumann U, Forchert A, Flury T & Weckesser J (1997) Microginin FR1, a linear peptide from a water bloom of *Microcystis* species. *FEMS Microbiol Lett* **153**: 475–478.

Okino T, Matsuda H, Murakami M & Yamaguchi K (1993) Microginin, an angiotensin converting enzyme inhibitor from the blue green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Lett* **34**: 501–504.

Paizs B & Suhai S (2005) Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom Rev* 24: 508–548.

Pearson LA & Neilan BA (2008) The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr Opin Biotechnol* **19**: 281–288.

Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R & Neilan B (2010) On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs* **8**: 1650–1680.

Repka S, Koivula M, Harjunpa V, Rouhiainen L & Sivonen K (2004) Effects of phosphate and light on growth of and bioactive peptide production by the cyanobacterium *Anabaena* strain 90 and its anabaenopeptilide mutant. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4551–4560.

Reynolds CS (ed) (2006) *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge.

Rohrlack T, Dittmann E, Henning M, Borner T & Kohl JG (1999) Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 737–739.

Rouco M, López-Rodas V, Flores-Maya A & Costas E (2011) Evolutionary changes in growth rate and toxin production in the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* under a scenario of eutrophication and temperature increase. *Environ Microbiol* **62**: 265–273.

Rounge TB, Rohrlack T, Nederbragt AJ, Kristensen T & Jakobsen KS (2009) A genome-wide analysis of nonribosomal peptide synthetase gene clusters and their peptides in a *Planktothrixrubescens* strain. *BMC Genomics* **10**: 396.

Runnegar M, Berndt N & Kaplowitz N (1995) Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol Appl Pharmacol* **134**: 264–272.

Sano T, Takagi H, Morrison LF, Metcalf JS, Codd GA & Kaya K (2005) Leucineaminopeptidase M inhibitors, cyanostatin A and B, isolated from cyanobacterial water blooms in Scotland. *Phytochemistry* 66: 543–548.

Sant'Anna CL & Azevedo MTD (2000) Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71: 359–385.

Silva-Stenico ME, Silva CSP, Lorenzi AS, Shishido TK, Etchegaray A, Lira SP, Moraes LAB & Fiore MF (2011) Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiol Res* 166: 161–175.

- Singh S, Kate BN & Banerjee UC (2005) Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit Rev Biotechnol* 25: 73–95.
- Straub C, Quillardet P, Vergalli J, de Marsac NT & Humbert J-F (2011) A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. *PLoS ONE* 6: 1–12.

Tonk L, Welker M, Huisman J & Visser PM (2009) A Production of cyanopeptolins, anabaenopetins, and microcystins by the harmful cyanobacteria Anabaena 90 and *Microcystis* PCC 786. *Harmful Algae* **8**: 219–224.

Vaitomaa J, Rantala A, Halinen K, Rouhiainen L, Tallberg P, Mokelke L & Sivonen K (2003) Quantitative real-time PCR for determination of microcystinsynthetase copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Appl Environ Microbiol* 69: 7289–7297.

Valerio E, Chambel L, Paulino S, Faria N, Pereira P & Tenreiro R (2010) Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples. *Environ Toxicol* 25: 251–260.

Welker M & von Dohren H (2006) Cyanobacterial peptides – nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 530–563.

Welker M, Marsalek B, Sejnohova L & von Doehren H (2006) Detection and identification of oligopeptides in Microcystis (cyanobacteria) colonies: toward an understanding of metabolic diversity. *Peptides* 27: 2090–2103.

Wiedner C, Visser PM, Fastner J, Metcalf JS, Codd GA & Mur LR (2003) Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Appl Environ Microbiol* 69: 1475–1481.

Zilliges Y, Kehr J-C, Meissner S, Ishida K, Mikkat S, Hagemann M, Kaplan A, Börner T & Dittman E (2011) The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS ONE* **6**: 1–11.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Scheme depicting the fragmentation pathways leading to b and y ions for linear peptides.

Table S1. Resolution (Rs) analyses of peaks of microcystins and microginins from the two toxic strains of *Microcystis* sp. (LTPNA 08 and LTPNA 09).

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

FICHA DO ALUNO



Data da Defesa: Resultado da Defesa: Histórico de Ocorrências:

Ingressou no Doutorado em 30/09/2010 Prorrogação em 29/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013) Última ocorrência: Prorrogação em 29/07/2014 Impresso em: 26/01/15 07:24:57

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

9141 - 5525039/2 - Fabiane Dörr

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc	Exc.	Situação
FBC5784- 2/5	Tópicos Avançados em Toxicologia II	15/03/2011	27/06/2011	30	2	95	А	Ν	Concluída
FBF5797- 1/1	Desenvolvimento e Validação de Métodos Bioanalíticos	15/03/2011	25/04/2011	60	4	100	А	Ν	Concluída
FBC5803- 1/3	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	11/04/2011	24/04/2011	30	2	100	А	Ν	Concluída
FBC5802- 2/6	Tópicos Avançados em Toxicologia I	09/08/2011	29/11/2011	30	2	85	А	Ν	Concluída
FBA5728- 3/3	Aprimoramento Didático	12/09/2011	09/10/2011	60	4	87,5	А	Ν	Concluída
FBC5748- 3/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	24/04/2012	05/06/2012	60	0	0	-	Ν	Matrícula cancelada
FBC5741- 6/1	Análise Toxicológica de Fármacos e Drogas que Causam Dependência	25/06/2012	29/07/2012	60	4	90	А	Ν	Concluída
FBC5729- 7/1	Fundamentos Básicos da Avaliação do Risco Oferecido por Substâncias Químicas	23/08/2012	19/09/2012	60	4	100	А	Ν	Concluída
FBC5758- 2/1	Toxicologia dos Praguicidas	25/09/2012	05/11/2012	90	6	92	А	Ν	Concluída

	Créditos mínimo	os exigidos	Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	28
Estágios:			
Total:	10	20	28

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Prorrogação em 29/07/2014 Impresso em: 26/01/15 07:24:57



9141 - 5525039/2 - Fabiane Dörr

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

Última ocorrência: Prorrogação em 29/07/2014 Impresso em: 26/01/15 07:24:57