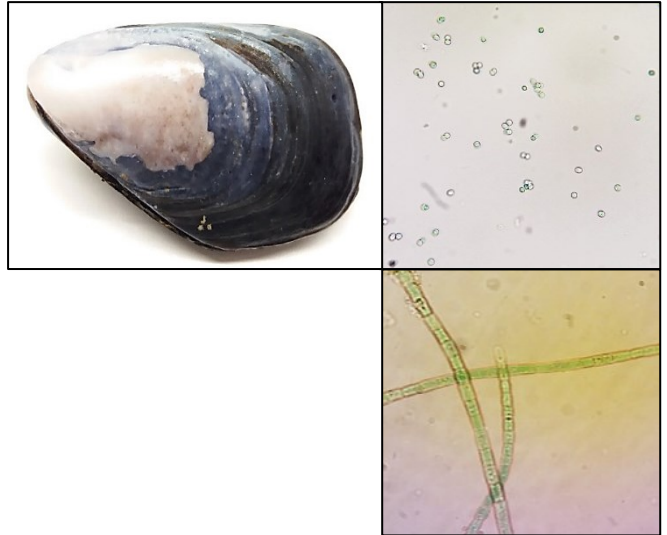




Respostas fisiológicas do mexilhão marinho *Mytilus galloprovincialis* exposto a cianobactérias tóxicas *Microcystis aeruginosa* e *Chrysosporum ovalisporum*

Flavio Luis de Oliveira

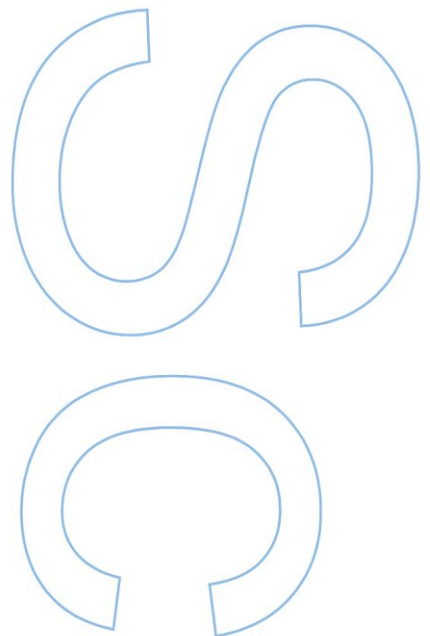
Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água
Departamento de Biologia
Ano 2017

Orientador

Alexandre Marnoto de Oliveira Campos
Investigador, CIIMAR

Coorientador

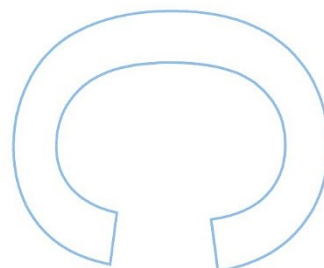
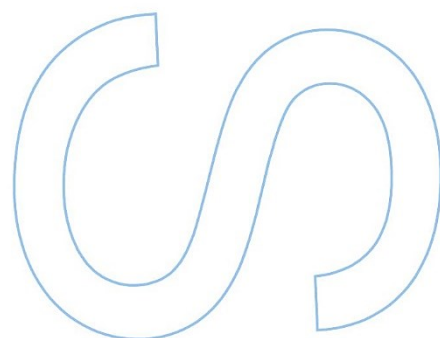
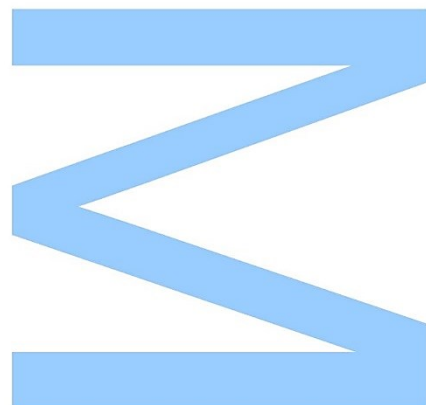
José Carlos Martins
Investigador, CIIMAR



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por conceder forças para desenvolver e concluir este mestrado.

Ao meu orientador, o Dr. Alexandre Campos pelo tema proposto para esta dissertação, no qual possibilitou meu ingresso na vida científica. Por seus preciosos ensinamentos e ajuda fornecida, bem como sua infinita paciência para comigo. Não tenho palavras para expressar o quão grato sou por sua orientação em todas as etapas deste trabalho. Por vezes me desanimei, mas você sempre me manteve motivado. Agradeço também o coorientador José Carlos que muito me apoiou neste trabalho.

Ao professor Vitor Vasconcelos que foi o intermediador do início dos trabalhos da dissertação, ao apresentar meu orientador e por abrir as portas do laboratório Blue Biotechnology and Ecotoxicology (BBE), do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR). Agradeço por todo apoio recebido.

Agradeço à Blue Biotechnology and Ecotoxicology Culture Collection (LEGE-CC) pela cedência de fotografias.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, que me acolheram de braços abertos e sempre me ajudaram sem medir esforços. Agradecimento especial ao Aldo Barreiro por todo apoio nas análises estatísticas, não seriam possíveis sem sua ajuda. Agradeço a Joana Azevedo pelo apoio na quantificação das toxinas. Também agradeço ao João Morais que me ensinou os procedimentos de cultivo de cianobactérias. Enfim, agradeço a todos que diariamente me apoiaram: Ana Carvalho, Elane Domênica, Jorge Antunes, Lígia Sousa, Marco Preto, Micaela Vale, Pedro Leão, Raquel Castelo, Sara Freitas, Teresa Martins e Vitor Ramos.

A equipe do Biotério de Organismos Aquáticos (BOGA), por todo suporte durante os ensaios.

A Filipa e Alexandra do Laboratório de Nutrição, Crescimento e Qualidade (LANUCE) que auxiliaram em algumas etapas da dissertação no fornecimento de informações e materiais.

A diretora do mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade, Dra. Natividade Vieira, que foi primordial para que esse mestrado se tornasse possível. Não tenho como agradecer por tudo que fizeste para mim e por várias vezes que me atendeu, sempre compartilhando seus conselhos. Agradeço também a Universidade do Porto e a todos os seus colaboradores no qual conheci ao longo do mestrado, em especial ao Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências, sempre fornecendo o melhor atendimento e ensino possível.

Pelo apoio financeiro do Programa Operacional Regional do Norte de Portugal (NORTE 2020), no âmbito do Acordo de Parceria PORTUGAL 2020, através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (ERDF), no âmbito do projeto INNOVMAR - Inovação e Sustentabilidade na Gestão e Exploração de Recursos Marinhos (Referência NORTE-01-0145-FEDER-000035) e pela Fundação para Ciência e Tecnologia – FCT, no âmbito do projeto UID/Multi/04423/2013.

Agradecimentos aos meus amigos que fizeram e compartilharam os bons (e os maus) momentos na residência. Em especial ao Gisana Freitas, Júlio Marrara, Michelle Brito, Natália Rabello, Renato Barbosa, Simeia Dias e Uirá Siqueira. Levarei vocês para sempre

comigo. Agradeço a todos que pude conhecer na residência, vocês me ensinaram muito sobre a importância da vida.

A minha esposa e colega de mestrado, Thaís Oliveira, companheira inseparável. Por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho, onde muitas etapas só puderam ser realizadas devido o seu apoio. Agradeço também por toda a paciência e amor para comigo, pois momentos felizes e difíceis passamos juntos ao longo deste mestrado.

A minha família que mesmo de tão longe estiverem sempre presentes em meu coração e minha mente. Minha irmã Selma e meu cunhado Silvio, muito me ajudaram no decorrer deste mestrado. Vários foram nossos diálogos neste percurso. Vocês foram e sempre serão essenciais na minha vida. À minha mãe e ao meu pai que mesmo com dificuldades e pouco estudo, sempre me orientaram para o caminho certo e depositaram sua confiança em mim. Agradeço por todo o apoio, amor e paciência para comigo, pois permitiram me tornar o homem que sou. As minhas sobrinhas queridas Amanda, Isabela e Luana e ao meu sobrinho Silas, amo muito vocês.

Aos meus amigos que deixei no Brasil, em especial Anderson Silva, Jefferson Augusto e Leandro Leite, pois sempre me apoiaram em tudo. Aos meus amigos e ex-companheiros de trabalho que me incentivaram estudar em Portugal: Adriano Oliveira, André Camargo, Carlos César, Davi Alves, Endrigo Mosso, Flavio Menezes, João Camargo, Luis Murari, Marcos Massoca, Mayara Arena e Romerson Bueno. Sou grato por ter todos vocês como amigos. Não posso deixar de agradecer aos professores que me apoiaram, em especial a Giovana Paiva, Guilherme da Silva, Lilian Pisano, Lucas Bermejo e Paloma Lima.

A todos que não mencionados aqui, mas que de certa forma contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade, onde permitiu conhecer e explorar um novo mundo.

Resumo

As florescências de cianobactérias tóxicas constituem situações de risco mundial, com consequências negativas, quer a nível ecológico, social e económico. Estas florescências são responsáveis pela diminuição da qualidade da água, pois provocam a redução de oxigénio e sintetizam metabolitos que produzem efeitos tóxicos em animais ou vegetais. Entre estes metabolitos temos a microcistina (MC) e a cilindrospermopsina (CIN), que causam efeitos tóxicos por exposição direta ou indireta. Mais comuns em ambientes de água doce, as contaminações por MC e CIN podem estender-se também aos estuários e zonas costeiras, sendo os seus efeitos adversos na fauna marinha e estuarina uma preocupação real que necessita de uma análise de risco cuidada.

Neste sentido o objetivo geral deste trabalho consistiu em avaliar a tolerância do mexilhão marinho *Mytilus galloprovincialis* às cianobactérias tóxicas *Microcystis aeruginosa* e *Chrysosporum ovalisporum*, que estão apontadas como contaminantes microbiológicos emergentes também em zonas salobras e costeiras, de regiões temperadas, bem como identificar qual a espécie de cianobactéria mais tóxica para o mexilhão marinho e determinar o papel da depuração na recuperação da condição fisiológica dos mexilhões.

Para o ensaio experimental, foram utilizados 744 mexilhões divididos em 8 aquários e com duas fases de tratamento de 14 dias cada. A primeira fase consistiu na exposição do mexilhão à microalga não-tóxica *Parachlorella kessleri* e às cianobactérias *M. aeruginosa*, produtora da toxina MC, e *C. ovalisporum*, produtora da toxina CIN, bem como à mistura de ambas as cianobactérias. A segunda fase do ensaio consistiu na depuração dos organismos, alimentados apenas com *P. kessleri*. A recolha de amostras permitiu avaliar os parâmetros fisiológicos (peso seco, taxa de filtração e formação de biscoitos) e os parâmetros bioquímicos (proteína total e glicogénio total). Para interpretação dos dados foi utilizado análise estatística multivariada.

Os resultados obtidos sugerem que a condição fisiológica do mexilhão se alterou ao longo do bioensaio. Algumas das variações observadas estão associadas ao tipo de tratamento ou microalga a que os mexilhões foram expostos, no entanto a maioria das variações observadas foram independentes do tipo de tratamento. A ausência de variações no peso seco dos mexilhões sugere que a exposição às microalgas tóxicas não inferiu stress fisiológico severo nos mexilhões. Por outro lado, as taxas de filtração registadas indicam que o mexilhão marinho filtrou e ingeriu as microalgas tóxicas de igual forma que a microalga verde não tóxica. Este comportamento alimentar faz com que o mexilhão seja um potencial acumulador e vetor de cianotoxinas na cadeia trófica. A capacidade de fixação

ao substrato do mexilhão foi avaliada através da contagem de bissos produzidos. A produção de bissos caracterizou-se por uma grande variação por indivíduo, o que dificultou a deteção de variações significativas ao longo do bioensaio, e entre grupos experimentais.

Os parâmetros bioquímicos avaliados no mexilhão, proteína e glicogénio totais, demonstram que houve uma clara modificação do metabolismo dos mexilhões ao longo do bioensaio, independente do tipo de tratamento imposto. Os 4 grupos experimentais analisados apresentaram um aumento significativo da proteína total no final da fase de depuração, relativamente à fase de exposição. Por outro lado, o glicogénio total sofreu uma diminuição nos 4 grupos experimentais no início do bioensaio (T1), recuperando posteriormente para níveis iniciais (T0). Especulamos que estas alterações estão relacionadas com uma alteração do metabolismo do mexilhão que está relacionada com o ciclo reprodutivo, isto é, a maturação das gonadas e desova.

Conclui-se neste estudo que o mexilhão do mediterrâneo é relativamente tolerante à presença das microalgas tóxicas *M. aeruginosa* e *C. ovalisporum*, uma vez que a condição fisiológica do mexilhão durante a fase de exposição não foi afetada (não se verificaram, por exemplo, reduções no peso seco, taxa de filtração ou produção de bissos) e que estas mesmas microalgas são uma fonte de alimento para este bivalve. Este último resultado sugere uma possível situação de risco de bioacumulação destas toxinas no mexilhão e possível transferência trófica. Na ausência de sintomas de stress fisiológico, a fase de depuração teve pouca relevância no estudo. No entanto a fase de depuração coincidiu com uma mudança do metabolismo do mexilhão correspondente à fase do seu ciclo reprodutivo, resultando numa acumulação significativa da proteína total nos tecidos dos animais.

Palavras-chave: Cianotoxinas, Cilindrospermopsina, Condição Fisiológica, Mexilhão do mediterrâneo, Microcistina, Produção de bissos, Reservas energéticas, Taxa de Filtração.

Abstract

The blooms of toxic cyanobacteria are world-threatening situations with negative ecological, social, and economical consequences. These blooms are responsible for decreased water quality, because they cause the reduction of oxygen and synthesize metabolites that produce toxic effects in animals or plants. Among these metabolites are the microcystins (MC) and the cylindrospermopsin (CYN), that cause toxic effects by direct or indirect exposure. More common to observe in freshwater environments, the contamination by MC and CYN may also be detected in estuaries and coastal areas, being the adverse effects on marine and estuarine fauna a real concern that should be carefully evaluated.

In this sense the general objective of this work was to evaluate the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* tolerance to toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Chrysosporum ovalisporum*, which are identified as emerging microbiological contaminants also brackish and coastal areas of temperate climates, as well to understand which cyanobacteria species is more toxic to the marine mussel and determine the role of depuration in mussel recovery from exposure.

For the bioassay, 744 mussels were divided into 8 aquariums. The bioassay comprised to phases of exposure/feeding, each with 14 days of duration. The first phase consisted in the exposure/feeding mussels with non-toxic microalgae *Parachlorella kessleri* and cyanobacteria *M. aeruginosa*, which produces the toxin MC, and *C. ovalisporum*, which produces the toxin producing CYN, as well as a mixture of both cyanobacteria. The second phase of the test consisted in feeding the mussels only with non-toxic microalga *P. kessleri*, to allow the animals to recover from the exposure to toxic microalga and to depurate. Several physiological (dry weight, filtration rate and byssus secretion) and biochemical parameters (total protein and total glycogen) were measured to assess mussel's condition. For interpretation of the data was used for multivariate statistical analysis.

The results obtained suggest that the physiological condition of the mussel has changed along the bioassay. Some of the variations observed are associated to the type of treatment or microalgae that mussels were exposed, however most of the alterations observed were not related with the microalgae used. The absence of changes in dry weight of mussels suggests that exposure to toxic microalgae does not induce severe physiological stress in mussels. However, the filtration rates recorded indicate that the marine mussel filtered and ingested toxic microalgae at similar rates as the non-toxic green microalga. This feeding behavior may be of major concern in the aquatic systems as mussels can be a potential vector of toxins allow the food chain. The ability of the mussel adhere to

underwater surfaces was evaluated by counting the number of byssus produced. The production of byssus was characterized by a great variation per individual, which hindered the detection of significant variations along the bioassay, and between experimental groups.

The biochemical parameters evaluated in the mussels, total protein and total glycogen, demonstrate that there was a clear change in the metabolism of mussels along the bioassay, regardless of the type of treatment. The 4 experimental groups of this bioassay showed a significant increase in total protein at the end of the depuration phase, comparatively to the values of total protein recorded during the exposure phase. On the other side, glycogen decreased in the 4 experimental groups at the beginning of the bioassay (T1), recovering later to initial levels (T0). We speculated that these changes are related to a change in the metabolism of mussels aligned with the phase of the animal's reproductive cycle, and the maturation of the gonads and spawning.

In this study it is concluded that Mediterranean mussel is relatively tolerant of the presence of toxic microalgae *M. aeruginosa* and *C. ovalisporum*, once the physiological condition of the mussels at the time of exposure was not affected (no decrease in dry weight, filtration rate or byssus secretion was observed) and that toxic microalgae were utilized by this invertebrate as food source. In the absence of symptoms of physiological stress, the depuration phase had little relevance in the study. However, the depuration coincided with a change of mussel's metabolism which led to a significant accumulation of total protein in the animal tissues.

Keywords: Byssus secretion, Cyanotoxins, Cylindrospermopsin, Condition index, Energetic reserves, Filtration rate, Microcystin, Mussel of Mediterranean.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Florescências de microalgas: causas e consequências	1
1.2	Cianobactérias e suas toxinas	2
1.2.1	Microcistina	5
1.2.2	Cilindrospermopsina	7
1.3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	9
1.3.1	Caracterização e relevância ecológica-comercial	9
1.3.2	Dinâmica e efeitos de microcistinas e cilindrospermopsinas	12
1.4	Objetivos	13
2	Materiais e Métodos	14
2.1	Cultivos de microalgas	14
2.2	Quantificação da densidade celular	15
2.3	Extração e quantificação de toxinas em cianobactérias	16
2.3.1	Quantificação de microcistina-LR por HPLC-PDA	17
2.3.2	Quantificação de cilindrospermopsina por HPLC-PDA	18
2.4	Bioensaio	18
2.4.1	Colheita dos mexilhões	18
2.4.2	Parâmetros físico-químicos (água)	19
2.4.3	Período de aclimação	19
2.4.4	Cálculo do volume de água e alimento	20
2.4.5	Procedimento para exposição e depuração dos mexilhões	21
2.4.6	Amostragem do material biológico	21
2.5	Parâmetros fisiológicos	22
2.5.1	Peso seco	22
2.5.2	Taxa de filtração	22
2.5.3	Produção de bisco	24
2.6	Parâmetros bioquímicos	24
2.6.1	Proteína total	24
2.6.2	Glicogénio total	25
2.7	Análise estatística	26
3	Resultados	28
3.1	Parâmetros fisiológicos	30
3.1.1	Peso seco	30
3.1.2	Taxa de filtração	30
3.1.3	Produção de bisco	31
3.2	Parâmetros bioquímicos	32
3.2.1	Proteína total	32
3.2.2	Glicogénio total	33
4	Discussão	34

4.1	Efeitos fisiológicos	34
4.2	Efeitos bioquímicos.....	37
5	Conclusões e perspetivas futuras.....	39
	Referências	40
	Anexo I - Protocolo	50
	Anexo II – Tabelas Suplementares	52

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma: inter-relações dos processos que afetam os ecossistemas aquáticos	1
Figura 2. Características estruturais gerais da célula de cianobactérias	3
Figura 3. Eutrofização e potenciais efeitos das mudanças climáticas sobre as florescências de algas e cianobactérias nocivas	3
Figura 4. Estrutura química principal da microcistina e respetivas variantes estruturais ...	6
Figura 5. Microscopia ótica de células de <i>Microcystis aeruginosa</i>	7
Figura 6. Estrutura química da cilindrospermopsina	7
Figura 7. Microscopia ótica de tricomas de <i>Chrysosporum ovalisporum</i>	9
Figura 8. Morfologia externa de <i>Mytilus galloprovincialis</i>	10
Figura 9. Distribuição geográfica de <i>M. galloprovincialis</i>	11
Figura 10. Distribuição geográfica de <i>M. edulis</i>	11
Figura 11. Produção de biomassa de microalgas	15
Figura 12. Contagem celular em câmara de Neubauer.....	16
Figura 13. Praia da Memória: colheita de mexilhões.....	19
Figura 14. Disposição dos aquários para o bioensaio.	20
Figura 15. Morfologia interna de <i>M. galloprovincialis</i>	21
Figura 16. Desenho experimental para taxa de filtração.	23
Figura 17. Cromatograma de microcistina	28
Figura 18. Cromatograma de cilindrospermopsina.....	29
Figura 19. Variação do peso seco dos mexilhões.	30
Figura 20. Variação da taxa de filtração dos mexilhões.	31
Figura 21. Variação da formação de bissos nos mexilhões.....	31
Figura 22. Variação da proteína total dos mexilhões	32
Figura 23. Variação do glicogénio total dos mexilhões.....	33

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação das toxinas de cianobactérias	5
Tabela 2. Correção do volume de água para os tempos de amostragem	20
Tabela 3. Número de mexilhões por amostragens	22
Tabela 4. Padrões: reta de concentração de proteína.....	24
Tabela 5. Quantificação de proteína total.....	25
Tabela 6. Padrões: reta de concentração de glucose.	26

Lista de Abreviaturas

BBE	<i>Blue Biotechnology and Ecotoxicology</i>
CIA	Critério de Informação de Akaike
CIIMAR	Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental
CIN	Cilindrospermopsina
DL	Dose letal
DS	Diferenças significativas
Fbissos	Formação de bissos
Filt	Taxa de filtração
Glic	Glicogénio total
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPMA	Instituto Português do Mar e Atmosfera
LEGE	Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução
MC-LR	Microcistina LR
Prot	Proteína total
Pseco	Peso seco
TFA	Ácido trifluoroacético
UP	Ultrapura
UV	Ultravioleta

1 Introdução

1.1 Florescências de microalgas: causas e consequências

O biociclo marinho e de água doce tem um importante papel na manutenção da vida no planeta, pois a água é responsável por manter o equilíbrio da biodiversidade, as relações entre os seres vivos, a formação de rios, lagos e mares e a modelagem de rochas. Durante a evolução dos seres vivos, a água esteve sempre presente, descrevendo assim, a nossa história (Bacci e Pataca, 2008; Guerreiro, 2009).

Atualmente várias crises hídricas são observadas em todo o mundo. Estas podem ocorrer devido à má gestão das empresas ou estações de tratamento das águas para abastecimento público ou através da contínua contaminação dos recursos hídricos causada pelo homem, seja através da agricultura, falta ou ineficiência dos tratamentos de águas residuais ou industriais, depósito de lixo próximos das nascentes e leitos de rios, entre outros fatores que influenciam a qualidade da água. O agravamento do aquecimento global juntamente com outros fatores associados às alterações climáticas também influenciam diretamente a qualidade da água. As possíveis relações entre os diversos fatores e os ecossistemas aquáticos estão representadas em Figura 1.

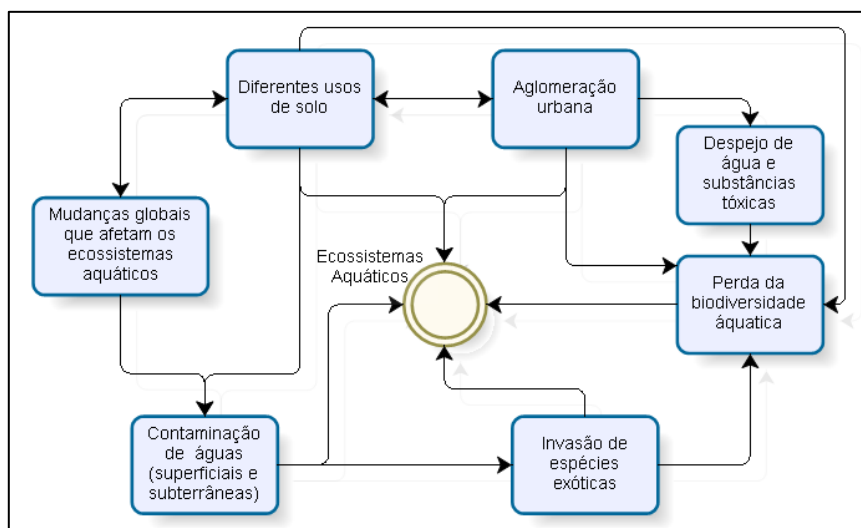


Figura 1. Fluxograma representando as inter-relações dos processos que afetam os ecossistemas aquáticos. Adaptado de Tundisi, 2008.

A disponibilidade de nutrientes nos ambientes aquáticos é um fator que favorece a aceleração do processo de eutrofização dos recursos hídricos. Esta aceleração ocorre habitualmente por ação antropogénica, devido ao enriquecimento de matéria orgânica por compostos azotados e fosfatados particularmente, elevando a atividade da produção biológica. As descargas de esgotos domésticos e industriais, sem o devido tratamento ou

com tratamento ineficaz, são as principais fontes deste enriquecimento, causando sérios problemas ambientais e para saúde pública (Azevedo e Vasconcelos, 1998; Bittencourt-Oliveira e Molica, 2003).

Com o aumento da disponibilidade de nutrientes, ocorre o aumento das florescências ou “blooms” de cianobactérias e microalgas verdes, que passam a apresentar uma menor diversidade de espécies, mas com maior biomassa das espécies presentes, com dominância das cianobactérias (Azevedo e Vasconcelos, 1998; Bittencourt-Oliveira e Molica, 2003; Moschini-Carlos et al., 2011; Vasconcelos, 1995). Este crescimento excessivo conduz a formação dos chamados “tapetes verdes” na superfície da água. Os efeitos associados são a redução do oxigénio dissolvido na água, a alteração da viscosidade, a diminuição da zona fótica e a produção de metabolitos secundários, como as toxinas e a produção de odores fortes (Azevedo e Brandão, 2003; Fernandes, 2008; Vasconcelos, 1995). As florescências de microalgas são, por conseguinte, e com maior ou menor frequência, responsáveis por perdas económicas, sociais e ambientais (Tundisi, 2008). Algumas destas florescências de cianobactérias ocorrem naturalmente e de forma sazonal em alguns ambientes aquáticos, onde com condições propícias de luz, disponibilidade de nutrientes e condições hidrodinâmicas, acabam por modificar a qualidade da água (Solé et al., 2005).

1.2 Cianobactérias e suas toxinas

As cianobactérias, também conhecidas por algas azuis, são organismos procarióticos foto-autotróficos, apresentando organizações unicelulares, coloniais ou filamentosas (Calijuri et al., 2006; Carneiro e Leite, 2008; Lee, 2008; Linhares e Gewandsznajder, 2008). A estrutura celular geral desses organismos é apresentada na Figura 2. Com origem há aproximadamente 3,5 bilhões de anos, estes microrganismos foram descobertos em rochas sedimentares encontradas no noroeste da Austrália. As cianobactérias estão, portanto, entre os organismos pioneiros na Terra (Azevedo e Vasconcelos, 1998), sendo que constituem um grupo taxonómico e filogenético único (Round, 1983), distribuído por cerca de 150 géneros e mais de 2000 espécies (Moschini-Carlos et al., 2011). As cianobactérias crescem nas mais diferentes condições de temperatura, pH e salinidade. Contudo, os ambientes de água doce são os mais favoráveis para o seu crescimento, pois a maioria das espécies apresenta um melhor desenvolvimento em ambientes neutros e alcalinos (com pH entre 7,0 e 9,0) e com temperaturas entre os 15°C e os 30°C e altas cargas de nutrientes (Figura 3) (Azevedo e Brandão, 2003; O’Neil et al., 2012).

Do ponto de vista genético, as cianobactérias são muito parecidas com as bacterias Gram negativas (Cobo et al., 2012). Porém, as características das cianobactérias são diferentes das bacterias heterotróficas uma vez que contém diversos pigmentos fotossintéticos incluindo a clorofila-a (pigmento comum em plantas vasculares e algas eucarióticas), e por vezes clorofila b ou d. Outros pigmentos fotossintéticos acessórios, como as ficobilinas (ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina), permitem às cianobactérias absorver melhor a luz nos mais diversos habitats (Lee, 2008; Reynolds, 2006).

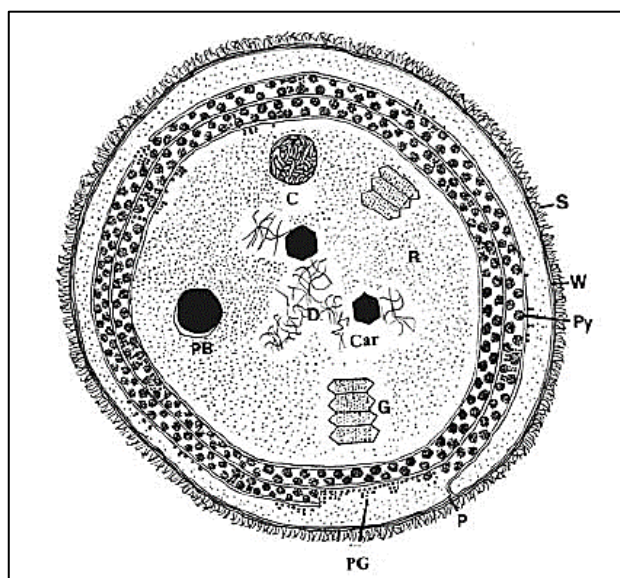


Figura 2. Características estruturais gerais da célula de cianobactérias. (C) corpo de cianoficina (grânulo estruturado); (Car) carboxissomo (corpo poliédrico); (D) fibrilas de DNA; (G) vesículas de gás; (P) plasmalema; (PB) corpo de polifosfato; (PG) grânulos de poliglucano; (Py) ficobilissomas; (R) ribossomas; (S) bainha; (W) parede. Fonte: Lee, 2008.

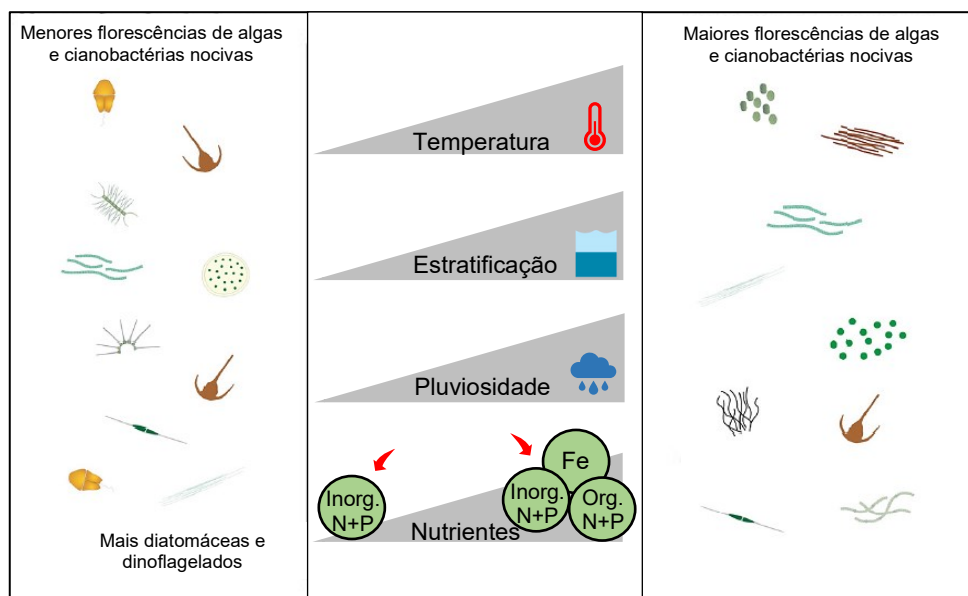


Figura 3. Eutrofização e potenciais efeitos das mudanças climáticas sobre as florescências de algas e cianobactérias nocivas. Adaptado de O'Neil et al., 2012.

Os efeitos adversos associados às cianobactérias advêm ainda dos metabolitos que as mesmas sintetizam e que produzem efeitos tóxicos em animais ou vegetais. As toxinas, como a microcistina (MC) são armazenadas no seu interior, sendo apenas libertadas para o meio aquático quando ocorre a lise celular. Já para a cilindrospermopsina (CIN), além da toxina também ser armazenada no seu interior, pode ser libertada para a água pela célula viva. Entretanto, nem todas as cianobactérias produzem toxinas (Carmichael, 1992). Segundo Azevedo e Brandão (2003), o fator que gera mais preocupação é a disponibilidade destas toxinas no meio aquático, afetando todos os níveis tróficos acima de forma direta ou indireta. Neste sentido, a saúde humana pode ser afetada pela ingestão direta de água contaminada ou de produtos alimentares contaminados, bem como através de atividades recreativas que conduzem a uma exposição dérmica.

As toxinas produzidas pelas cianobactérias causam os mais diversos efeitos adversos nos organismos a elas expostos. Assim, distinguimos os diferentes grupos de acordo com seu modo de ação: as hepatotoxinas (MCs e nodularinas), as neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(s), β -N-methylamino-L-alanine e saxitoxinas), as citotoxinas (CIN) e as dermatotoxinas (aplisiatoxinas e lingbiatoxinas). Há também os lipopolissacárideos (LPS), que são classificados desta forma mediante sua estrutura química. Na Tabela 1 apresentam-se as cianotoxinas mais conhecidas e frequentes no meio aquático, dentro de cada grupo referido (Cobo et al., 2012; Lee, 2008; Machado et al., 2016; Sivonen e Börner, 2008; Sivonen e Jones, 1999). As cianotoxinas MCs e CINs são conhecidas por causarem intoxicações humanas agudas através do consumo de água contaminada (Falconer e Humpage, 2005). Entretanto, várias são as vias de entrada no organismo, como a contaminação por MCs através de hemodiálise (Jochimsen et al., 1998), que levaram a consequências graves e resultaram em mortes, como no caso da síndrome de Caruaru no Brasil (Carmichael et al., 2001). Contudo, as intoxicações crônicas requerem também atenção, devido à exposição prolongada a baixos níveis de toxinas, como revelam alguns estudos epidemiológicos (Svirčev et al., 2014; Ueno et al., 1996; Zhang et al., 2015).

Tabela 1. Classificação das toxinas de cianobactérias mais conhecidas. Adaptado de Cobo et al., 2012.

Cianotoxinas	Gêneros produtores	Estrutura molecular	Nº variantes
Neurotoxinas			
Anatoxina-a	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Planktothrix</i>	Alcalóide Amina secundária	2
PSP (<i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>) ou Saxitoxina	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Planktothrix</i>	Alcalóides	20
BMMA (β -N-methylamino-L-alanine)	95% dos generos de cianobacterias	Aminoácido proteico	-
Anatoxina-a (s)	<i>Anabaena</i>	Éster de guanidina metil fosfato	1
Hepatotoxinas			
Noduralina	<i>Nodularia</i>	Pentapeptido cíclico	>8
MC	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Limnothrix</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Woronichinia</i>	Heptapeptido cíclico	>80
Citotoxinas			
CIN	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Chrysosporum</i>	Alcalóide cíclico guanidina	Aproximadamente 3
Dermatotoxinas *			
Aplisiatoxinas	<i>Lyngblia</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Schizothrix</i>	Alcalóide	2
Lingbiatoxinas			>1
Outros compostos bioativos			
Lipopolissacarídeo (LPS)	Vários gêneros	Lipopolissacarídeo	>3

* Cronberg e Annadotter (2006) descrevem as dermatotoxinas como uma Citotoxina.

1.2.1 Microcistina

Esta cianotoxina é um heptapeptídeo cíclico com a fórmula molecular $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$ (Figura 4). As primeiras estruturas químicas das várias variantes de MCs foram identificadas no início dos anos 80, e desde então novas variantes estruturais têm vindo a ser continuamente descobertas (Sivonen e Jones, 1999), das quais cerca de 100 variantes já foram descritas (Puddick et al., 2014; Qi et al., 2015). As MCs são caracterizadas pelo arranjo e modificação dos seus aminoácidos, sendo as variantes estruturais mais conhecidas e observadas no ambiente a MC-RR, MC-LR, MC-YR e MC-LA, (Carneiro e Leite, 2008; Vasconcelos et al., 2011). As variantes estruturais estão descritas na Figura

4, cuja nomenclatura foi proposta inicialmente por Carmichael et al. (1988), sendo referenciada, por exemplo, da seguinte forma: leucina (L), arginina (R), tirosina (Y) e alanina (A). Nos ecossistemas aquáticos a toxina é intracelular, sendo libertada somente quando ocorre a lise celular (Vasconcelos, 1995). Esta cianotoxina é produzida também por diversos géneros referenciados na Tabela 1.

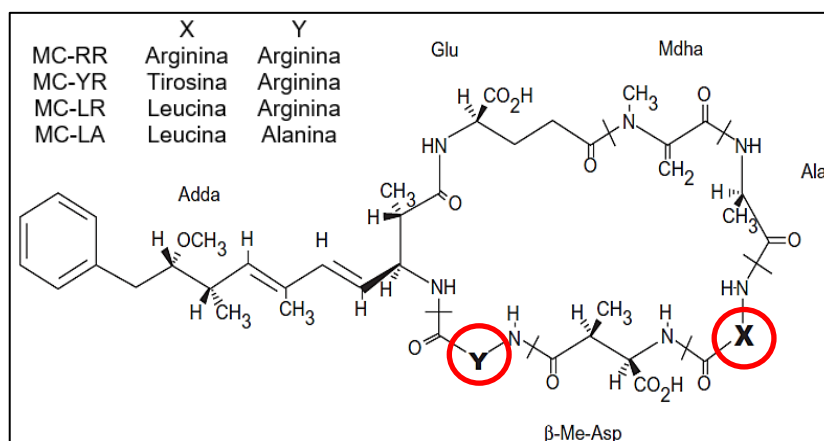


Figura 4. Estrutura química principal da MC e respetivas variantes estruturais mais conhecidas. Fonte: Carneiro e Leite, 2008.

A MC é a cianotoxina mais potente que se conhece, inibindo as proteínas fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2), sendo o fígado o principal órgão afetado (Dawson, 1998; Fischer et al., 2005). Podem causar a morte por hemorragia hepática em algumas horas, numa exposição aguda. A MC foi considerada possivelmente cancerígena para os seres humanos, o que justifica a sua inclusão no grupo 2B de compostos tóxicos pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC)¹, e promotora do desenvolvimento de tumores (Nishiwaki-Matsushima et al., 1991). Segundo Žegura et al. (2011), as MCs induzem também o stress oxidativo. A via mais comum de exposição humana é a ingestão de água ou alimentos contaminados. As MCs são hidrossolúveis, porém, algumas variantes destas moléculas apresentam características hidrofóbicas. Por conseguinte as MCs não conseguem penetrar diretamente nas membranas lipídicas das células animais, vegetais e bactérias. Para provocar o efeito tóxico, a absorção nas células ocorre através de transportadores específicos de membrana, cuja função é transportar nutrientes e compostos essenciais (Sivonen e Jones, 1999). O limite máximo estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008, p. 407) para as MCs é de 0,04 µg/Kg de peso corporal ou 1 µg/L na água para consumo humano.

Os impactos causados pelas MCs não se restringe aos potenciais efeitos no Homem e bivalves, mas em muitos outros organismos expostos às cianotoxinas. Esta ideia transparece, por exemplo, nos trabalhos com plantas (Campos et al., 2013; Machado et al., 2017; Pereira et al., 2015), em peixes (Gutiérrez-Praena et al., 2013) e bivalves (Freitas

¹ <http://www.iarc.fr/> acedido em agosto de 2017.

et al., 2014), que reportam efeitos adversos a vários níveis, bem como a bioacumulação destas toxinas.

Uma espécie produtora de MC-LR é a *Microcystis aeruginosa* (Figura 5) (Kützing – 1846), uma espécie pertencente à classe Cyanophyceae, subclasse Oscillatorioophycidae, ordem Chroococcales, família Microcystaceae e género *Microcystis* (Guiry e Guiry, 2017). As *Microcystis* são células esféricas e podem ou não formar colónias, com uma cor de tom azul. O diâmetro celular varia entre 4 e 6 µm, podendo atingir até 9,4 µm. A mucilagem produzida por estas células é incolor, formando uma margem distinta e estreita em torno das células. As colónias apresentam diferentes tamanhos e morfologias dependendo das estações do ano. A espécie *M. aeruginosa* distribui-se pelos mais variados ecossistemas de água doce e salobra (Cronberg e Annadotter, 2006; John et al., 2002).

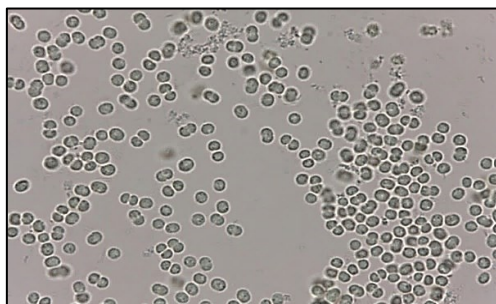


Figura 5. Microscopia ótica de células de *M. aeruginosa*. Fonte: <http://lege.ciimar.up.pt/>.

1.2.2 Cilindrospermopsina

Esta toxina é um alcalóide guanídico cíclico com a seguinte fórmula molecular: $C_{15}H_{21}N_5O_7S$ (Figura 6) (Falconer e Humpage, 2006; Poniedzialek et al., 2014). Esta molécula foi inicialmente isolada através de uma cultura de *Cylindrospermopsis raciborskii* de um reservatório de abastecimento de água potável em Palm Island, na Austrália, permitindo identificar o principal agente responsável pela “Doença da Ilha Palm” em 1979 a qual causou 148 casos de hepatoenterite (Ohtani et al., 1992). Esta cianotoxina é produzida também por diversos géneros de cianobactérias também referenciados na Tabela 1.

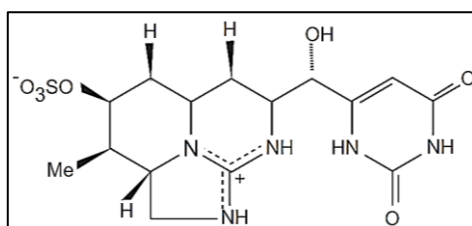


Figura 6. Estrutura química da CIN. Fonte: Carneiro e Leite, 2008.

A CIN possui elevada solubilidade em água, devido à presença de um grupo de sulfato carregado negativamente e um grupo guanidino carregado positivamente (Falconer e Humpage, 2006). Esta polaridade facilita a difusão da molécula para o exterior da célula da cianobactéria (Carson e Masten, 2000). São conhecidas pelo menos duas variantes estruturais, a 7-epicilindrospermopsina (7-epi-CIN) (Banker et al., 2000) e a 7-desoxicilindrospermopsina (7-desoxi-CIN) (Norris et al., 1999). Entretanto, recentemente foram descritas duas novas moléculas análogas, a 7-desoxi-desulfo-cilospermopsina e 7-desoxi-desulfo-12-acetilcilindrospermopsina (Wimmer et al., 2014 *apud* Machado et al., 2016).

Inibidora da síntese proteica, a CIN causa necrose no fígado e lesões em diversos outros órgãos, como os pulmões, os rins, pâncreas e a mucosa gástrica (Banker et al., 1997; Calijuri et al., 2006; Carvalho et al., 2007; Harada et al., 1994; Ohtani et al., 1992), sendo os primeiros sinais clínicos de intoxicação a falência hepática e renal (Mankiewicz et al., 2003). A CIN atua ao nível do metabolismo do citocromo P450 e em outros mecanismos celulares, sendo classificada como citotóxica (Gutierrez-Praena et al., 2013; Pearson et al., 2010; Saker et al., 2004). Também há relatos sobre a capacidade genotóxica em sistemas celulares *in vitro* (Humpage et al., 2000).

Segundo Runnegar et al. (1995) e Froscio et al. (2001), os mecanismos de toxicidade da CIN são relativamente lentos, pois a toxicidade verificada é maior após 5 dias de exposição quando comparada ao período de 24 h. A DL50 em camundongos após 24 h é de 2 mg/Kg de peso corporal, sendo que após 5 dias a DL50 passa a ser de 0,20 mg/Kg (Terão et al., 1994). Contudo, para Gácsi et al. (2009), a CIN é uma toxina de alto risco para a saúde, podendo ser até mais perigosa do que a MC. Não há ainda um limite máximo estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008) para as CINs, entretanto, no Brasil, a Portaria do Ministério da Saúde (decreto Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011) (Brasil, 2011) recomenda o valor máximo de 1,00 µg/Kg de peso corporal ou, 1 µg/L em água para consumo humano. Já Shaw et al. (2000) sugerem o limite máximo de 15 µg/L para água de consumo.

Com um crescimento elevado do número de casos de contaminações por CIN, várias questões estão sendo levantadas sobre o impacto de sua presença no meio ambiente e sua capacidade de bioacumulação nos tecidos dos organismos presentes no ambiente afetado (Saker et al., 2004; White et al., 2006), e com uma ampla distribuição geográfica, torna os humanos mais suscetíveis à contaminação em relação a outras cianotoxinas (Gutierrez-Praena et al., 2013).

Os impactos causados através das CINs não se restringe aos potenciais efeitos no Homem e bivalves, mas em muitos outros organismos expostos às cianotoxinas. Esta ideia transparece, por exemplo, nos trabalhos com plantas (Santos et al., 2015), dípteros

(Santiago, 2012), crustáceos (Metcalf et al., 2002; Nogueira et al., 2004; Saker e Eaglesham, 1999), gastrópodes (Kinnear et al., 2007) e bivalves (Puerto et al., 2011; Saker et al., 2004), que reportam efeitos adversos a vários níveis, bem como a bioacumulação destas toxinas.

Uma espécie produtora de CIN é a *Chrysosporum ovalisporum* ((Forti) Zapomelová et al., 2012) (Figura 7). Esta espécie pertence à classe Cyanophyceae, subclasse Nostocophycidae, ordem Nostocales, família Aphanizomenonaceae e género *Chrysosporum* (Guiry e Guiry, 2017). Esta cianobactéria é caracterizada por um tricoma verde-azul ligeiramente curvado, com um comprimento que varia de 0,5 -1,0 mm, estreitando para as extremidades, tendo as células 4-5 µm de diâmetro (Pollinger et al., 1998).



Figura 7. Microscopia ótica de tricomas de *C. ovalisporum*. Fonte: <http://lege.ciimar.up.pt/>.

1.3 *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

1.3.1 Caracterização e relevância ecológica-comercial

Esta espécie pertence ao filo Molusca, classe Bivalvia, ordem Mytiloida, família Mytilidae e ao género *Mytilus*. O *M. galloprovincialis* (Figura 8) é um animal com simetria bilateral, triblástico e com verdadeira cavidade corporal (celoma). Este animal atinge no máximo 15 centímetros de comprimento, e apresenta tamanhos médios de 5 a 8 centímetros. A sua fixação às rochas é realizada através de filamentos sintetizados e libertados pela glândula do bisso, localizada no pé do animal. As duas valvas protetoras fecham-se durante a maré baixa para armazenar água. Através das brânquias, estes animais filtram a água e retêm pequenas partículas orgânicas e microalgas que servem de alimento, que são transportadas até os palpos labiais e boca por meio de movimentos ciliares. A digestão e assimilação do alimento dá-se ao nível da glândula digestiva (Campbell e Nicholls, 2005; Dral, 1967; Weber et al., 1999).

Todo o alimento em excesso é eliminado através da cavidade do manto na forma de pseudofeces. Essa eliminação é feita por meio de um mecanismo de limpeza, realizado

pelos palpos labiais e brânquias e expelidas periodicamente pela contração cíclica dos músculos adutores (Jørgensen, 1981). A concha possui umbos mais pontiagudos e voltados para baixo (Campbell e Nicholls, 2005; Weber et al., 1999), apresenta diversos formatos de tamanhos e cor. Alguns indivíduos podem apresentar conchas com um padrão de estrias radiante com um fundo pálido. No entanto, a maioria das conchas são lisas, mas em algumas populações as conchas apresentam uma textura áspera, além de serem bastante grossas e resistentes (FAO, 2017a).



Figura 8. Morfologia externa de *M. galloprovincialis*.

Segundo alguns autores, o *M. galloprovincialis* pode ser uma subespécie ou forma da espécie congénere *Mytilus edulis*. As espécies apresentam distribuições geográficas diferentes, mas em algumas áreas podem coexistir. O *M. galloprovincialis* distribui-se ao longo do mediterrâneo (Figura 9) enquanto o *M. edulis*, distribui-se pela América do Norte e Europa (Figura 10) (Campbell e Nicholls, 2005; FAO, 2017a; FAO, 2017b). Salienta-se ainda a capacidade de hibridação entre as duas espécies, por coexistirem em algumas áreas, como na costa portuguesa, o que eleva o grau de variabilidade genética e por conseguinte torna a sua identificação mais difícil (Hilbish et al., 1994; Moreira, 2008; Skibinski et al., 1983).

Quanto às características nutritivas dos bivalves, estes são considerados um dos alimentos mais saudáveis e completos, pois apresentam importantes elementos nutricionais essenciais para uma alimentação adequada. Os mexilhões, portanto, ocupam uma posição importante na alimentação para a dieta humana (Moreira, 2008). Neste sentido estes animais têm um importante valor comercial, sendo notório o investimento no seu cultivo (aquicultura). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization*, 2017c), entre 1959 e 2014 a produção de mexilhões passou de 3.830 toneladas para mais de 116.200 toneladas. Esta importante fonte de alimento requer, no entanto, a implementação de programas de monitorização e vigilância sanitária (Vasconcelos, 1995). Os mexilhões marinhos são ainda bons indicadores ambientais, pois são utilizados na biomonitorização da poluição marinha,

análise de biotoxinas, fitoplâncton nocivo e para a presença de contaminação microbiológica (*E. coli*)².

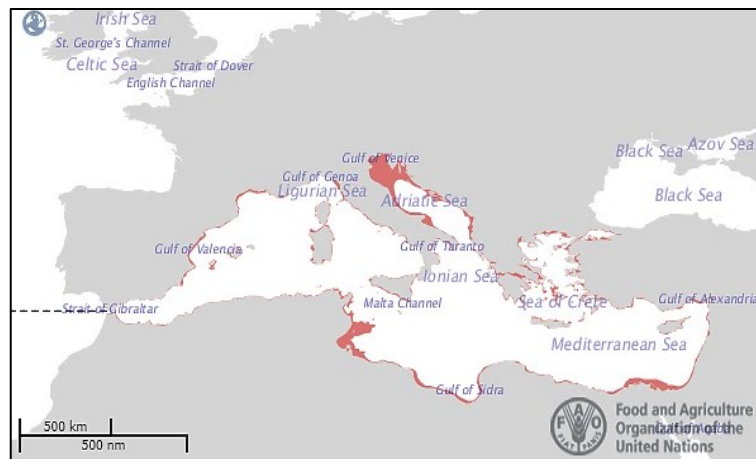


Figura 9. Distribuição geográfica de *M. galloprovincialis*. Fonte: FAO, 2017a.

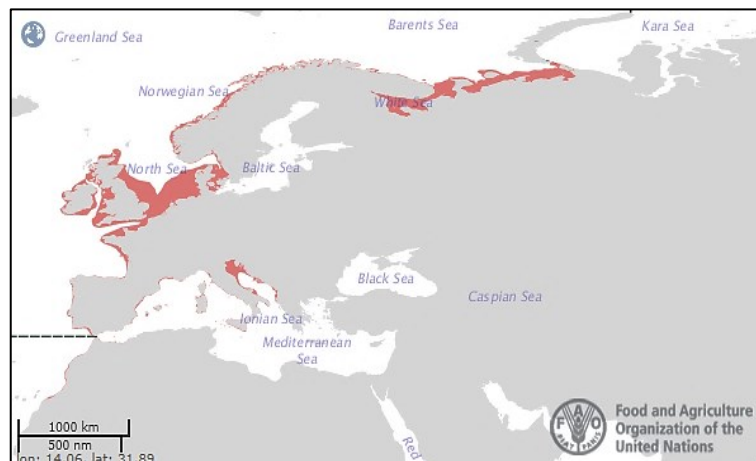


Figura 10. Distribuição geográfica de *M. edulis*. Fonte: FAO, 2017b.

Segundo Kautisky e Evans (1987), os mexilhões desempenham um papel importante na cadeia trófica marinha, pois são filtradores com a capacidade de “limpar” a água, removendo diversos organismos e partículas presentes na água. Atuam ainda como micro-habitat de diversas outras espécies, além de serem uma importante fonte de alimento para diferentes tipos de animais terrestres e aquáticos. Outra característica ecológica importante destes animais está associada à excreção de nutrientes que estarão disponíveis para a vida vegetal (biodeposição). As funções ecológicas que esta espécie desempenha, bem como os múltiplos usos explorados pelo homem, podem estar ameaçados pela degradação do ambiente, pelos efeitos da poluição e dos contaminantes emergentes.

² <https://www.ipma.pt/pt/pescas/bivalves/> acedido em julho de 2017.

1.3.2 Dinâmica e efeitos de MCs e CINs

Embora as cianotoxinas como a CIN e MC sejam produzidas por cianobactérias de água doce e por isso os locais de presença destas toxinas são sobretudo as águas interiores, o facto é que os fluxos hídricos dos rios têm transportado estes contaminantes naturais para zonas a jusante em direção aos estuários e zonas costeiras, implicando a contaminação da fauna destes habitats (Domínguez-Péres et al., 2017; Gible et al., 2016). Neste processo o mexilhão marinho tem sido apontado como sendo um importante vetor de cianotoxinas (como a MC) na cadeia trófica marinha (Miller et al., 2010). No entanto, existe ainda uma grande lacuna no conhecimento relativo à dinâmica de acumulação destas toxinas nos mexilhões e nos invertebrados filtradores marinhos, bem como sobre os efeitos adversos que estas toxinas produzem nestes grupos de animais. Segundo Amorim e Vasconcelos (1999), os dados obtidos a partir de experiências laboratoriais mostram que os moluscos bivalves são tolerantes às toxinas de cianobactérias. Este facto conduz à hipótese de que estes organismos possuem mecanismos de desintoxicação que podem evitar a ação das toxinas.

No estudo realizado por Puerto et al. (2011), foram observadas alterações ao nível do proteoma das brânquias e glândula digestiva do mexilhão marinho *M. galloprovincialis*, quando exposto a cianobactérias produtoras e não produtoras de CIN. Também foram registadas alterações na atividade de enzimas como a Glutathione S-Transferase (GST) e Glutathione Peroxidase (GPx), que sugerem stress fisiológico e provável lesão nos tecidos do animal. Alterações no aumento da GST também foram reportadas por Fernandes (2008), quando o mexilhão marinho *M. galloprovincialis* foi exposto à cianobactéria tóxica *M. aeruginosa*. Já Freitas et al. (2016) avaliaram as mudanças na concentração de CIN em mexilhões de acordo com o tempo de armazenamento (congelamento) deste alimento e forma de processamento para consumo humano (tempo de cozedura), observando maiores concentrações de CIN (aumento da biodisponibilidade) nas amostras congeladas.

Os riscos significativos aqui apontados, relativos à exposição destes animais marinhos às cianotoxinas, e que podem ser de natureza ecológica, mas também de natureza económica e de segurança alimentar, devem ser devidamente identificados e resolvidos, necessitando-se para isso de mais investigação e conhecimento.

1.4 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho consistiu em avaliar a tolerância do mexilhão marinho *M. galloprovincialis* às cianobactérias tóxicas *M. aeruginosa* e *C. ovalisporum*, que estão apontadas como contaminantes emergentes em zonas salobras e costeiras, em climas temperados, bem como identificar qual a espécie de cianobactéria mais tóxica para o mexilhão marinho e determinar o papel da depuração na recuperação da condição fisiológica dos mexilhões. Para tal, neste trabalho foram utilizadas técnicas para avaliar os parâmetros fisiológicos (produção de bisco, taxa de filtração e peso seco) e bioquímicos (proteína total e glicogénio total) do *M. galloprovincialis* quando exposto, em condições de laboratório, a culturas de *M. aeruginosa* e *C. ovalisporum*. Os parâmetros bioquímicos foram selecionados para reportar o consumo das reservas energéticas no animal. Estas mesmas reservas energéticas estão diretamente correlacionadas com o esforço metabólico e o stress fisiológico do animal. Para concretizar este trabalho estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- Produção de cultura de cianobactérias com densidade celular similar à encontrada na natureza (1×10^5 células/mL);
- Estimar a produção de bisco(s) quando exposto a densidade celular produzida;
- Estimar a taxa de filtração de cianobactérias através da contagem de número de células em tempos controlados e volume fixo de água;
- Estimar o crescimento do mexilhão marinho através do peso seco e em relação as diferentes condições experimentais;
- Estimar a proteína total para verificar alterações devido os efeitos tóxicos das cianotoxinas;
- Estimar o glicogénio total para verificar alterações devido os efeitos tóxicos das cianotoxinas.

2 Materiais e Métodos

A descrição dos métodos está dividida em subsecções de acordo com a cronologia das atividades executadas, ou seja, do cultivo de microalgas até à exposição dos organismos e subseqüentes análises fisiológicas e bioquímicas. Durante a realização de todos os trabalhos, as normas de higiene e de biossegurança foram seguidas em sua integridade, a fim de garantir a segurança humana e confiabilidade dos resultados.

2.1 Cultivos de microalgas

Para o estudo foram utilizadas três estirpes de microalgas que foram disponibilizadas da coleção de culturas do BBE (LEGE-CC, <http://lege.ciimar.up.pt/>). As microalgas fornecidas foram as seguintes: a microalga verde (não tóxica) *P. kessleri* (LEGE Z-001) e duas cianobactérias produtoras de toxinas: *M. aeruginosa* (LEGE 91094) e *C. ovalisporum* (LEGE X-001), que foram cultivadas em meio Z8 (protocolo LEGE Z8 Medium – Anexo I), utilizando água desionizada e autoclavada, preparado em câmara de fluxo laminar, em condições estéreis, tal como descrito por Campos et al. (2013).

Para realizar os cultivos, todos os materiais utilizados foram previamente autoclavados (modelo Autoclave 3870 ELV) em ciclo pré-estabelecido (120°C durante 15 minutos) e os equipamentos para inoculação e preparação foram esterilizados com lâmpada germicida (UV) em câmara de fluxo laminar (marca CRUMA), durante 30 minutos antes da preparação de cada trabalho. Em todas as etapas de obtenção de biomassa, os cultivos permaneceram em câmara de crescimento a condições controladas de temperatura de 26°C $\pm$ 1°, com fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro), a uma luminosidade de 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os procedimentos executados para produção (crescimento) foram realizados em 3 fases, sempre com a inoculação em câmara de fluxo laminar.

A primeira fase consistiu na transferência de 10 mL das culturas stock para novos frascos de cultura com 30 mL de meio Z8. As culturas permaneceram durante 10 dias em crescimento. A segunda fase ocorreu após o período de crescimento inicial. Foram utilizados erlenmeyers de 1000 mL, vedados com rolhas de algodão e cobertos com papel de alumínio, contendo 450 mL de meio Z8 e adicionado 40 mL de cultura (Figura 11).

Depois de 20 dias de crescimento, as culturas em erlenmeyer (Figura 11) foram transferidas para balões de vidro de 5 L, com 4,5 L de meio Z8 e com arejamento contínuo por bomba de arejamento, e utilizado filtro para o ar de 0,20 μm a fim de evitar contaminações. Por fim, após 20 dias de crescimento, as culturas foram transferidas para balões de 20 L (marca *Thermo Scientific* – Nalgene) e arejamento contínuo (também

utilizando filtro para ar), com 15 L de meio Z8 (Figura 11). Este processo foi realizado a fim de obter biomassa suficiente para o bioensaio.

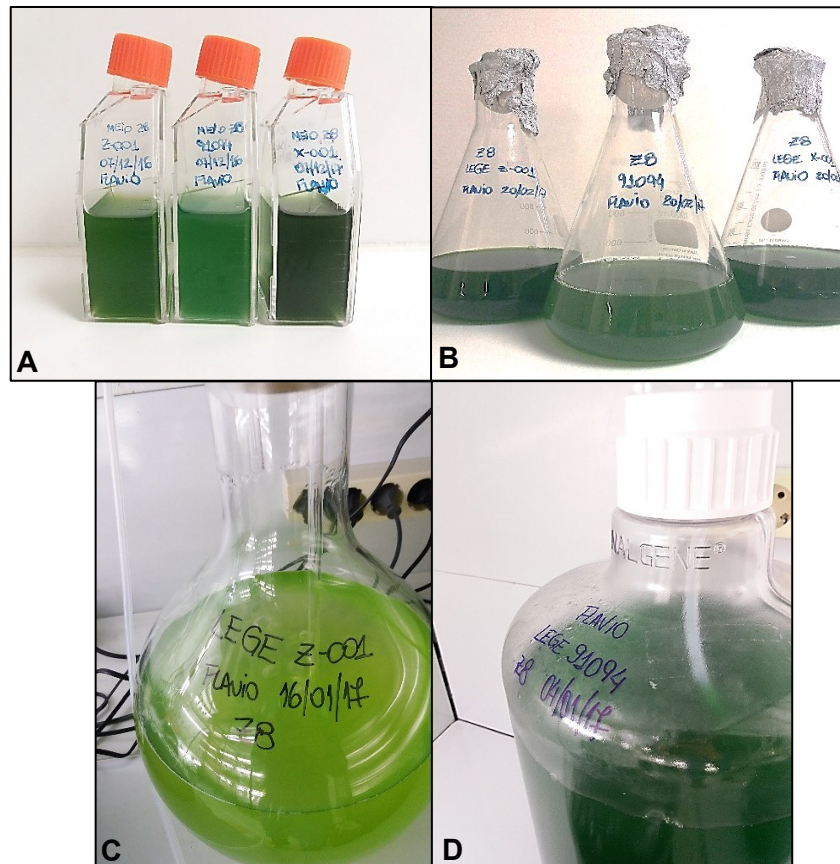


Figura 11. Aumento gradual de escala de volumes para a produção em massa de microalgas. A) 40 mL. B) 450 mL. C) 5 L. D) 20 L.

2.2 Quantificação da densidade celular

Para o posterior uso das culturas de microalgas e realização do bioensaio foi necessário proceder à quantificação da densidade celular das mesmas. Esta quantificação foi realizada antes de cada período de amostragem e para cada cultura.

Para determinar o número de células por unidade de volume da cultura, foi utilizado a câmara de contagem Neubauer (marca Brand) e microscópio binocular (marca Leica, modelo DM LB 305). A ampliação da objetiva utilizada para quantificar as microalgas *P. kessleri* e *M. aeruginosa* foi de 100x, já para *C. ovalisporum* foi utilizado uma objetiva com ampliação de 1000x. Esta câmara possui nove quadrados maiores, sendo que a contagem celular foi realizada nos quatro quadrados indicados com a letra "L" (Figura 12).

Durante quantificação celular utilizaram-se alíquotas das culturas previamente ressuspensas, por agitação manual, a fim de se obter uma amostra homogênea e representativa da densidade celular. Com auxílio de uma pipeta de Pasteur de 3 mL, uma

alíquota foi colocada nas duas áreas demarcadas da câmara de Neubauer até o preenchimento das áreas. A contagem foi visual e com auxílio de um contador manual (marca Landilab).

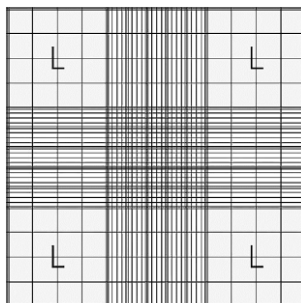


Figura 12. Câmara de Neubauer e os quadrantes indicados por "L" onde a quantificação de células foi realizada. Fonte: Catalog.brand.de.

A contagem das células foi realizada nos 4 quadrantes indicados e segundo o seguinte cálculo para determinar o número de células/mL da cultura:

$$\left(\frac{L1 + L2 + L3 + L4}{4} \right) \div 0,0001 = \text{número células/mL}$$

2.3 Extração e quantificação de toxinas em cianobactérias

A quantidade de toxina presente nas células de *M. aeruginosa* e *C. ovalisporum* antes do início do bioensaio, foi realizada por cromatografia líquida de alta performance integrado a um detetor de fotodíodos (HPLC-PDA) conforme descrito a seguir.

Para extrair a MC-LR de *M. aeruginosa*, utilizou-se um procedimento semelhante ao executado por Pinheiro et al. (2013). Uma alíquota de 50 mL da cultura em crescimento foi transferida para tubos de plástico com MeOH (metanol a 50%, v/v) e a lise celular realizada por ultrassons (marca Sonics e Materials, modelo vibra cell), em banho de gelo, durante 5 minutos a 60 Hz, com intervalos de 30 segundos entre cada minuto. Esta mistura permaneceu sempre em gelo para evitar aquecimento da amostra e alteração/degradação do material biológico. Esse procedimento foi seguido de 3 tratamentos de congelamento e descongelamento a -80°C, sendo confirmado o rompimento da parede celular ao microscópio. Em seguida, o material foi centrifugado (marca Thermo, modelo Sorvall Legend RT) a 4495 g e 4°C, durante 10 minutos, para remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi acondicionado no rotavapor (modelo Büchi vacuum controller V-850) para evaporação do metanol. Após este processo, a amostra foi liofilizada (marca Telstar, modelo Lyoquest 55) durante 7 dias, a fim de se remover toda a água da amostra e por fim, submetida a análise por HPLC-PDA (método descrito na subseção 2.3.1).

A extração da CIN de *C. ovalisporum* foi baseada no método de Welker et al. (2002). Uma alíquota de 50 mL da cultura em crescimento foi condicionada em um coletor universal estéril, armazenando-o a -80°C durante 2 dias. Após esse período, a amostra foi acondicionada no liofilizador durante 7 dias até obtenção da biomassa. Em seguida, o material liofilizado foi pesado utilizando uma balança analítica (marca Sartorius). De seguida foi adicionado 5 mL de solução de água ultrapura com 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) junto ao material liofilizado, formando uma mistura. O processo de homogeneização e centrifugação foram idênticos ao realizado para *M. aeruginosa* (por ultrassons e centrifuga, respetivamente). O sobrenadante foi transferido para tubo de vidro. Ao resíduo sólido formado, foi adicionado mais 2,50 mL de solução de água ultrapura com 0,1% de TFA, e o procedimento de extração repetido para obter um maior rendimento na extração de CIN. Por fim, a quantificação de toxinas presente na amostra foi realizada por HPLC-PDA (método descrito na subseção 2.3.2).

2.3.1 Quantificação de MC-LR por HPLC-PDA

O material extraído de *M. aeruginosa* (descrito na seção 2.3) foi quantificado de acordo com o método descrito por Ramanan et al. (2000) e reproduzido por Campos et al. (2013), Pinheiro et al. (2013) e Santos (2014). Inicialmente foi preparado o solvente de extração que consiste em metanol (A) e água ultrapura MilliQ (B), ambos acidificados com 0,1% de TFA, filtrados com filtros de 0,20 µm e degaseificados por imersão em banho de ultrassons.

A quantificação da toxina foi realizada no sistema HPLC-PDA (modelo Waters Alliance e2695, software Empower Waters) e com uma coluna de fase reversa (marca Merck, modelo Lichrospher C18) de 250 mm por 4,6 mm i.d., 5 µm, mantida a 40°C. Os parâmetros a serem ajustados para a eluição linear de gradiente consiste no início (zero minutos) em 55% de A e 45% B. Em seguida, para os 5 minutos, altera para 65% de A e 35% de B. Aos 10 minutos, 80% de A e 20% B e, aos 15 minutos com 100% de A. Por fim, dos 15 aos 20 minutos, utilizou 55% de A e 45% de B para voltar às condições do início da coluna. O volume de injeção foi de 20 µL com fluxo fixo de 0,9 mL/min e comprimento de onda ajustado para 238 nm. O pico presente no cromatograma (ver seção 3 Resultados) referente à toxina MC-LR foi identificado por comparação com o padrão comercial (lote nº 018K1209; 10,025 µg/mL MC-LR 98 % de pureza em MeOH, Cyano Biotech GmbH). A calibração do sistema foi realizada com 7 concentrações do padrão (0,33; 0,55; 1,50; 2,50; 3,20; 9,20 e 18,00 µg/mL) diluídas em metanol 50% (v/v), construindo uma reta de calibração $y = 44395x - 2155.6$, $R^2=0,9997$.

2.3.2 Quantificação de CIN por HPLC-PDA

A quantificação do material extraído de *C. ovalisporum* (descrito na seção 2.3) foi realizada no mesmo sistema HPLC-PDA utilizado para a quantificação da MC-LR. O procedimento realizado foi baseado no descrito por Campos et al. (2013) e Pinheiro et al. (2013). Inicialmente foi preparado o solvente de extração A e B, também filtrados e desgaseificados. O tipo de coluna e parâmetros de injeção também foram os mesmos utilizados para quantificar a MC-LR. O volume de injeção foi de 10 µL com fluxo fixo de 0,9 mL/min e comprimento de onda ajustado para 262 nm. O pico presente no cromatograma (ver seção 3 Resultados) referente à toxina CIN foi identificada por comparação com o respetivo padrão interno (grau de pureza de 95% em MeOH). A calibração do sistema foi realizada com 7 concentrações do padrão (0,30; 0,35; 0,90; 1,80; 3,20; 5,50 e 22,00 µg/mL) diluídas em metanol 50% (v/v), construindo uma reta de calibração $y = 14629x - 859.49$, $R^2=0,9998$.

2.4 Bioensaio

Com este bioensaio pretendeu-se avaliar os efeitos das cianobactérias tóxicas no sistema fisiológico dos mexilhões selvagens. Os tratamentos realizados consistiram na exposição (alimentação) dos mexilhões a células vivas de *M. aeruginosa* e *C. ovalisporum*, com densidade de 1×10^5 células/mL. O início da exposição (bioacumulação) foi denominado como tempo zero (T0), após o início seguiram-se mais 4 amostragens (T1-T4) com 7 dias de intervalo, cobrindo ambas as fases do ensaio, a exposição e depuração. Os seguintes parâmetros fisiológicos e bioquímicos foram registados, para cada tempo de amostragem: peso seco dos mexilhões, taxa de filtração, produção de bisso, proteína total e glicogénio. De seguida descreve-se em detalhe cada uma das etapas do bioensaio.

2.4.1 Colheita dos mexilhões

Foram recolhidos 800 exemplares de *M. galloprovincialis* (durante o mês de fevereiro) na Praia da Memória (Amorim e Vasconcelos, 1999; Puerto et al., 2011) (Figura 13), localizada na latitude 41.23041568 e longitude -8.72195363. A Praia da Memória está localizada na costa norte de Portugal, onde as temperaturas da água variam de 13°C a 17°C. A salinidade nesta zona da costa Portuguesa encontra-se entre 30 e 35 ‰. O pH encontra-se entre os valores de 7,5 e 8,5 (Weber et al., 1999).

Os exemplares foram medidos com paquímetro (marca MC), apresentando um comprimento variável de 60 mm $\pm$ 15 mm. Os mexilhões foram transportados em caixa térmica com água do mar até ao laboratório e limpos, para remover todo material aderido às conchas, como pequenos invertebrados e algas.

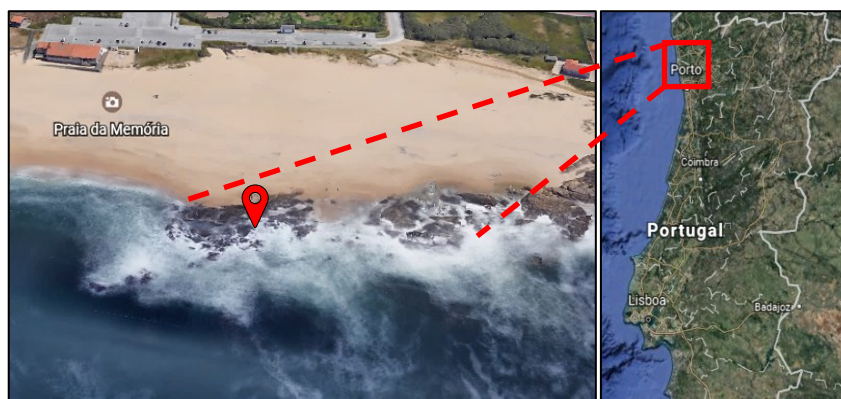


Figura 13. Praia da Memória (Fonte: Google Earth). Ponto de colheita indicado em vermelho.

2.4.2 Parâmetros físico-químicos (água)

Durante todos os dias no período da manhã os parâmetros físico-químicos da água dos aquários foram registados, a fim de identificar possíveis alterações. Para aferir a salinidade da água utilizou-se o refratómetro (resolução de 1,0 e capacidade de 0 – 100). Com a sonda de pH (marca Intellical PHC101) aferiram-se os valores de temperatura e pH. A água utilizada foi água natural do mar filtrada. Esta água é recebida no CIIMAR em grandes reservatórios, aguardando por aproximadamente 24h para decantar todos os sedimentos dissolvidos. Posteriormente a água é transferida para os tanques de distribuição, onde passa por dois tipos de filtros antes de ser distribuída para os laboratórios. Os filtros têm poros de 2 dimensões, o primeiro apresenta poros de 100 μ m e o segundo poros de 25 μ m.

2.4.3 Período de aclimação

Após a limpeza, os mexilhões foram distribuídos aleatoriamente por 8 aquários até totalizar 93 em cada aquário, sendo que os restantes (56 organismos) foram mantidos em um aquário extra (estoque) (Figura 14). Os aquários de vidro transparente, com 30 L de água salgada (do mar) e arejamento contínuo (Amorim e Vasconcelos, 1999; Puerto et al., 2011) foram preparados dez dias antes, onde foram limpos com lixívia e sabão neutro não residual. O sistema de arejamento foi implementado utilizando mangueiras de plástico e pedra difusora (marca Hobby *Dohse Aquaristik*, 50xØ18 mm).

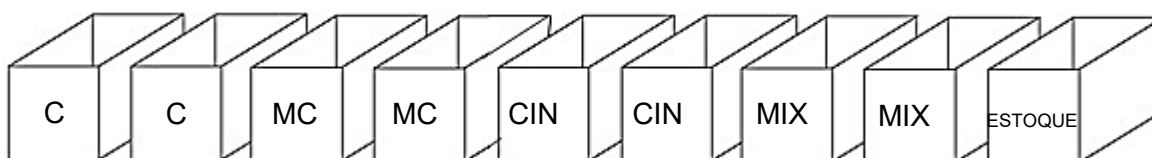


Figura 14. Disposição dos aquários. C (Controlo = *P. kessleri*); MC (*M. aeruginosa*); CIN (*C. ovalisporum*); MIX (*M. aeruginosa* + *C. ovalisporum*).

Cada aquário permaneceu com os animais durante 21 dias para se aclimatarem às condições de laboratório, alimentando-os e renovando totalmente a água a cada 48 horas. Durante este período de aclimação foi administrado alimento que consistiu em 100 mL de cultura de *P. kessleri*, perfazendo uma densidade de 1×10^5 células/mL nos aquários. Durante a fase de aclimação a temperatura permaneceu a $15^\circ\text{C} \pm 2^\circ$, a salinidade a $34 \pm 2\text{‰}$, o pH a $7,90 \pm 0,10$ e o oxigénio dissolvido a $8,00 \pm 0,50$ mg/L. Os animais que morreram neste período foram removidos e repostos a partir do aquário extra (estoque). Os aquários foram iluminados por luz natural.

2.4.4 Cálculo do volume de água e alimento

Para garantir as mesmas condições de exposição e alimentação ao longo de todo o ensaio, tendo em conta que a cada sete dias, ou seja, nos períodos de amostragem, dezasseis animais eram removidos dos aquários, houve necessidade de calcular e ajustar o volume de água dos aquários e de alimento a administrar em cada aquário, tal como descrito na Tabela 2. Assim a quantidade de água limpa a adicionar a cada aquário depois de cada amostragem foi sendo progressivamente menor, para manter o mesmo volume de água por animal (322 mL) (Tabela 2).

Tabela 2. Correção do volume de água a cada período de amostragem

Período	mL por aquário	Exemplares por aquário	mL por exemplar
Aclimação	30.000	93	322
T0	28.300	88	
T1	23.200	72	
T2	18.000	56	
T3	12.900	40	
T4	7.700	24	

Para calcular o volume de culturas de microalgas a adicionar aos aquários recorreu-se à contagem celular tal como descrito na seção 2.2, de forma a garantir uma densidade final de 1×10^5 células/mL de microalgas nos aquários.

2.4.5 Procedimento para exposição e depuração dos mexilhões

Depois de 21 dias de aclimação do mexilhão às condições de laboratório, iniciou-se a fase de exposição às cianobactérias, sendo que cada tratamento foi replicado em 2 aquários (Figura 14) tendo por base o trabalho anterior de Puerto et al. (2011). Cada tratamento realizou-se a uma densidade celular de 1×10^5 células/mL de *P. kessleri*, *M. aeruginosa*, *C. ovalisporum*, ou da mistura das duas cianobactérias (*M. aeruginosa* + *C. ovalisporum*). Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, com horário fixo, às 09:00h e às 21:00h, durante 14 dias.

Finalizado o período de exposição, todos os aquários e os restantes animais foram lavados com água do mar limpa, a fim de remover quaisquer resíduos da presença das cianobactérias e cianotoxinas. Os aquários voltaram a receber água do mar limpa para dar início à fase de depuração. Nesta fase os animais foram alimentados com a microalga não tóxica *P. kessleri* durante 14 dias, mas mantendo-se as restantes condições utilizadas durante a fase de exposição, incluindo o horário e frequência para a alimentação.

2.4.6 Amostragem do material biológico

Durante os períodos de amostragens T0, T1, T2, T3 e T4 foram recolhidos mexilhões para a realização de diferentes análises, tal como descrito na Tabela 3. Com vista a uma futura análise de proteómica foram recolhidos três exemplares por aquário em cada tempo de amostragem. Nesta etapa as brânquias e a glândula digestiva (Figura 15) foram removidas, armazenadas separadamente em microtubos de 2 mL, congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C .

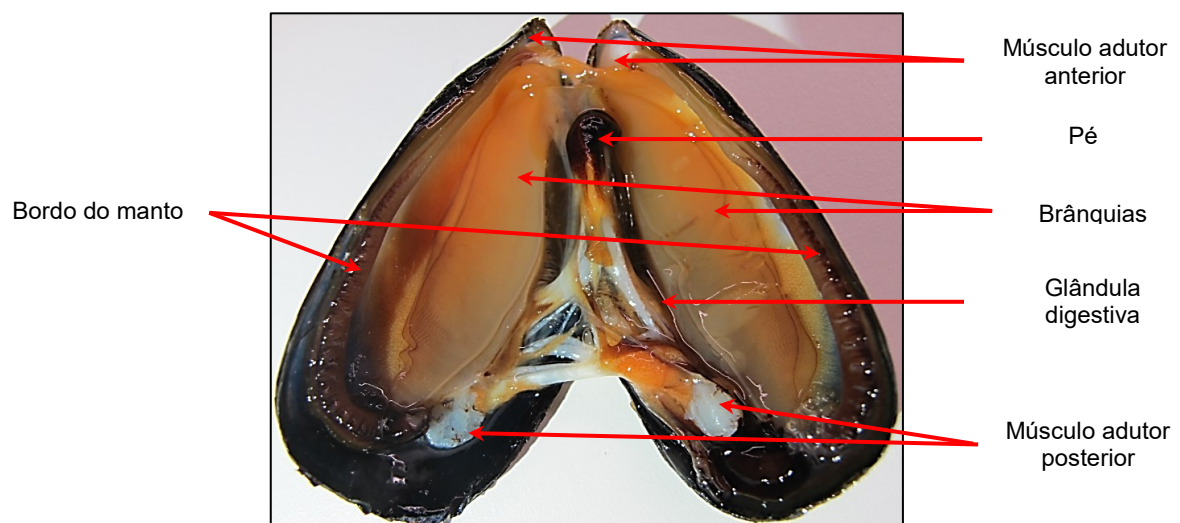


Figura 15. Morfologia interna de *M. galloprovincialis*

Tabela 3. Número de organismos utilizados nas amostragens realizadas

Ensaio	Organismos por aquário	Total de organismos por tratamento*	Total de organismos por amostragem**
Proteômica	3	6	24
Quantificação toxinas	8	16	64
Parametros Fisiológicos e Bioquímicos	5	10	40

* Valor para cada tratamento de *P. kessleri*, *M. aeruginosa*, *C. ovalisporum* e Mix;

** Valor para cada amostragem: T0; T1; T2; T3 e T4.

Para o cálculo dos diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos abordados neste trabalho, foram recolhidos 10 animais por tratamento e tempo de amostragem. Estes animais foram inicialmente utilizados para o cálculo das taxas de filtração (n=10) e produção de biscoitos (n=10), e posteriormente para o cálculo dos pesos fresco (n=10) e seco (n=10), proteína (n=5) e glicogénio (n=5) totais, tal como descrito nas seguintes secções.

Ainda com vista a uma futura análise de toxinas acumuladas foram recolhidos 8 animais por aquário. Os tecidos moles de cada animal foram dissecados e agrupados em conjuntos equivalentes a 4 animais. Os tecidos moles foram pesados e subsequentemente armazenados a -80°C.

2.5 Parâmetros fisiológicos

2.5.1 Peso seco

Para o cálculo do peso seco os animais foram dissecados, sendo os tecidos moles separados das valvas, em gelo, e pesados em balança analítica. Os tecidos de cada animal foram subsequentemente armazenados individualmente a -80°C. Após 5 dias de congelamento, as amostras foram liofilizadas por 7 dias. Por fim, realizou-se novamente a verificação do peso do material já liofilizado (peso seco dos tecidos). Este material foi ainda aproveitado para a quantificação de proteína total e glicogénio (secções 2.6.1 e 2.6.2, respetivamente).

2.5.2 Determinação da taxa de filtração

Para o cálculo das taxas de filtração, 10 mexilhões foram recolhidos dos aquários do bioensaio (5 de cada aquário duplicado), escolhidos de forma aleatória. Os animais foram limpos com água salgada. Os animais foram dispostos em frascos de vidro com 300 mL de água do mar e arejamento contínuo (Figura 16). Com auxílio de um paquímetro

foram registadas as dimensões de cada animal (comprimento e largura). A transferência dos animais do aquário para os frascos foi realizada 24 horas antes do ensaio para determinar a taxa de filtração, com o objetivo de permitir a sua aclimação às novas condições de manutenção. Os mexilhões foram mantidos sem qualquer alimento durante este período de aclimação.

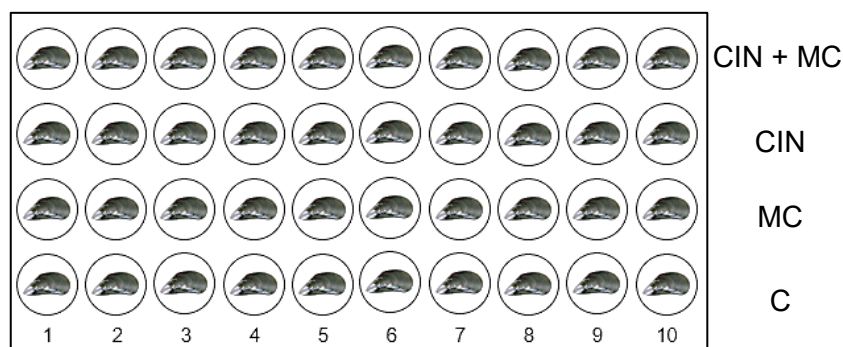


Figura 16. Vista superior do desenho experimental utilizado para o cálculo da taxa de filtração.

Após as 24 horas de aclimação, os animais foram expostos às mesmas microalgas (1×10^5 células/mL) a que foram expostos durante o bioensaio. Foram realizadas quatro amostragens de água de cada frasco, com intervalos de tempo de cinco minutos, com pipeta Pasteur, diretamente para placas para armazenamento. Em laboratório, foram realizadas quantificações da densidade das microalgas livres, ou seja, as que estavam aglomeradas com presença de muco (pseudofeces) não foram contabilizadas. O procedimento para contagem é o mesmo descrito na seção 2.2, porém, foram realizadas contagens em apenas três quadrantes (L) da câmara de Neubauer, segundo a fórmula:

$$\left(\frac{L1 + L2 + L3}{3} \right) \div 0,0001 = \text{número células/mL}$$

Por fim, os valores foram convertidos para obter a taxa de filtração, mediante algoritmo de Jørgensen (1990) (*apud* Sylvester et al., 2005):

$$F = V \cdot \frac{\log C_{ic} - \log C_f}{T}$$

Onde:

F = taxa de filtração (em mL/ind.h)

C_{ic} = concentração inicial (células/mL)

C_f = concentração final (células/mL)

V = volume de água na câmara experimental (em mL)

T = tempo total de filtração (em horas)

2.5.3 Determinação da produção de bissos

Após a determinação da taxa de filtração, foi realizada contagem (visual) do número de bissos formados por cada animal mantido nos frascos de vidro. Apenas se determinou o número de bissos novos, produzidos no intervalo de 24 horas. Os animais foram seguidamente removidos dos frascos e utilizados para o cálculo dos respetivo peso seco e análises bioquímicas.

2.6 Parâmetros bioquímicos

2.6.1 Quantificação de proteína total

Para extrair a proteína total, uma fração de 0,04 g ($\pm 0,0005$ g) de peso seco de tecido de cada mexilhão, previamente macerado e homogeneizado usando um moinho de café, foi transferido individualmente para microtubos de 2,0 mL. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução tampão fosfato com pH 7,4 em cada microtubo. A mistura foi homogeneizada por ultrassons realizando 3 ciclos de 10 segundos a 60 Hz, com intervalos de 5 segundos, mantendo a amostra em gelo. Todas as amostras foram centrifugadas a 16.000 g e 4°C por 20 minutos (marca VWR, modelo Micro Star 17R). O sobrenadante foi armazenado em novo microtubo devidamente identificado.

A quantificação de proteína total foi realizada segundo o método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando um reagente comercial (marca Bio-Rad Protein Assay) preparado na proporção de 1:5 (v/v) com água ultrapura. Como padrão para a quantificação de proteína foi utilizada albumina do soro bovino (ASB) (marca Sigma, $\geq 98\%$ agarose gel electrophoresis), preparado em uma concentração stock: 1 mg/mL. Na Tabela 4 estão descritas as concentrações finais do padrão de proteína utilizadas, construindo uma reta de calibração $y = 0,9094x + 0,4007$, $R^2=0,9863$. A quantificação da proteína foi realizada em microplaca, sendo a preparação da mesma descrita na Tabela 5. Por último adicionou-se 250 μ L do reagente de Bradford comercial diluído (1:5, v/v) a cada poço da microplaca. Incubou-se a mistura à temperatura ambiente durante 15 minutos.

Tabela 4. Padrões usados para determinar a reta padrão de concentração de proteína.

	Concentração (mg/mL)	Padrão (μ L)	H ₂ O Destilada (μ L)
P0	0,00	0	10
P1	0,20	2	8
P2	0,50	5	5
P3	1,00	10	0

Tabela 5. Esquema utilizado para quantificação de proteína total em microplaca de 96 poços.

	Vazio	Padrão 0	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3		
	1	2	3	4	5	6	7	8	...	12
A	Vazio	10 µL de H ₂ O UP	2 µL de sol. globulina + 8 µL de H ₂ O UP	5 µL de sol. globulina + 5 µL de H ₂ O UP	10 µL de sol. globulina	10 µL de amostra + 90 µL de tampão fosfato	10 µL de amostra + 90 µL de tampão fosfato	10 µL de amostra + 90 µL de tampão fosfato		
B	Vazio	10 µL de H ₂ O UP	2 µL de sol. globulina + 8 µL de H ₂ O UP	5 µL de sol. globulina + 5 µL de H ₂ O UP	10 µL de sol. globulina	10 µL de amostra diluída*	10 µL de amostra diluída*	10 µL de amostra diluída*		
C	Vazio	10 µL de H ₂ O UP	2 µL de sol. globulina + 8 µL de H ₂ O UP	5 µL de sol. globulina + 5 µL de H ₂ O UP	10 µL de sol. globulina	10 µL de amostra diluída*	10 µL de amostra diluída*	10 µL de amostra diluída*		
D	Vazio	10 µL de H ₂ O UP	2 µL de sol. globulina + 8 µL de H ₂ O UP	5 µL de sol. globulina + 5 µL de H ₂ O UP	10 µL de sol. globulina	10 µL de amostra diluída*	10 µL de amostra diluída*	10 µL de amostra diluída*		
E										
H										

Nota 1: em A6; A7 e A8: diluição de 1:10 (amostra/água).

Nota 2: as amostras foram retiradas do sobrenadante separado após a centrifugação.

* Amostra diluída corresponde à solução em A6, A7 e A8 respetivamente.

Após os 15 minutos realizou-se a leitura em espectrofotômetro (marca BioTek, modelo Synergy HT) com a utilização do software Gen5 2.00.18, a uma absorvância de 595 nm. Os resultados obtidos foram analisados em Excel.

2.6.2 Quantificação do glicogénio total

Para extrair o glicogénio total, uma fração de 0,04 g ($\pm 0,0005$ g) de peso seco de tecido de cada mexilhão, previamente macerado e homogeneizado usando um moinho de café, foi transferida individualmente para microtubos de 2,0 mL e adicionado 1 mL de solução tampão fosfato. Esta solução foi preparada com pH 7,0 a 50 mM e com Triton X-100 a 0,1% (v/v) (marca Sigma Aldrich). A mistura foi homogeneizada por ultrassons por 20 segundos a 60 Hz, mantendo-se a amostra em gelo para evitar o aquecimento. Todas as amostras foram centrifugadas a 10.000 g e 4°C por 10 minutos (marca VWR, modelo Micro Star 17R). O sobrenadante foi armazenado em novo microtubo devidamente identificado.

A quantificação do glicogénio foi realizada segundo o método colorimétrico de Dubois et al. (1956) e citado por Albalasmeh et al. (2013), com pequenos ajustes para as amostras de *M. galloprovincialis*. Este método baseia-se em desidratar os hidratos de carbono por reação com ácido sulfúrico concentrado, produzindo derivados de furfuróis. A

reação adicional entre os derivados de furfuróis e o fenol produzem a cor detetável por espectrofotometria (Albalasmeh et al., 2013). Todo o trabalho foi realizado em hotte de química por questões de segurança laboratorial.

Como padrão para a quantificação de glicogénio foi utilizado o reagente d-(+)-Glucose (marca Sigma, grau de pureza superior a 99,5%), preparado nas 2 concentrações stock: 1 mg/mL e 5 mg/mL. Na Tabela 6 estão descritas as concentrações finais do padrão de glucose utilizadas, construindo uma reta de calibração $y = 0,6316x - 0,082$, $R^2=0,9808$. Para a quantificação do glicogénio nas amostras biológicas foi utilizado ácido sulfúrico a 97% e fenol a 5% (v/v).

Tabela 6. Padrões usados para determinar a reta de concentração de glucose.

	Concentração (mg/mL)	Padrão (μL)	H ₂ O Destilada (μL)
P0	0,00	0*	2000
P1	0,10	200*	1800
P2	0,40	800*	1200
P3	1,00	2000*	0
P4	2,00	800**	1200
P5	3,00	1200**	800
P6	4,00	1600**	400
P7	5,00	2000**	0

* Solução stock de 1 mg/mL d-(+)-Glucose

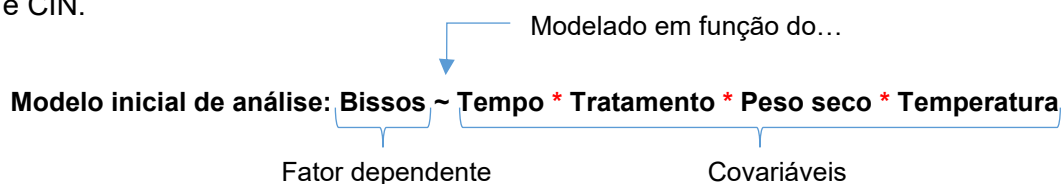
** Solução stock de 5 mg/mL de d-(+)-Glucose

Adicionou-se em novos microtubos de 2 mL devidamente identificados, uma alíquota de 10 μL de amostra (não diluída – sobrenadante obtido da centrifugação). Em seguida, juntou-se a cada microtubo 100 μL de fenol a 5% e por fim, 600 μL de ácido sulfúrico puro. A mistura foi homogeneizada por agitação e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após incubação, o conteúdo no microtubo foi transferido para uma microplaca de 96 poços onde se realizou a leitura em espectrofotômetro (BioTek, Synergy HT) com a utilização do software Gen5 2.00.18, por absorvância a 492 nm. Os resultados obtidos foram analisados em Excel.

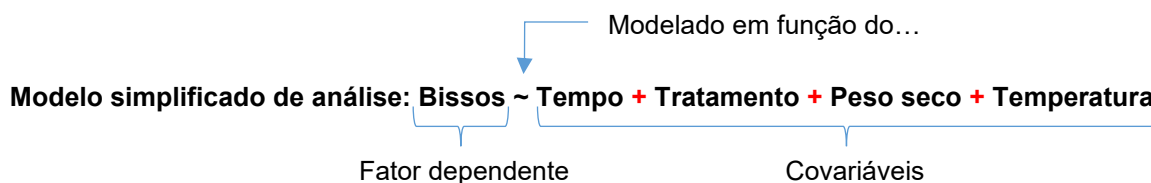
2.7 Análise estatística

Para interpretação dos dados deste trabalho foi utilizado análise estatística através do Programa de Estatística R (R Core Team, 2017), adotando o valor de significância $P<0,05$. As variáveis dependentes a serem analisadas são: parâmetros fisiológicos (peso

seco, taxa de filtração e formação de bisco) e parâmetros bioquímicos (proteína total e glicogénio total). Já as covariáveis são: comprimento, largura, altura e peso fresco, peso seco, tratamento, tempo e temperatura. A normalidade de resíduos (com o teste de Shapiro-Wilks) e homogeneidade de variâncias (com o teste de Levene) foram avaliadas para os modelos estatísticos efetuados. Para compreender melhor o procedimento seguido, apresenta-se abaixo o esquema do modelo estatístico utilizado, para avaliar as variáveis dependentes (parâmetros fisiológicos e bioquímicos) em função das possíveis covariáveis (tratamento, tempo, peso seco e temperatura) presentes no bioensaio, e que contribuem para os efeitos nos mexilhões quando expostos às microalgas produtoras de MC e CIN.



Inicialmente procedeu-se à análise do fator dependente em função da interação entre as várias covariáveis (conforme exemplo anterior) e, quando significativo ($P < 0,05$), procedeu-se ao teste ANOVA e posteriormente ao teste de Tukey. Entretanto, em caso de não confirmação da validade do modelo de interação (teste não significativo), testou-se o modelo aditivo mais simples, como descrito abaixo:



Modelos mais simples e mais robustos foram testados, a partir dos modelos acima, eliminando as covariáveis que mostraram ser menos consistentes (com maior dispersão de dados) como a temperatura e/ou peso seco, como por exemplo: $\text{Bissos} \sim \text{Tratamento} * \text{Tempo}$ ou $\text{Bissos} \sim \text{Tratamento} + \text{Tempo}$.

O fator dependente Bissos, foi ainda sujeito a um terceiro modelo de análise binomial, considerando a presença ("sim") ou ausência ("não") dos bisco) quando expostos às cianobactérias tóxicas, conforme modelo de análise abaixo:

$$F_{\text{bissos}} \sim \text{Tratamento} * \text{Tempo} * \text{Temperatura} * \text{Peso seco}, \text{family} = \text{binomial}$$

3 Resultados

Relativamente ao bioensaio, salienta-se que não foi registada nenhuma mortalidade dos animais. Os valores físico-químicos da água foram registados diariamente, com temperaturas a variar entre os $15,5^{\circ}\text{C} \pm 3,5^{\circ}\text{C}$, pH entre os $7,88 \pm 0,12$ e salinidade entre os $34 \text{‰} \pm 3 \text{‰}$. Para auxiliar na leitura dos resultados, parte dos mesmos são apresentados nas Tabelas Suplementares no **Anexo II**. Nas figuras os tratamentos com *P. kessleri*, *M. aeruginosa* (produtora de MC), *C. ovalisporum* (produtora de CIN) e a mistura das cianobactérias estão referidos respetivamente por: C (controlo), MC, CIN e MIX. Os tempos de amostragem estão referidos como T0 (tempo inicial), T1 (7 dias), T2 (14 dias), T3 (21 dias) e T4 (28 dias).

Foi realizada também a quantificação de toxina nas respetivas cianobactérias *M. aeruginosa* (Figura 17) e *C. ovalisporum* (Figura 18), cujos valores estão descritos nos respetivos cromatogramas abaixo. O valor obtido de toxina MC-LR foi de $2,3 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ para uma densidade de 1×10^5 células/mL de *M. aeruginosa*. Já o valor obtido de toxina CIN foi de $0,785 \mu\text{g/mL}$ para uma densidade de 1×10^5 células/mL de *C. ovalisporum*.

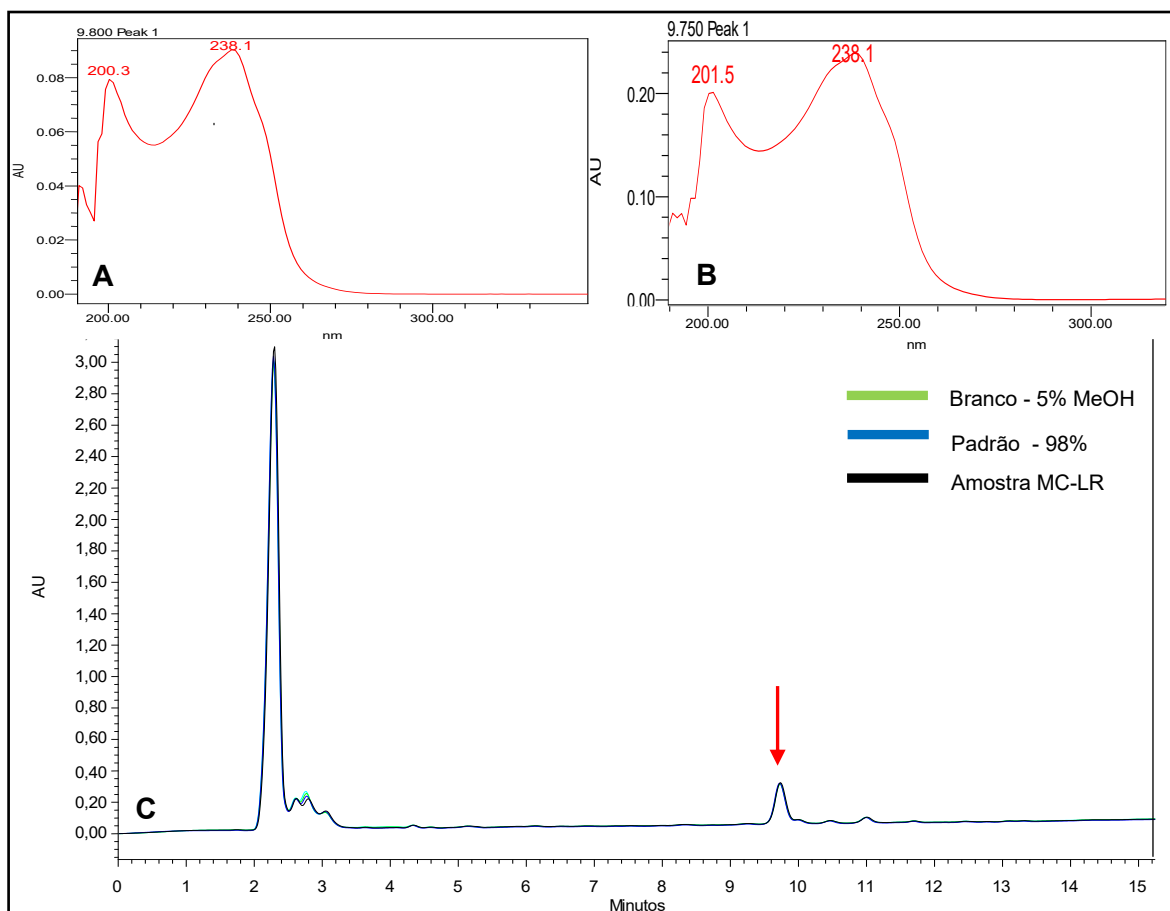


Figura 17. Cromatograma de MC (presente em *M. aeruginosa*). (A) Espectro do padrão MC a 238 nm com tempo de retenção de 9,80 min. (B) Espectro da amostra MC a 238 nm e tempo retenção de 9,75 min. (C) Comparação branco, padrão e amostra com indicação do tempo de retenção (9,75 min).

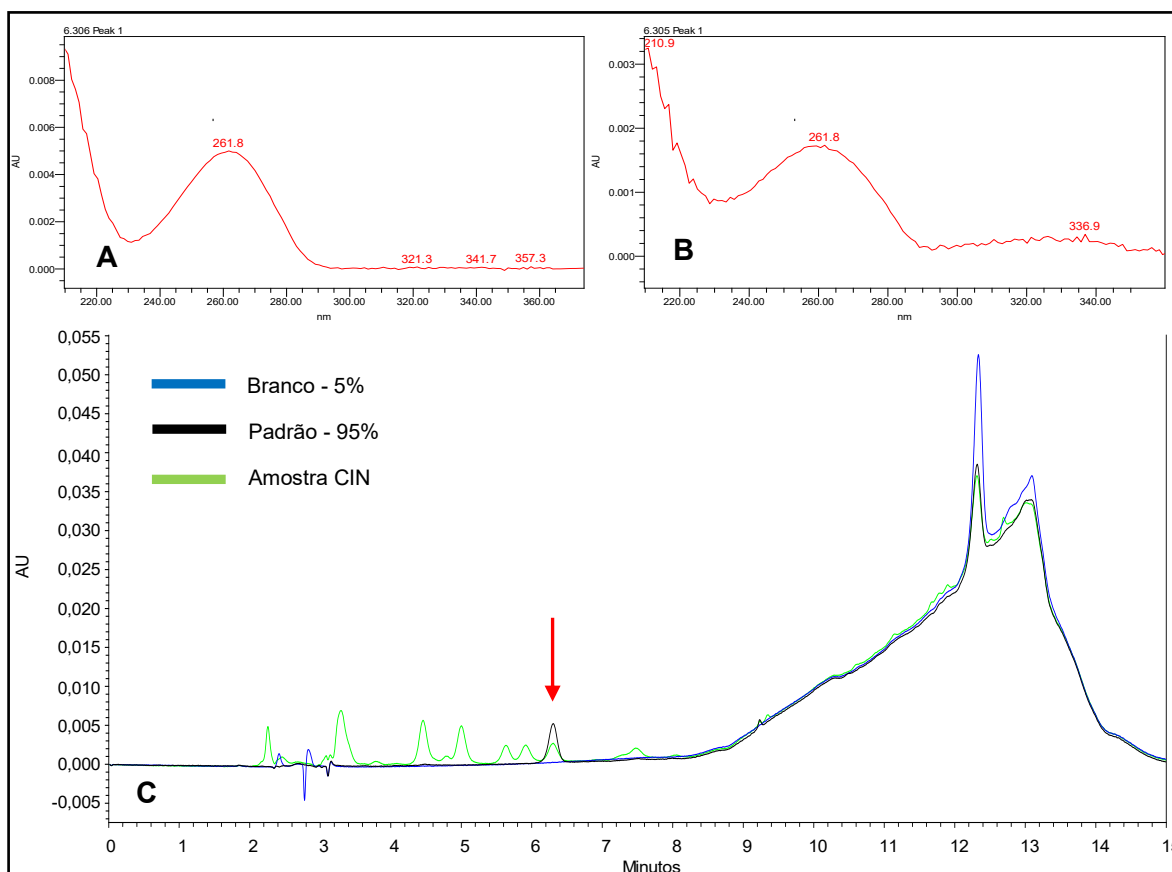


Figura 18. Cromatograma de CIN (presente em *C. ovalisporum*). (A) Espectro do padrão CIN a 262 nm com tempo de retenção de 6,306 min. (B) Espectro da amostra CIN a 262 nm com tempo de retenção de 6,305 min. (C) Comparação branco, padrão e amostra com indicação do tempo de retenção (6,305 min).

3.1 Parâmetros fisiológicos

3.1.1 Peso seco

O peso seco dos mexilhões quando expostos às microalgas tóxicas, ao longo do bioensaio, está representado na Figura 19. Para interpretar as variações deste fator dependente, procedeu-se à análise dos vários modelos estatísticos tal como descrito nos materiais e métodos. No entanto, verificou-se que tanto os modelos de interação, como os modelos de adição, não são significativos (Tabelas suplementares 1 e 2), o que significa que nenhuma das covariáveis consideradas teve influência no peso seco dos mexilhões.

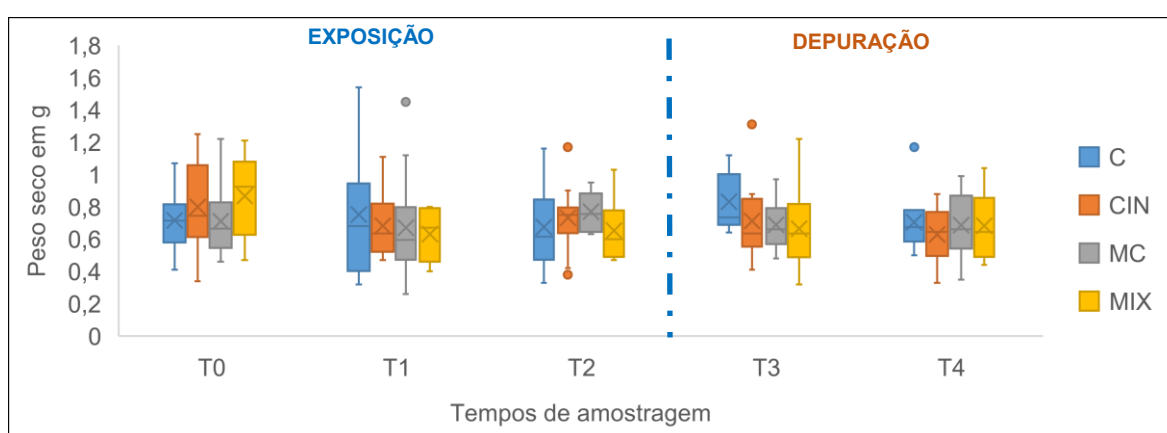
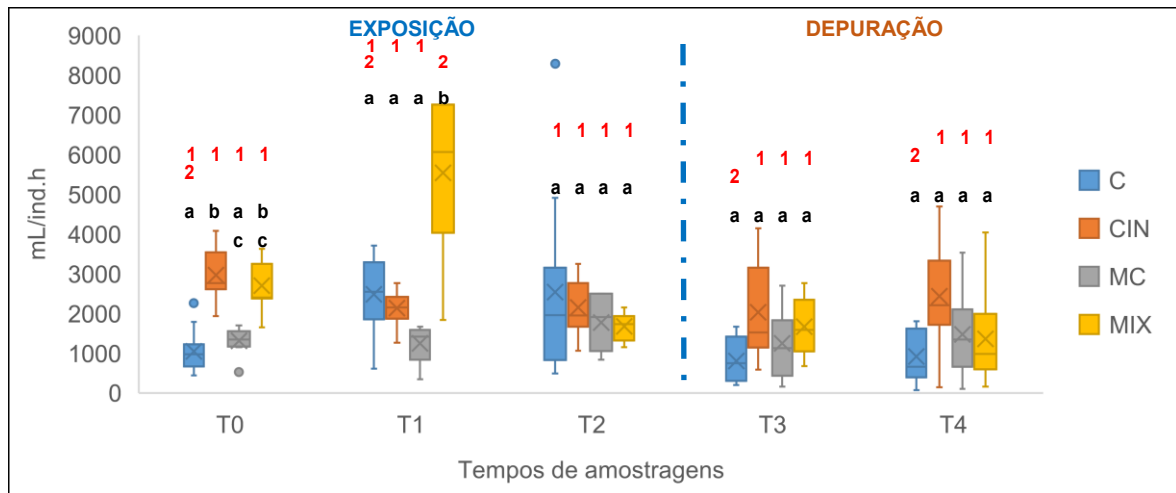


Figura 19. Variação do peso seco dos mexilhões para os diferentes tratamentos, ao longo do bioensaio. Tratamentos: (C) Controlo; (CIN) Cilindrospermopsina; (MC) Microcistina; (MIX) CIN + MC. Tempos de amostragem: T0; T1; T2; T3; T4.

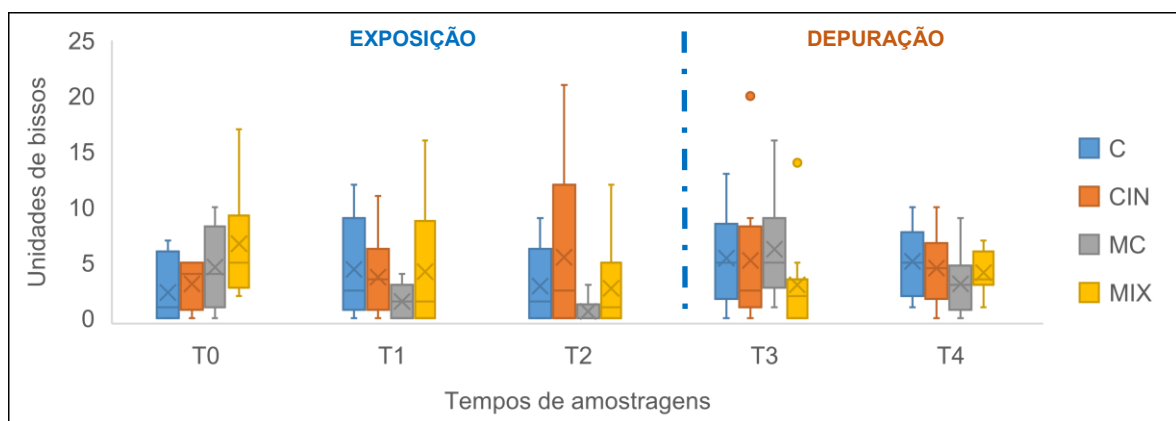
3.1.2 Taxa de filtração

A taxa de filtração dos mexilhões quando expostos às microalgas tóxicas, ao longo do bioensaio, está representada na Figura 20. Para interpretar as variações deste fator dependente, procedeu-se à análise dos vários modelos estatísticos tal como descrito nos materiais e métodos. Com esta análise verificou-se que o modelo de interação, quando apresenta apenas duas covariáveis, o tratamento e tempo (*Filtração ~ Tratamento * Tempo*), é significativo ($F_{12,163} = 6,175$, $p < 0,001$) (Tabelas suplementares 3 e 4), indicando que a taxa de filtração varia em função das duas covariáveis. Após ANOVA e teste de Tukey (Tabelas suplementares 5 e 6), verificou-se um aumento das taxas de filtração nos tratamentos T0CIN, T0MIX e T1MIX relativamente aos respetivos controlos. Assim, verificaram-se também diferenças nas taxas de filtração entre: CT2 e CT3; CT2 e CT4; MIXT0 e MIXT1; MIXT1 e MIXT2; MIXT1 e MIXT3; MIXT1 e MIXT4; T0CIN e T0MC; T1CIN e T1MIX; T1MC e T1MIX, tal como indicado na Figura 20. Nos restantes tratamentos e tempos, a taxa de filtração manteve-se relativamente constante ao longo do bioensaio (exposição/depuração).



3.1.3 Produção de bisco

A produção de bisco nos mexilhões quando expostos às microalgas tóxicas, ao longo do bioensaio, está representada na Figura 21. Para interpretar as variações deste fator dependente, procedeu-se à análise dos vários modelos estatísticos tal como descrito nos materiais e métodos. No entanto, verificou-se que tanto os modelos de interação, como os modelos de adição, não são significativos (Tabelas suplementares 7 e 8), de onde se infere que nenhuma das covariáveis consideradas nos modelos tem influência na produção de bisco.



Para o modelo binomial de adição, quando apresenta apenas duas covariáveis, o tratamento e tempo ($F_{bisco} \sim Tratamento + Tempo, family = binomial$), apresentou diferenças significativas (Tabelas suplementares 9 e 10). Após ANOVA (Tabelas

suplementares 11 e 12) verificaram-se diferenças para a covariável tempo. O teste de Tukey para dados binomiais não pode ser executado em software (não permite o agrupamento dos dados), e mediante esta condição, não é possível identificar as diferenças entre grupos experimentais.

3.2 Parâmetros bioquímicos

3.2.1 Proteína total

A proteína total nos mexilhões quando expostos às microalgas tóxicas, ao longo do bioensaio, está representada na Figura 22. Para interpretar as variações deste fator dependente, procedeu-se à análise dos vários modelos estatísticos tal como descrito nos materiais e métodos. Com essa análise verificou-se que o modelo de adição, quando apresenta apenas duas covariáveis (*Proteína total* ~ *Tratamento* + *Tempo*) é significativo ($F_{4,92} = 36,365$, $p < 0,001$) (Tabelas suplementares 13; 14 e 15). Após ANOVA e teste de Tukey (Tabelas suplementares 16 e 17), verificou-se que as diferenças encontradas estão principalmente associadas ao tempo e não ao tipo de tratamento. Assim verificou-se um aumento da proteína acumulada nos mexilhões 7 dias após o início do bioensaio (T1) e durante a fase de depuração (sobretudo em T4), em todos os tratamentos relativamente aos valores registados, por exemplo, em T0. Os valores mais elevados de proteína total foram registados no final do bioensaio (T4), ultrapassando todos os valores registados durante a fase de exposição. Assim verificaram-se diferenças nos valores de proteína total entre as seguintes condições para todos os tratamentos (C, CIN, MC e MIX) entre T0 e T1; T0 e T3; T0 e T4; T1 e T4; T2 e T3; T2 e T4; T3 e T4 (Figura 22).

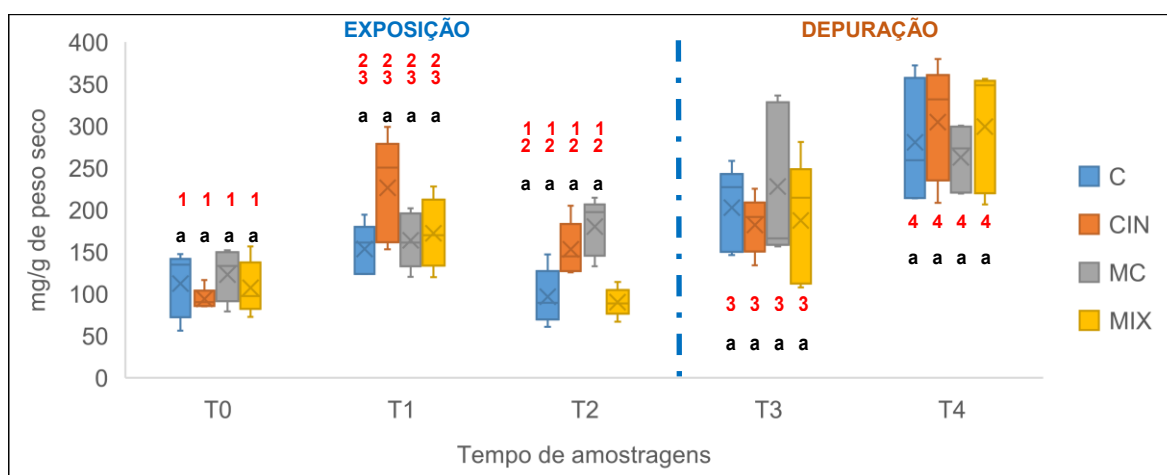


Figura 22. Variação da proteína total dos mexilhões para os diferentes tratamentos, ao longo do bioensaio. Tratamentos: (C) Controlo; (CIN) *Cilindrospermopsis*; (MC) *Microcystis*; (MIX) CIN + MC. Tempos de amostragem: T0; T1; T2; T3 e T4. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre tratamentos, para cada tempo de amostragem. Números diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre tempos, para cada tratamento.

3.2.2 Glicogénio total

O glicogénio total nos mexilhões quando expostos às microalgas tóxicas, ao longo do bioensaio, está representado na Figura 23. Para interpretar as variações deste fator dependente, procedeu-se à análise dos vários modelos estatísticos tal como descrito nos materiais e métodos. Com essa análise verificou-se que o modelo de adição com três covariáveis (*Glicogénio total* ~ *Tratamento* + *Tempo* + *Peso seco*) é significativo, sendo as covariáveis que mais influência têm neste fator dependente é o tempo ($F_{4,91} = 6,092$, $p < 0,001$) e o peso seco ($F_{1,92} = 10,248$, $p = 0,001$) (Tabelas suplementares 18; 19 e 20). Os testes ANOVA e Tukey (Tabelas suplementares 21 e 22) confirmaram as diferenças associadas à covariável tempo, sendo que o teste de Tukey para peso seco não pode ser executado devido a variável apresentar valores distintos (não permite o agrupamento dos dados), e mediante esta condição, esta análise específica não pode ser efetuada. As diferenças observadas apontam para uma diminuição desta variável, em todos os tratamentos e controlo, no tempo T2 relativamente ao tempo T0 (Figura 23).

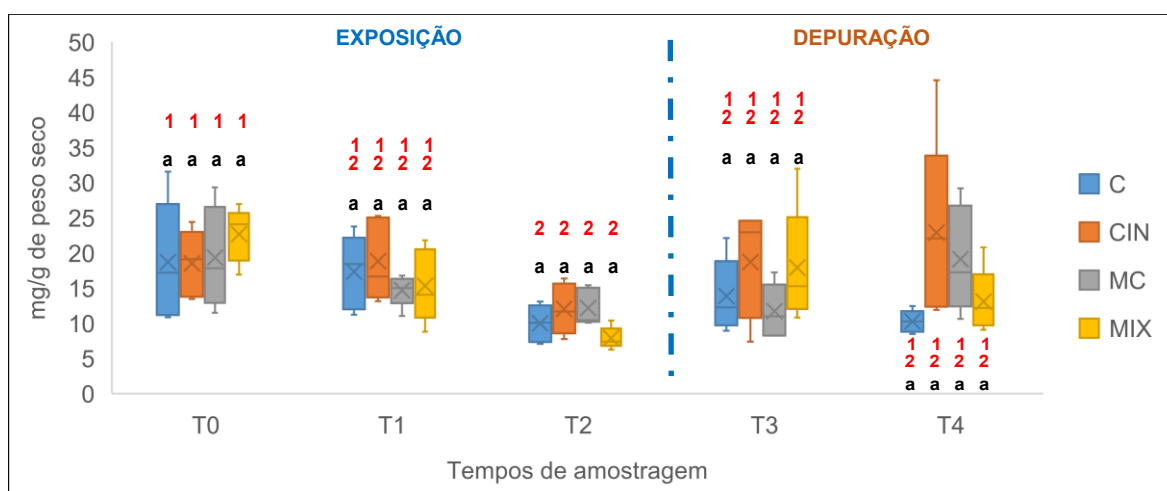


Figura 23. Variação do glicogénio total dos mexilhões para os diferentes tratamentos, ao longo do bioensaio. Tratamentos: (C) Controlo; (CIN) Cilindrospermopsina; (MC) Microcistina; (MIX) CIN + MC. Tempos de amostragem: T0; T1; T2; T3 e T4. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre tratamentos, para cada tempo. Números diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre tempos, para cada tratamento.

4 Discussão

4.1 Efeitos fisiológicos

A exposição dos mexilhões marinhos às cianobactérias tóxicas, tendo em conta a variável peso seco, foi avaliada através dos modelos estatísticos de interação e adição. O peso seco foi utilizado como uma variável simples para estimar a condição fisiológica dos mexilhões e o seu crescimento. A diminuição de peso está geralmente associada a um aumento dos processos catabólicos e de consumo das reservas energéticas. Uma vez que não foram observadas variações nesta variável, podemos antecipar que os tratamentos impostos aos mexilhões não provocaram toxicidade aguda nem inibição do crescimento dos mexilhões, durante o período de exposição. Este resultado é algo inesperado uma vez que os mexilhões foram expostos a uma densidade de microalgas tóxicas equivalente a uma florescência natural moderada considerada de risco, densidade esta conhecida por ser capaz de produzir alterações no metabolismo do mexilhão (Amorim e Vasconcelos, 1999; Fernandes et al., 2007; Puerto et al., 2011). A baixa toxicidade da *M. aeruginosa* neste caso pode estar associada à baixa produção da toxina MC-LR, calculada em 0,023 pg/célula. Pelo contrário, as células de *C. ovalisporum* mostraram elevada capacidade de produção de CYN, estimada em 7,854 pg/célula. No entanto esta aparente elevada toxicidade da cianobactéria *C. ovalisporum* não teve qualquer influência no peso seco dos mexilhões. Sobre esta hipótese deve ser ainda referido que as alterações no crescimento do animal eventualmente ocorrem em espaços de tempo mais alargados, desta forma não podemos descartar também a hipótese de que os 14 dias de exposição às cianobactérias tóxicas não são suficientes para produzir alterações por exemplo no peso seco do animal. Um fator que pode influenciar o peso seco do animal (crescimento) é a temperatura. Entretanto, para este ensaio em particular, os modelos estatísticos demonstraram que a temperatura não está correlacionada com as variações do peso seco. Fatores como a salinidade, quantidade de alimento e densidade de animais no aquário foram sempre constantes. Segundo Henriques et al. (2001), o crescimento dos mexilhões, em ambiente natural ou em cativeiro, depende de fatores físicos como a temperatura e salinidade, e fatores ecológicos, como a densidade de indivíduos, qualidade e quantidade de alimento, circulação de água e a incidência de predadores e parasitas. Para Loo e Rosenberg (1983) a temperatura interfere no crescimento de mexilhões (*M. edulis*), além de regular os processos fisiológicos. Tendo em conta que os mexilhões foram expostos a uma densidade de microalgas tóxicas equivalente a uma florescência natural moderada, este resultado é inesperado pela ausência de inibição de crescimento.

A taxa de filtração é uma medida das capacidades filtradoras destes animais. Por outro lado, permite inferir o potencial de remoção (por ingestão) da matéria particulada (células) em suspensão na água que está disponível para os animais (Bayne et al., 1987). Neste sentido a taxa de filtração foi utilizada neste trabalho como parâmetro para avaliar a capacidade de ingestão dos vários tipos de microalgas, pelo mexilhão do mediterrâneo. Um dos fatores que pode influenciar a taxa de filtração é a temperatura, entretanto, esta foi eliminada da análise dos modelos estatísticos (subseção 3.1.2) por não apresentar DS. Já relativamente ao tipo de tratamento e ao tempo, os resultados apontam para a existência de DS. Segundo Sylvester et al. (2006), a taxa de filtração nos mexilhões pode variar de acordo com o seu comprimento, visto que os animais menores tendem a filtrar de 60% a 80% a mais de água por unidade de tempo que os animais maiores, por serem mais ativos. Nesta experiência foram encontradas diferenças significativas para a taxa de filtração nos dois primeiros períodos de exposição, para os tratamentos CIN.T0; MIX.T0 e MIX.T1 relativamente aos respetivos controlos. Este resultado pode dever-se ao fato dos mexilhões reconhecerem uma nova fonte de alimento, que se traduziu numa maior filtração das microalgas tóxicas (*M. aeruginosa* e *C. ovalisporum*). Esta estimulação é atenuada nos períodos seguintes de exposição (T2) e depuração (T3 e T4), sendo as taxas de filtração das cianobactérias tóxicas semelhantes ao controlo. Os resultados do presente trabalho são importantes no sentido em que evidenciam que este bivalve marinho não só é capaz de se alimentar de cianobactérias (pois não rejeitou esta fonte de alimento), como é capaz de apresentar um comportamento de ingestão preferencial das cianobactérias tóxicas relativamente à microalga não tóxica *P. kessleri*, pelo menos numa fase inicial de exposição. É particularmente inesperado o registo de uma taxa de filtração elevada sobre as células de *C. ovalisporum*, que apresentam elevada concentração de CIN e por isso são potencialmente mais tóxicas que as células de *M. aeruginosa*. Sobre esta condição seria expectável observar uma redução da taxa de filtração nos mexilhões, como forma de defesa à cianobactéria. A utilização destas microalgas tóxicas como fonte de alimento levanta algumas questões sobre a acumulação de toxinas que pode atingir níveis consideráveis nestes animais. Esta capacidade de filtração e ingestão de cianobactérias torna o mexilhão um potencial vetor de cianotoxinas. Em estudos realizados por Baker et al. (1998), o mexilhão dourado (*Dreissena polymorpha*) assimilou mais células de *M. aeruginosa* quando comparado com outros grupos de microalgas verdes não tóxicas, como *Micractinium* sp. e *Crucigenia tetrapedia*. Dados semelhantes foram encontrados por Dionisio Pires e Donk (2002), quando avaliaram a alimentação (através da filtração) do mexilhão de água doce (*D. polymorpha*) quando exposto à microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* e à cianobactéria *M. aeruginosa*. Neste trabalho verificou-se uma maior assimilação da cianobactéria, por parte do mexilhão de água doce. Ainda o

estudo realizado por Vanderploeg et al. (2001), que abordou a capacidade do mexilhão (*D. polymorpha*) em promover florescências de *M. aeruginosa* em locais de transposição, e evidenciou altas taxas de alimentação (filtração) para as estirpes não tóxica e tóxica de *M. aeruginosa*. Gazulha et al. (2012a) avaliaram a capacidade de filtração do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) quando exposto a diatomáceas (*Nitzsche palea*) e estirpes tóxicas e não tóxicas de cianobactérias (*M. aeruginosa*). Neste trabalho, a taxa de filtração dos mexilhões a curto prazo foi maior para as diatomáceas, entretanto, estas mesmas microalgas mostraram ser subsequentemente expelidas pelo animal não sendo digeridas, ao contrário das cianobactérias que foram ingeridas e assimiladas pelos mexilhões. Uma outra questão a ser argumentada é o fato de *C. ovalisporum* ser uma espécie filamentosa e consequentemente, a ingestão de um filamento implica a ingestão de um maior número de células, subestimando assim, a taxa de filtração. Para Gazulha et al. (2012b), espécies como o mexilhão dourado (*L. fortunei*) preferem microalgas unicelulares livres, às formas coloniais e filamentosas. Este comportamento é evidenciado pela maior assimilação de células solitárias (*M. aeruginosa* não tóxicas) quando comparado com outros tipos celulares filamentosos (*Planktothrix sp.* não tóxica). Um outro estudo realizado por Riisgård et al. (2003), permitiu verificar que os bivalves (*Cardium edule*, *M. edulis*, *Mya arenaria*), quando alimentados com concentrações de microalgas muito baixas (*Rhodomonas sp.*), acabam por reduzir a abertura do sifão ou o encerramento completo do mesmo. Consequentemente ocorre a cessação da atividade de filtração, que se prolonga até à concentração de microalgas no meio voltar a crescer.

Por último a produção de biscoitos constitui uma característica muito específica dos mexilhões que lhes permite aderir às estruturas submersas, e iniciar o seu ciclo de vida sésil. Os biscoitos são estruturas proteicas insolúveis, extremamente resistentes à ação proteolítica, e às condições hidrodinâmicas do meio (tensões provocadas pelas correntes e forças do mar) (Silverman e Roberto, 2007). A produção de biscoitos é um processo bastante exigente em termos energéticos para o animal, levando a um consumo de reservas energéticas e à concentração de uma grande fração do conteúdo proteico do animal. Tendo em conta esta condição do animal, a capacidade de produção de biscoitos foi avaliada para inferir sobre o estado fisiológico do animal quando exposto e alimentado com cianobactérias tóxicas. Os resultados não permitiram detetar diferenças significativas na capacidade de produção de biscoitos, o que sugere que os tratamentos com microalgas tóxicas não tiveram grandes efeitos neste processo fisiológico. Salienta-se ainda a dificuldade em medir esta variável, com cada animal a apresentar um número de biscoitos produzidos muito variável. Neste sentido será importante otimizar os métodos para estimar a produção de biscoitos, que permitam reduzir a variabilidade experimental e, por conseguinte, um melhor aproveitamento da informação fornecida por esta variável. A

produção de bisco em condições de laboratório é frequente sendo necessário um período de espera de algumas horas para se observar a produção de novos bisco (Sagert e Waite, 2009; Warner e Waite, 1999). No entanto, para avaliar a capacidade de adesão e produção de bisco, poderá ser necessário manter os animais em observação por períodos mais longos, de até 3 dias (Babarro e Reiriz, 2010; Carrington et al., 2008; Kobak, 2006a; Kobak e Januszewska, 2006b; Moeser e Carrington, 2006a; Moeser et al., 2006b; Sagert e Waite, 2009; Warner e Waite, 1999).

Talvez após uma análise sobre a quantidade de toxinas presente nos tecidos do mexilhão e a análise por proteómica (brânquias e glândula digestiva), novas interpretações sobre o impacto destas cianobactérias tóxicas possam surgir, nomeadamente quanto ao grau de contaminação e capacidade do mexilhão para bioacumular toxinas como a MC e CIN, e alterações subtis no metabolismo do animal que possam vir a produzir, numa escala temporal mais alargada, efeitos fisiológicos mais adversos.

O peso seco foi uma medida simples para avaliar o crescimento dos mexilhões, entretanto, não foi o fator mais eficiente para avaliar as alterações durante o período do ensaio. Estudos a longo prazo podem evidenciar melhor as diferenças do peso seco. Quanto aos aspetos da taxa de filtração, uma característica interessante sobre o comportamento do mexilhão é a comparação dos resultados em relação ao controlo. Quando iniciou o período de exposição (com as microalgas tóxicas), os mexilhões vinham de um período de aclimação de 21 dias, onde eram alimentados apenas com *P. kessleri*. Ao receber um alimento diferente, maiores filtrações foram observadas inicialmente. É interessante avaliar os efeitos da aclimação de uma forma diferenciada (menor tempo) e como seria o comportamento da filtração utilizando diferentes controlos, como por exemplo, microalgas marinhas não tóxicas.

4.2 Efeitos bioquímicos

Relativamente à proteína total estimada nos mexilhões, verificou-se um aumento deste parâmetro 7 dias após o início do bioensaio e durante a fase de depuração (sobretudo em T4), em todos os grupos experimentais relativamente aos valores encontrados por exemplo em T0. Este resultado leva-nos a concluir que os tratamentos impostos não têm grande influência no conteúdo em proteína do animal, um resultado que é coerente com a aparente baixa toxicidade inferida por estas microalgas, nas condições específicas estudadas. Por outro lado, especulamos que o aumento da proteína em todos os grupos experimentais, especificamente durante a fase de depuração, poderá estar relacionado com uma alteração do metabolismo do animal associado ao ciclo reprodutivo.

Em ambiente natural, o *Mytilus* que se distribui ao longo da costa Europeia apresenta uma época de reprodução que se inicia no outono e estende-se até à primavera. Dependendo da sua distribuição geográfica e características do seu habitat (clima e disponibilidade de alimento), pode verificar-se 1 ou 2 picos de desova por ano, que ocorrem respetivamente na primavera e fim do verão (Ciocan, 2002). Neste sentido o aumento das proteínas totais verificado neste trabalho pode estar relacionado com a fase do ciclo reprodutivo dos animais desta época do ano (início da primavera), quando ocorre a libertação de gâmetas e o armazenamento de reservas energéticas nas gónadas (Duinker et al., 2008). Apesar de, neste trabalho, os mexilhões estarem aclimatados às condições artificiais de laboratório, o seu ciclo natural reprodutivo não parece ter sido alterado ou revertido.

O glicogénio total foi outro parâmetro bioquímico avaliado, neste caso com o objetivo de entender as potenciais variações no conteúdo em reservas energéticas dos animais como consequência dos efeitos adversos resultantes da exposição às cianobactérias e suas toxinas. As situações de stress fisiológico são conhecidas por conduzirem a um maior esforço metabólico e a um aumento do consumo das reservas energéticas no animal (Campos et al., 2016; Coppola et al., 2017). Os distúrbios no metabolismo energético e por exemplo no conteúdo do glicogénio são frequentes e resultam do esforço metabólico que o animal tem de realizar em situações de stress fisiológico (Donaghy et al., 2016; Dowd e Somero, 2013; Yu et al., 2016). O glicogénio é um polissacárido constituído por subunidades de glucose. Energia útil para o metabolismo celular é desta forma convertida através da hidrólise desta molécula e subsequente metabolismo da sua principal subunidade a glucose. Estudos de campo e de laboratório demonstraram que a composição corporal da espécie congénere *M. edulis* varia em função do local geográfico em que está distribuído, e pelas características da dieta. Perfis específicos dos vários componentes da biomassa do animal, isto é, das proteínas, lípidos, e glicogénio, refletem o que a sua dieta proporciona (Fernández et al., 2015; Pleissner et al., 2012; Rajalekshmi e Mohandas, 1993). O glicogénio sofreu uma diminuição no final da fase de exposição, para todos os grupos experimentais. Ao contrário do observado relativamente ao conteúdo em proteína, o glicogénio não aumentou durante a depuração. Este resultado sustenta a hipótese de que a exposição às cianobactérias tóxicas não alterou significativamente o metabolismo energético do mexilhão, e neste sentido a condição fisiológica do animal não parece ter sido afetada.

5 Conclusões e perspetivas futuras

Quando um organismo é exposto às cianobactérias produtoras de toxinas é esperado a ocorrência de efeitos adversos no organismo em consequência da bioatividade destas toxinas. Para o mexilhão neste estudo, não existiram evidências sobre efeitos adversos em função dos tratamentos realizados, pelo que se conclui que o mexilhão é pouco sensível às cianobactérias tóxicas, *M. aeruginosa* e *C. ovalisporum*. Por outro lado, a duração do bioensaio foi o fator que mais condicionou as variáveis fisiológicas e bioquímicas estudadas. É importante salientar que apesar de não se registarem efeitos adversos no mexilhão, situações ambientais semelhantes podem, mesmo assim, resultar em impactos ecológicos económicos relevantes, tendo em conta sobretudo o risco que o mexilhão representa na transferência de toxinas para outros organismos. Para avaliar esta hipótese de contaminação, será necessário desenvolver um estudo detalhado sobre a acumulação (quantificação) de toxinas nos tecidos do mexilhão.

Conclui-se neste estudo que o mexilhão do mediterrâneo é relativamente tolerante à presença das microalgas tóxicas *M. aeruginosa* e *C. ovalisporum*, uma vez que a condição fisiológica do mexilhão durante a fase de exposição não foi afetada, pois não se verificaram, por exemplo, reduções no peso seco, taxa de filtração ou produção de biscoitos e que estas mesmas microalgas são uma fonte de alimento para este bivalve. Na ausência de sintomas de stress fisiológico, a fase de depuração teve pouca relevância no estudo. No entanto, a fase de depuração coincidiu com uma mudança do metabolismo do mexilhão correspondente à sua fase do ciclo reprodutivo. Esta mudança do metabolismo justifica o aumento da proteína total nos tecidos dos animais.

Este trabalho esclarece alguns pontos importantes relativo ao papel dos bivalves nos impactos causados pela proliferação de cianobactérias tóxicas no meio aquático, contudo não esclarece todas as questões que se colocam sobre este tema. Questões sobre que quantidade de toxina podem os bivalves acumular nos seus tecidos? Como se diferenciam as várias espécies marinhas e estuarinas, quanto à sua tolerância às cianobactérias tóxicas? A utilização de controlos, nomeadamente microalgas verdes não tóxicas naturais da alimentação do mexilhão, podem influenciar na resposta fisiológica quando comparadas a microalgas produtoras de toxinas de ambientes de água doce? Estas questões têm elevada importância e podem ser abordadas em futuros estudos científicos.

Referências

- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A. e Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate polymers**, 97(2), 253-261.
- Amorim, Á. e Vasconcelos, V. (1999). Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Toxicon**, 37(7), 1041-1052.
- Azevedo, S. M. F. O. e Vasconcelos, V. (1998). Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. **Medicina on line**, 3(1), 1-19.
- Azevedo, S. M. F. O. e Brandão, C. C. S. (2003). Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Brasília: **Ministério da Saúde**: Fundação Nacional de Saúde. 56 p.
- Babarro, J. M. e Reiriz, M. J. F. (2010). Secretion of byssal threads in *Mytilus galloprovincialis*: quantitative and qualitative values after spawning stress. **Journal of Comparative Physiology B**, 180(1), 95-104.
- Bacci, D. D. L. C. e Pataca, E. M. (2008). Educação para a água. **Revista Estudos avançados**, 22(63), 211-226.
- Baker, S. M., Levinton, J. S., Kurdziel, J. P. e Shumway, S. E. (1998). Selective feeding and biodeposition by zebra mussels and their relation to changes in phytoplankton composition and seston load. **Journal of Shellfish Research**, 17(4), 1207-1214.
- Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R. e Sukenik, A. (1997). Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Phycology**, 33(4), 613-616.
- Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A., e Carmeli, S. (2000). 7-Epicylindrospermopsin, a Toxic Minor Metabolite of the Cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. **Journal of natural products**, 63(3), 387-389.
- Bayne, B. L., Hawkins, A. J. S. e Navarro, E. (1987). Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 111(1), 1-22.
- Bittencourt-Oliveira, M. C. e Molica, R. (2003). Cianobactéria invasora: aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 30, 82-90.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254.
- Brasil. Ministério da Saúde. (2011). Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**.
- Calijuri, M. C., Alves, M. S. A. e Santos, A. A. (2006). **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**. 2ª ed. São Carlos: Rima. 109p.

Campbell, A. e Nicholls, J. (2005). **Fauna e Flora do Litoral de Portugal e Europa. Guia Fundo para a Proteção dos Animais Selvagens – FEPAS**. 1ª ed. Porto: Philip's, p.138-171.

Campos, A., Araújo, P., Pinheiro, C., Azevedo, J., Osório, H. e Vasconcelos, V. (2013). Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin. **Ecotoxicology and environmental safety**, 94, 45-53.

Campos, A., Danielsson, G., Farinha, A. P., Kuruvilla, J., Warholm, P. e Cristobal, S. (2016). Shotgun proteomics to unravel marine mussel (*Mytilus edulis*) response to long-term exposure to low salinity and propranolol in a Baltic Sea microcosm. **Journal of proteomics**, 137, 97-106.

Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, 72(6), 445-459.

Carmichael, W. W., Azevedo, S. M. F. O., An, J. S., Molica, R. J. R., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., Shaw, G. R. e Eaglesham, G. K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental health perspectives**, 109(7), 663-668.

Carmichael, W. W., Beasley, V., Bunner, D. L., Eloff, J. N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K. I., Krishnamurthy, T., Min-Juan, Y., Moore, R. E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O. M. e Watanabe, M. (1988). Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, 26(11), 971-973.

Carneiro, T. G. e Leite, F. (2008). Cianobactérias e suas toxinas. **Revista Analytica**, 32, 36-41.

Carrington, E., Moeser, G. M., Thompson, S. B., Coutts, L. C. e Craig, C. A. (2008). Mussel attachment on rocky shores: the effect of flow on byssus production. **Integrative and comparative biology**, 48(6), 801-807.

Carson, B. e Masten, S. (2000). Cylindrospermopsin—Review of Toxicological Literature. **National Institute of Environmental Health Sciences**: Research Triangle Park, NC.

Carvalho, L. R. D., Sant'Anna, C. L., Gemelgo, M. C. e Azevedo, M. T. D. P. (2007). Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, 30(1), 141-148.

Ciocan, C. (2002). Reproduction of *Mytilus galloprovincialis*(Lmk) in the Romanian waters of the Black Sea. **Cercetari**, 34, 23-28.

Cobo, F., Lago, L., Barca, S., Vieira-Lanero, R. e Servia, M. (2012). **Cianobacterias y medioambiente. Aspectos ecotoxicológicos de sus floraciones en aguas continentales**. 1ª ed. AGAIA. Santiago de Compostela. 131p.

Coppola, F., Almeida, Â., Henriques, B., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., Pereira, E. e Freitas, R. (2017). Biochemical impacts of Hg in *Mytilus galloprovincialis* under present and predicted warming scenarios. **The Science of the total environment**, 601-602, 1129-1138.

- Cronberg, G. e Annadotter, H. (2006). **Manual on aquatic cyanobacteria: A photo guide and a synopsis of their toxicology**. Intergovernmental Oceanographic Commission, Unesco. 106 p.
- Dawson, R. M. (1998). The toxicology of microcystins. **Toxicon**, 36(7), 953-962.
- Dionísio Pires, L. M. e Van Donk, E. (2002). Comparing grazing by *Dreissena polymorpha* on phytoplankton in the presence of toxic and non-toxic cyanobacteria. **Freshwater Biology**, 47(10), 1855-1865.
- Domínguez-Pérez, D., Rodríguez, A. A., Osorio, H., Azevedo, J., Castañeda, O., Vasconcelos, V. e Antunes, A. (2017). Microcystin-LR Detected in a Low Molecular Weight Fraction from a Crude Extract of *Zoanthus sociatus*. **Toxins**, 9(3), 89.
- Donaghy, L., Hong, H. K., Kim, M., Park, H. S., e Choi, K. S. (2016). Assessment of the fitness of the mussel *Mytilus galloprovincialis* two years after the Hebei Spirit oil spill. **Marine pollution bulletin**, 113(1), 324-331.
- Dowd, W. W. e Somero, G. N. (2013). Behavior and survival of *Mytilus* congeners following episodes of elevated body temperature in air and seawater. **Journal of Experimental Biology**, 216(3), 502-514.
- Dral, A. D. G. (1967). The movements of the latero-frontal cilia and the mechanism of particle retention in the mussel. **Netherlands Journal of Sea Research**, 3(3), 391-422.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T. e Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, 28(3), 350-356.
- Duinker, A., Håland, L., Hovgaard, P. e Mortensen, S. (2008). Gonad development and spawning in one and two year old mussels (*Mytilus edulis*) from Western Norway. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 88(7), 1465-1473.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017a). **Species Fact Sheets *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)**. Consultado em 05 mai. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/3529/en>>.
- _____. (2017b). **Species Fact Sheets *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758)**. Consultado em 05 mai. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/2688/en>>.
- _____. (2017c). **Cultured Aquatic Species Information Programme *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)**. Consultado em 05 mai. 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis/en#tcNA0078>.
- Falconer, I. R. e Humpage, A. R. (2006). Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. **Environmental toxicology**, 21(4), 299-304.
- Fernandes, S. S. (2008). **Biodisponibilidade de cianotoxinas em bivalves**. 51 f. Tese (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Fernandes, S., Welker, M. e Vasconcelos, V. M. (2009). Changes in the GST activity of the mussel *Mytilus galloprovincialis* during exposure and depuration of microcystins. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, 311(3), 226-230.

- Fernández, A., Grienke, U., Soler-Vila, A., Guihéneuf, F., Stengel, D. B. e Tasdemir, D. (2015). Seasonal and geographical variations in the biochemical composition of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from Ireland. **Food chemistry**, 177, 43-52.
- Fischer, W. J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P. J., Dietrich, D. R. e Hagenbuch, B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. **Toxicology and applied pharmacology**, 203(3), 257-263.
- Freitas, M., Azevedo, J., Carvalho, A. P., Campos, A. e Vasconcelos, V. (2014). Effects of storage, processing and proteolytic digestion on microcystin-LR concentration in edible clams. **Food and Chemical Toxicology**, 66, 217-223.
- Freitas, M., Azevedo, J., Carvalho, A. P., Mendes, V. M., Manadas, B., Campos, A. e Vasconcelos, V. (2016). Bioaccessibility and changes on cylindrospermopsin concentration in edible mussels with storage and processing time. **Food Control**, 59, 567-574.
- Froschio, S. M., Humpage, A. R., Burcham, P. C. e Falconer, I. R. (2001). Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. **Environmental toxicology**, 16(5), 408-412.
- Gácsi, M., Antal, O., Vasas, G., Máthé, C., Borbély, G., Saker, M. L., Györi, J., Farkas, A., Vehovszky, A. e Bánfalvi, G. (2009). Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. **Toxicology in vitro**, 23(4), 710-718.
- Gazulha, V., Mansur, M. C. D., Cybis, L. F. e Azevedo, S. M. F. O. (2012a). Feeding behavior of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) under exposure to toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Brazilian Journal of Biology**, 72(1), 41-49.
- Gazulha, V., Mansur, M. C. D., Cybis, L. F. e Azevedo, S. M. F. O. (2012b). Grazing impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) on single-celled, colonial and filamentous cyanobacteria. **Brazilian Journal of Biology**, 72(1), 33-39.
- Gibble, C. M., Peacock, M. B. e Kudela, R. M. (2016). Evidence of freshwater algal toxins in marine shellfish: Implications for human and aquatic health. **Harmful algae**, 59, 59-66.
- Guerreiro, M. L. F. B. (2009). **Dessalinização para produção de água potável: perspectivas para Portugal**. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil – Especialização em Hidráulica) – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto.
- Guiry, M. D. e Guiry, G. M. (2017). World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. **AlgaeBase**. [En línea]. Consultado em: 10 jun. 2017. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>.
- Gutiérrez-Praena, D., Jos, Á., Pichardo, S., Moreno, I. M. e Cameán, A. M. (2013). Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. **Food and chemical toxicology**, 53, 139-152.
- Harada, K. I., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M. F., Watanabe, M. e Terao, K. (1994). Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. **Toxicon**, 32(1), 73-84.
- Henriques, M. B., de Almeida Marques, H. L., Barrella, W. e Pereira, O. M. (2001). Estimativa do tempo de recuperação de um banco natural do mexilhão *Perna perna*

(Linnaeus, 1758) na Baía de Santos, Estado de São Paulo. **Holos Environment**, 1(2), 85-100.

Hilbish, T. J., Bayne, B. L. e Day, A. (1994). Genetics of physiological differentiation within the marine mussel genus *Mytilus*. **Evolution**, 48(2), 267-286.

Humpage, A. R., Fenech, M., Thomas, P. e Falconer, I. R. (2000). Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 472(1), 155-161.

Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E. M., Antunes, M. B. C., Filho, D. A. M., Lyra, T. M., Barreto, V. S. T., Azevedo, S. M. F. O. e Jarvis, W. R. (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, 338(13), 873-878.

John, D. M., Whitton, B. A. e Brook, A. J. (Eds.). (2002). **The freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae** (Vol. 1). Cambridge University Press. p. 31-158.

Jørgensen, C. B. (1981). Feeding and cleaning mechanisms in the suspension feeding bivalve *Mytilus edulis*. **Marine biology**, 65(2), 159-163.

Kautsky, N. e Evans, S. (1987). Role of biodeposition by *Mytilus edulis* in the circulation of matter and nutrients in a Baltic coastal ecosystem. **Marine Ecology Progress Series**, 38, 201-212.

Kinnear, S. H. W., Duivenvoorden, L. J. e Fabbro, L. D. (2007). Sublethal responses in *Melanoides tuberculata* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* containing cylindrospermopsin. **Harmful Algae**, 6(5), 642-650.

Kobak, J. (2006a). Factors influencing the attachment strength of *Dreissena polymorpha* (Bivalvia). **Biofouling**, 22(3), 141-150.

Kobak, J., e Januszewska, M. (2006b). Impact of substratum type on attachment and survival of *Dreissena polymorpha* (Bivalvia). **Folia Malacologica**, 14(2).

Krienitz, L., Hegewald, E. H., Hepperle, D., Huss, V. A., Rohr, T. e Wolf, M. (2004). Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Phycologia**, 43(5), 529-542.

Lee, R. E. (2008). **Phycology**. 4 ed. Cambridge University Press, New York: Cambridge. 547 p.

Liang, Y., Sarkany, N. e Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology letters**, 31(7), 1043-1049.

Linhares, S. e Gewandsznajder, F. (2008). **Biologia**. 1ª ed. São Paulo: Ática. p.164-165.

Loo, L. O. e Rosenberg, R. (1983). *Mytilus edulis* culture: growth and production in western Sweden. **Aquaculture**, 35, 137-150.

Machado, J., Azevedo, J., Vasconcelos, V. e Campos, A. (2016). Mode of Action and Toxicity of Major Cyanobacterial Toxins and Corresponding Chemical Variants. **Microbial Toxins**, 1-24.

Machado, J., Azevedo, J., Freitas, M., Pinto, E., Almeida, A., Vasconcelos, V. e Campos, A. (2017). Analysis of the use of microcystin-contaminated water in the growth and nutritional quality of the root-vegetable, *Daucus carota*. **Environmental Science and Pollution Research**, 24(1), 752-764.

Mankiewicz, J., Tarczyńska, M., Walter, Z. e Zalewski, M. (2003). Natural toxins from cyanobacteria. **Acta Biol Cracov Bot**, 45, 9-20.

Metcalf, J. S., Lindsay, J., Beattie, K. A., Birmingham, S., Saker, M. L., Törökné, A. K. e Codd, G. A. (2002). Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. **Toxicon**, 40(8), 1115-1120.

Miller, M. A., Kudela, R. M., Mekebri, A., Crane, D., Oates, S. C., Tinker, M. T., Staedler, M., Miller, W. A., Toy-Choutka, S., Dominik, C., Hardin, D., Langlois, G., Murray, M., Ward, K. e Jessup, D. A. (2010). Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. **PLoS One**, 5(9), 1-10.

Moeser, G. M. e Carrington, E. (2006). Seasonal variation in mussel byssal thread mechanics. **Journal of Experimental Biology**, 209(10), 1996-2003.

Moschini-Carlos, V., Nishimura, P. Y. e Pompêo, M. (2011). A importância e a problemática das cianobactérias nos reservatórios eutrofizados. **Revista Saneas**, 40, 14-18.

Moreira, L. R. M. (2008). ***Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*: características e aquicultura**. 59 f. Tese (Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia) – Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Nishiwaki-Matsushima, R., Nishiwaki, S., Ohta, T., Yoshizawa, S., Suganuma, M., Harada, K. I., Watanabe, M. F. e Fujiki, H. (1991). Structure-Function Relationships of Microcystins, Liver Tumor Promoters, in Interaction with Protein Phosphatase. **Cancer Science**, 82(9), 993-996.

Nogueira, I. C., Saker, M. L., Pflugmacher, S., Wiegand, C. e Vasconcelos, V. M. (2004). Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. **Environmental toxicology**, 19(5), 453-459.

Norris, R. L., Eaglesham, G. K., Pierens, G., Shaw, G. R., Smith, M. J., Chiswell, R. K., Seawright, A. A. e Moore, M. R. (1999). Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, 14(1), 163-165.

O'Neil, J. M., Davis, T. W., Burford, M. A. e Gobler, C. J. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful algae**, 14, 313-334.

Ohtani, I., Moore, R. E. e Runnegar, M. T. (1992). Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of the American Chemical Society**, 114(20), 7941-7942.

Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R. e Neilan, B. (2010). On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. **Marine drugs**, 8(5), 1650-1680.

Pereira, A. L., Monteiro, B., Azevedo, J., Campos, A., Osório, H. e Vasconcelos, V. (2015). Effects of the naturally-occurring contaminant microcystins on the *Azolla*

filiculoides–*Anabaena azollae* symbiosis. **Ecotoxicology and environmental safety**, 118, 11-20.

Pinheiro, C., Azevedo, J., Campos, A., Loureiro, S. e Vasconcelos, V. (2013). Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. **Hydrobiologia**, 705(1), 27-42.

Pleissner, D., Eriksen, N. T., Lundgreen, K. e Riisgård, H. U. (2012). Biomass composition of blue mussels, *Mytilus edulis*, is affected by living site and species of ingested microalgae. **Isrn Zoology**, 2012, 1-12.

Pollinger, U., Hadas, O., Yacobi, Y. Z., Zohary, T. e Berman, T. (1998). *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) in Lake Kinneret, Israel. **Journal of Plankton Research**, 20(7), 1321-1339.

Poniedziałek, B., Rzymiski, P. e Wiktorowicz, K. (2014). Toxicity of cylindrospermopsin in human lymphocytes: Proliferation, viability and cell cycle studies. **Toxicology in Vitro**, 28(5), 968-974.

Puerto, M., Campos, A., Prieto, A., Cameán, A., de Almeida, A. M., Coelho, A. V. e Vasconcelos, V. (2011). Differential protein expression in two bivalve species; *Mytilus galloprovincialis* and *Corbicula fluminea*; exposed to *Cylindrospermopsis raciborskii* cells. **Aquatic toxicology**, 101(1), 109-116.

Puddick, J., Prinsep, M. R., Wood, S. A., Kaufononga, S. A., Cary, S. C. e Hamilton, D. P. (2014). High levels of structural diversity observed in microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. **Marine drugs**, 12(11), 5372-5395.

Qi, Y., Rosso, L., Sedan, D., Giannuzzi, L., Andrinolo, D. e Volmer, D. A. (2015). Seven new microcystin variants discovered from a native *Microcystis aeruginosa* strain—unambiguous assignment of product ions by tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 29(2), 220-224.

R Core Team (2017). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

Rajalekshmi, P. e Mohandas, A. (1993). Effect of heavy metals on tissue glycogen levels in the freshwater mussel, *Lamellidens corrianus* (Lea). **Science of the total environment**, 134, 617-630.

Ramanan, S., Tang, J. e Velayudhan, A. (2000). Isolation and preparative purification of microcystin variants. **Journal of Chromatography A**, 883(1), 103-112.

Reynolds, C. S. (2006). **Ecology of Phytoplankton**. 1 ed. Cambridge University Press, New York: Cambridge. p.240-300.

Riisgård, H. U., Kittner, C. e Seerup, D. F. (2003). Regulation of opening state and filtration rate in filter-feeding bivalves (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*) in response to low algal concentration. **Journal of experimental marine biology and ecology**, 284(1), 105-127.

Round, F. E. (1983). **Biologia das Algas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois. 263 p.

Runnegar, M. T., Kong, S. M., Zhong, Y. Z. e Lu, S. C. (1995). Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochemical pharmacology**, 49(2), 219-225.

- Sagert, J., e Waite, J. H. (2009). Hyperunstable matrix proteins in the byssus of *Mytilus galloprovincialis*. **Journal of Experimental Biology**, 212(14), 2224-2236.
- Saker, M. L. e Eaglesham, G. K. (1999). The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Toxicon**, 37(7), 1065-1077.
- Saker, M. L., Metcalf, J. S., Codd, G. A. e Vasconcelos, V. M. (2004). Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. **Toxicon**, 43(2), 185-194.
- Santos, C. I. B. (2014). **Bioacumulação de cianotoxinas em microalgas e plantas: uma abordagem laboratorial para a avaliação de risco de cianobactérias tóxicas**. 90 p. Dissertação (Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água) – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Santos, C., Azevedo, J., Campos, A., Vasconcelos, V. e Pereira, A. L. (2015). Biochemical and growth performance of the aquatic macrophyte *Azolla filiculoides* to sub-chronic exposure to cylindrospermopsin. **Ecotoxicology**, 24(9), 1848-1857.
- Santiago, L. L. (2012). **Avaliação dos efeitos genotóxicos e de acumulação induzidos pela cilindrospermopsina (cianotoxina) em *Chironomus xanthus* (Diptera-Chironomidae)**. 67 p. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Instituto de Recursos Naturais da Universidade Federal de Itajubá, Itajubá.
- Shaw, G. R., Seawright, A. A., Shahin, M., Senogles, P., Mueller, J. e Moore, M. (2000). The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin: Human health risk assessment. In: **9th Intern Conf on Harmful Algal Blooms** (pp. 56-56). University of Tasmania.
- Silva, F. D. (2006). **Biorremocão de nitrogênio, fósforo e metais pesados (Fe, Mn, Cu, Zn) do efluente hidropônico, através do uso de *Chlorella vulgaris***. 87 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Silverman, H. G. e Roberto, F. F. (2007). Understanding marine mussel adhesion. **Marine Biotechnology**, 9(6), 661-681.
- Sivonen, K. e Börner, T. (2008). Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In: Herreo, A. e Flores, E. (Eds). Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. **E & FN Spon**. London. New York. pp. 41-111.
- Sivonen, K. e Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I. e Bartram, J. (Eds). Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. **E & FN Spon**. London. New York. pp. 41-111.
- Skibinski, D. O. F., Beardmore, J. A. e Cross, T. F. (1983). Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British Isles. **Biological journal of the Linnean Society**, 19(2), 137-183.
- Solé, J., García-Ladona, E., Ruardij, P. e Estrada, M. (2005). Modelling allelopathy among marine algae. **Ecological Modelling**, 183(4), 373-384.
- Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Lužanin, Z., Munjas, A. M., Nikolin, B., Vuleta, D. e Meriluoto, J. (2014). Epidemiology of cancers in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, 32(4), 319-337.

- Sylvester, F., Dorado, J., Boltovskoy, D., Juárez, Á. e Cataldo, D. (2005). Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. **Hydrobiologia**, 534(1), 71-80.
- Sylvester, F., Boltovskoy, D. e Cataldo, D. (2006). Tasas de clareado: ritmos e impacto. In: Darrigran, G. e Damborenea, C. (Eds.). Bio-invasion del mejillón dorado em el continente americano. **La Plata**: Edulp, p. 131-141.
- Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M. F., Harada, K. I., Ito, E. e Watanabe, M. (1994). Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. **Toxicon**, 32(7), 833-843.
- Tsarenko, P. M. e John, D. M. (2011). Class Trebouxiophyceae Order Chlorellales. **The Freshwater Algal Flora of the British Isles**, 2, 475-499.
- Tundisi, J. G. (2008). Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Revista Estudos avançados**, 22(63), 7-16.
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M. F., Park, H. D., Chen G. C., Chen, G. e Yu, S. Z. (1996). Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, 17(6), 1317-1321.
- Vanderploeg, H. A., Liebig, J. R., Carmichael, W. W., Agy, M. A., Johengen, T. H., Fahnenstiel, G. L. e Nalepa, T. F. (2001). Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic *Microcystis* blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Erie. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 58(6), 1208-1221.
- Vasconcelos, V. M. O. (1995). **Toxicologia de Cianobactérias: distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves**. 185 p. Dissertação (Doutorado em Ecologia Aplicada) – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Vasconcelos, V., Morais, J. e Vale, M. (2011). Microcystins and cyanobacteria trends in a 14 year monitoring of a temperate eutrophic reservoir (Aguieira, Portugal). **Journal of Environmental Monitoring**, 13(3), 668-672.
- Warner, S. C. e Waite, J. H. (1999). Expression of multiple forms of an adhesive plaque protein in an individual mussel, *Mytilus edulis*. **Marine Biology**, 134(4), 729-734.
- Weber, M.; Campos, J.; Coelho, A. M.; Santos, J. P. D.; Benevides, S. C. R e Santos, A. (1999). **Guia de campo do litoral – Praia da Aguda**. Fundação Estação Litoral da Água – ELA. 97p.
- Welker, M., Bickel, H. e Fastner, J. (2002). HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin—opportunities and limits. **Water Research**, 36(18), 4659-4663.
- White, S. H., Duivenvoorden, L. J., Fabbro, L. D. e Eaglesham, G. K. (2006). Influence of intracellular toxin concentrations on cylindrospermopsin bioaccumulation in a freshwater gastropod (*Melanoides tuberculata*). **Toxicon**, 47(5), 497-509.
- WHO – World Health Organization (2008). **Guidelines for Drinking-water Quality**. 3rd ed. Geneve: WHO. 668 p.
- Yu, D., Ji, C., Zhao, J. e Wu, H. (2016). Proteomic and metabolomic analysis on the toxicological effects of As (III) and As (V) in juvenile mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Chemosphere**, 150, 194-201.

- Zapomělová, E., Skácelová, O., Pumann, P., Kopp, R. e Janeček, E. (2012). Biogeographically interesting planktonic Nostocales (Cyanobacteria) in the Czech Republic and their polyphasic evaluation resulting in taxonomic revisions of *Anabaena bergii* Ostenfeld 1908 (*Chrysosporum* gen. nov.) and *A. tenericaulis* Nygaard 1949 (*Dolichospermum tenericaule* comb. nova). **Hydrobiologia**, 698(1), 353-365.
- Žegura, B., Štraser, A. e Filipič, M. (2011). Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins—a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 727(1), 16-41.
- Zhang, F., Lee, J., Liang, S. e Shum, C. K. (2015). Cyanobacteria blooms and non-alcoholic liver disease: evidence from a county level ecological study in the United States. **Environmental Health**, 14(1), 41.

Anexo I - Protocolo



LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA
GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Z8 Medium (Kotai, 1972)

PROTOCOL

- Sterilize all glass material and/or use sterile plastic material;
- Use distilled or deionized sterile water (autoclaved);
- Autoclave separately the A,B, Fe-EDTA and micronutrients solutions;
- Prepare medium in the flow chamber under aseptic conditions;
- The solutions should be at room temperature when added to prevent precipitation;
- In the end stock solutions should be stored in the refrigerator.

Add the solutions to water according to the following concentrations:

Solution A	10 ml/l
Solution B	10 ml/l
Fe-EDTA Solution	10 ml/l
Micronutrients Solution	1 ml/l

Composition of stock solutions:

Solution A

Reagent	Name	Code	g/l	g/500mL
NaNO ₃	Sodium nitrate	N4	46.7	23.35
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Calcium Nitrate Tetrahydrate	C1	5.9	2.95
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Magnesium Sulphate Heptahydrate	M2	2.5	1.25

Solution B

Reagent	Name	Code	g/l	g/500 ml
K ₂ HPO ₄	Potassium phosphate dibasic	K1	3.1	1.55
Na ₂ CO ₃	Sodium carbonate	N3	2.1	1.05

Fe-EDTA Solution

Reagent	Name	ml/l	800ml
FeCl ₃ *	Iron(III)chloride	10	8ml
EDTA-Na**	Sodium EDTA	9.5	7.6ml



Micronutrients Solution

Reagent	ml/l	ml/500ml
1 a 12	10	5
13 e 14	100	50

Composition of basic solutions

* FeCl₃ Solution

Reagent	Code	100ml	200ml
FeCl ₃ .6H ₂ O	F1	2.8g	4.16g
HCl (0.1 N)	H2	100ml	200ml

** EDTA-Na Solution

Reagent	Code	100 ml	200 ml
EDTA	E1	3.9 g	7.8 g
NaOH (0.1 N)	N5	100 ml	200 ml

Solutions 1-14

Reagent	Code	g/l	g/100 ml	Reagent	Code	g/l	g/100 ml
1- Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O ^{a)}	N11	0.33	0.033	8- CuSO ₄ .5H ₂ O	C6	1.25	0.125
2-(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .2H ₂ O	M4	0.88	0.088	9- NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O	N6	1.98	0.198
3- KBr	K2	1.2	0.12	10- Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	C5	0.41	0.041
4- KI	K3	0.83	0.083	11- V ₂ O ₅	V1	0.089	0.0089
5- ZnSO ₄ .7H ₂ O	Z1	2.87	0.287	12- Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ .24H ₂ O ^{b)}	A3	4.74	0.474
6- Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	C2	1.55	0.155	13- H ₃ BO ₃	H1	3.1	0.31
7- Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	C4	1.46	0.146	14- MnSO ₄ .4H ₂ O ^{c)}	M3	2.23	0.223

a. Reagent numbered as N11 is NaWO₃.2H₂O

b. Reagent numbered as A3 is K₂(SO₄)₂.12H₂O, the amount to weight should be the double indicated.

c. Reagent numbered as M3 is MnSO₄ mono and not tetra hydrated

Anexo II – Tabelas Suplementares

Todos os resultados para o valor de P são categorizados da seguinte forma:

0 *** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 (Vazio)

Parâmetros fisiológicos

1. Peso seco

Tabela Suplementar 1. Resultados dos modelos de interação testados para peso seco e os correspondentes teste ANOVA. (Trat) Tratamento; (Tempo) Tempo amostragem; (Temp) Temperatura e (Pseco) Peso seco.

Modelo estatístico	Resultado do modelo	Resultado da Anova
Pseco~ Trat*Tempo*Temp	$F_{26,173} = 1,101, p = 0,345$	Trat: $F_{3,173} = 0,239, p = 0,868$ Tempo: $F_{4,173} = 1,154, p = 0,332$ Temp: $F_{1,173} = 0,695, p = 0,405$ Trat:Tempo: $F_{12,173} = 0,825, p = 0,624$ Trat:Temp: $F_{3,173} = 3,075, p = 0,029$ Tempo:Temp: $F_{2,173} = 1,728, p = 0,180$ Trat:Tempo:Temp: $F_{1,173} = 0,002, p = 0,962$
Pseco~ Trat*Tempo	$F_{19,180} = 0,733, p = 0,780$	Trat: $F_{3,180} = 0,230, p = 0,875$ Tempo: $F_{4,180} = 1,110, p = 0,353$ Trat:Tempo: $F_{12,180} = 0,734, p = 0,716$

Tabela Suplementar 2. Resultados dos modelos de adição testados para peso seco e os correspondentes testes ANOVA. Para este modelo apresentam-se os resultados correspondentes a cada covariável, excluindo a interação que não é calculada. (Trat) Tratamento; (Tempo) Tempo amostragem; (Temp) Temperatura e (Pseco) Peso seco.

Modelo estatístico	Resultado do modelo	Resultado da Anova
Pseco~ Trat+Tempo+Temp	$F_{8,191} = 0,736, p = 0,659$	Trat: $F_{3,180} = 0,233, p = 0,872$ Tempo: $F_{4,180} = 1,127, p = 0,345$ Temp: $F_{1,180} = 0,679, p = 0,410$
Pseco~ Trat+Tempo	$F_{7,192} = 0,745, p = 0,633$	Trat: $F_{3,192} = 0,234, p = 0,872$ Tempo: $F_{4,192} = 1,129, p = 0,344$

2. Taxa Filtração

Tabela Suplementar 3. Resultados dos modelos de interação testados para a taxa de filtração e os correspondentes testes ANOVA. (Filt) Filtração; (Trat) Tratamento; (Tempo) Tempo amostragem; (Temp) Temperatura e (Pseco) Peso seco.

Modelo estatístico	Resultado do modelo	Resultado da Anova
Filt~ Trat*Tempo*Temp*Pseco	$F_{53,129} = 3,362, p < 0,001$	Pseco: $F_{1,129} = 0,095, p = 0,757$ Trat: $F_{3,129} = 10,417, p < 0,001$ Tempo: $F_{4,129} = 9,310, p < 0,001$ Temp: $F_{1,129} = 7,994, p = 0,005$ Pseco:Trat: $F_{3,129} = 0,845, p = 0,471$ Pseco:Tempo: $F_{4,129} = 1,050, p = 0,383$ Trat:Tempo: $F_{12,129} = 5,656, p < 0,001$ Pseco:Temp: $F_{1,129} = 0,877, p = 0,350$ Trat:Temp: $F_{3,129} = 0,981, p = 0,403$ Tempo:Temp: $F_{2,129} = 0,995, p = 0,372$ Pseco:Trat:Tempo: $F_{12,129} = 1,438, p = 0,156$ Pseco:Trat:Temp: $F_{3,129} = 0,255, p = 0,857$ Pseco:Tempo:Temp: $F_{2,129} = 0,748, p = 0,475$ Trat:Tempo:Temp: $F_{1,129} = 1,279, p = 0,260$ Pseco:Trat:Tempo:Temp: $F_{1,129} = 0,351, p = 0,554$
Filt~ Trat*Tempo*Temp	$F_{26,156} = 5,672, p < 0,001$	Trat: $F_{3,156} = 10,263, p < 0,001$ Tempo: $F_{4,156} = 9,220, p < 0,001$ Temp: $F_{1,156} = 7,970, p = 0,005$ Trat:Tempo: $F_{12,156} = 5,477, p < 0,001$ Trat:Temp: $F_{3,156} = 0,987, p = 0,400$ Tempo:Temp: $F_{2,156} = 0,917, p = 0,401$ Trat:Tempo:Temp: $F_{1,156} = 1,294, p = 0,257$
Filt~ Trat*Tempo*Pseco	$F_{39,143} = 4,517, p < 0,001$	Trat: $F_{3,143} = 11,285, p < 0,001$ Tempo: $F_{4,143} = 9,419, p < 0,001$ Pseco: $F_{1,143} = 0,269, p = 0,604$ Trat:Tempo: $F_{12,143} = 6,527, p < 0,001$ Trat:Pseco: $F_{3,143} = 1,188, p = 0,316$ Tempo:Pseco: $F_{4,143} = 1,258, p = 0,289$ Trat:Tempo:Pseco: $F_{12,143} = 1,589, p = 0,100$
Filt~ Trat*Tempo	$F_{19,163} = 7,482, p < 0,001$	Trat: $F_{3,163} = 10,979, p < 0,001$ Tempo: $F_{4,163} = 9,271, p < 0,001$ Trat:Tempo: $F_{12,163} = 6,175, p < 0,001$

Tabela Suplementar 4. Modelo de Filtração~Tratamento*Tempo. Na análise é possível observar DS para os Tratamentos CIN e MIX, para os Tempos T1, T2 e interação entre CIN:T1, MC:T1, MIX:T1, CIN:T2 e MIX:T2.

Modelo de análise: Filtração ~ Tratamento * Tempo					
Fatores:					
	Estimativa	Erro padrão	t valor	Pr(> t)	
(Linha de corte)	1049,2	325,6	3,222	0,001537	**
TratCIN	1915,4	460,5	4,159	5,15e-05	***
TratMC	262,0	460,5	0,569	0,570184	
TratMIX	1646,7	460,5	3,576	0,000460	***
TempoT1	1431,0	460,5	3,107	0,002228	**

TempoT2	1490,1	460,5	3,236	0,001470	**
TempoT3	-247,7	488,4	-0,507	0,612821	
TempoT4	-134,3	460,5	-0,292	0,770901	
TratCIN:TempoT1	-2260,8	685,3	-3,299	0,001191	**
TratMC:TempoT1	-1493,2	728,1	-2,051	0,041894	*
TratMIX:TempoT1	1412,1	703,4	2,007	0,046363	*
TratCIN:TempoT2	-2302,9	685,3	-3,361	0,000969	***
TratMC:TempoT2	-1028,2	651,3	-1,579	0,116318	
TratMIX:TempoT2	-2512,7	651,3	-3,858	0,000164	***
TratCIN:TempoT3	-688,4	671,3	-1,025	0,306695	
TratMC:TempoT3	180,6	671,3	0,269	0,788275	
TratMIX:TempoT3	-779,8	671,3	-1,162	0,247076	
TratCIN:TempoT4	-399,8	651,3	-0,614	0,540095	
TratMC:TempoT4	293,7	651,3	0,451	0,652583	
TratMIX:TempoT4	-1201,1	651,3	-1,844	0,066950	.
Erro padrão residual: 1030 em 163 graus de liberdade					
R-quadrado múltiplo: 0,4658, R-quadrado ajustado: 0,4036					
F-estatística: 7,482 em 19 e 163 DF, p-valor: 2,595e-14					

Tabela Suplementar 5. ANOVA do modelo Filtração~Tratamento*Tempo. Análise apresenta DS para Tratamento, Tempo e para interação entre Tratamento:Tempo.

Modelo de análise: Filtração ~ Tratamento * Tempo					
Resposta: Filtração					
	Sum Sq	Df	F valor	Pr(>F)	
Trat	34924873	3	10,9791	1,321e-06	***
Tempo	39325494	4	9,2719	8,931e-07	***
Trat:Tempo	78579115	12	6,1756	6,681e-09	***
Residual	172836419	163			

Tabela Suplementar 6. Matriz de combinação por pares e teste Tukey para as covariáveis Tratamento e Tempo do modelo Filtração~Tratamento*Tempo. As DS podem ser observadas abaixo.

Trat	Tempo	Diferenças entre	Estimativa	SE	df	Relação t	Valor p	
C	.	T0 - T1	-1430,9660	460,5097	163	-3,107	0,1445	
C	.	T0 - T2	-1490,0550	460,5097	163	-3,236	0,0978	.
C	.	T0 - T3	247,6543	488,4443	163	0,507	1,0000	
C	.	T0 - T4	134,3220	460,5097	163	0,292	1,0000	
C	.	T1 - T2	-59,0890	460,5097	163	-0,128	1,0000	
C	.	T1 - T3	1678,6202	488,4443	163	3,437	0,0510	.
C	.	T1 - T4	1565,2880	460,5097	163	3,399	0,0578	.
C	.	T2 - T3	1737,7092	488,4443	163	3,558	0,0337	*
C	.	T2 - T4	1624,3770	460,5097	163	3,527	0,0375	*
C	.	T3 - T4	-113,3323	488,4443	163	-0,232	1,0000	

CIN	.	T0 - T1	829,8337	507,4570	163	1,635	0,9995	
CIN	.	T0 - T2	812,8137	507,4570	163	1,602	0,9997	
CIN	.	T0 - T3	936,0060	460,5097	163	2,033	0,9563	
CIN	.	T0 - T4	534,1720	460,5097	163	1,160	1,0000	
CIN	.	T1 - T2	-17,0200	550,4144	163	-0,031	1,0000	
CIN	.	T1 - T3	106,1723	507,4570	163	0,209	1,0000	
CIN	.	T1 - T4	-295,6617	507,4570	163	-0,583	1,0000	
CIN	.	T2 - T3	123,1923	507,4570	163	0,243	1,0000	
CIN	.	T2 - T4	-278,6417	507,4570	163	-0,549	1,0000	
CIN	.	T3 - T4	-401,8340	460,5097	163	-0,873	1,0000	
MC	.	T0 - T1	62,2360	564,0069	163	0,110	1,0000	
MC	.	T0 - T2	-461,8400	460,5097	163	-1,003	1,0000	
MC	.	T0 - T3	67,0780	460,5097	163	0,146	1,0000	
MC	.	T0 - T4	-159,4010	460,5097	163	-0,346	1,0000	
MC	.	T1 - T2	-524,0760	564,0069	163	-0,929	1,0000	
MC	.	T1 - T3	4,8420	564,0069	163	0,009	1,0000	
MC	.	T1 - T4	-221,6370	564,0069	163	-0,393	1,0000	
MC	.	T2 - T3	528,9180	460,5097	163	1,149	1,0000	
MC	.	T2 - T4	302,4390	460,5097	163	0,657	1,0000	
MC	.	T3 - T4	-226,4790	460,5097	163	-0,492	1,0000	
MIX	.	T0 - T1	-2843,0277	531,7509	163	-5,347	<,0001	***
MIX	.	T0 - T2	1022,6420	460,5097	163	2,221	0,8606	
MIX	.	T0 - T3	1027,4720	460,5097	163	2,231	0,8532	
MIX	.	T0 - T4	1335,4580	460,5097	163	2,900	0,2577	
MIX	.	T1 - T2	3865,6697	531,7509	163	7,270	<,0001	***
MIX	.	T1 - T3	3870,4997	531,7509	163	7,279	<,0001	***
MIX	.	T1 - T4	4178,4857	531,7509	163	7,858	<,0001	***
MIX	.	T2 - T3	4,8300	460,5097	163	0,010	1,0000	
MIX	.	T2 - T4	312,8160	460,5097	163	0,679	1,0000	
MIX	.	T3 - T4	307,9860	460,5097	163	0,669	1,0000	
.	T0	C - CIN	-1915,4500	460,5097	163	-4,159	0,0036	*
.	T0	C - MC	-262,0000	460,5097	163	-0,569	1,0000	
.	T0	C - MIX	-1646,7360	460,5097	163	-3,576	0,0317	*
.	T0	CIN - MC	1653,4500	460,5097	163	3,590	0,0301	*
.	T0	CIN - MIX	268,7140	460,5097	163	0,584	1,0000	
.	T0	MC - MIX	-1384,7360	460,5097	163	-3,007	0,1929	
.	T1	C - CIN	345,3497	507,4570	163	0,681	1,0000	
.	T1	C - MC	1231,2020	564,0069	163	2,183	0,8854	
.	T1	C - MIX	-3058,7977	531,7509	163	-5,752	<,0001	***
.	T1	CIN - MC	885,8523	602,9488	163	1,469	1,0000	
.	T1	CIN - MIX	-3404,1474	572,8895	163	-5,942	<,0001	***
.	T1	MC - MIX	-4289,9997	623,5331	163	-6,880	<,0001	***

.	T2	C - CIN	387,4187	507,4570	163	0,763	1,0000	
.	T2	C - MC	766,2150	460,5097	163	1,664	0,9993	
.	T2	C - MIX	865,9610	460,5097	163	1,880	0,9885	
.	T2	CIN - MC	378,7963	507,4570	163	0,746	1,0000	
.	T2	CIN - MIX	478,5423	507,4570	163	0,943	1,0000	
.	T2	MC - MIX	99,7460	460,5097	163	0,217	1,0000	
.	T3	C - CIN	-1227,0983	488,4443	163	-2,512	0,5990	
.	T3	C - MC	-442,5763	488,4443	163	-0,906	1,0000	
.	T3	C - MIX	-866,9183	488,4443	163	-1,775	0,9965	
.	T3	CIN - MC	784,5220	460,5097	163	1,704	0,9987	
.	T3	CIN - MIX	360,1800	460,5097	163	0,782	1,0000	
.	T3	MC - MIX	-424,3420	460,5097	163	-0,921	1,0000	
.	T4	C - CIN	-1515,6000	460,5097	163	-3,291	0,0821	.
.	T4	C - MC	-555,7230	460,5097	163	-1,207	1,0000	
.	T4	C - MIX	-445,6000	460,5097	163	-0,968	1,0000	
.	T4	CIN - MC	959,8770	460,5097	163	2,084	0,9368	
.	T4	CIN - MIX	1070,0000	460,5097	163	2,324	0,7798	
.	T4	MC - MIX	110,1230	460,5097	163	0,239	1,0000	

3. Bissos

Tabela Suplementar 7. Resultados dos modelos de interação testados para bissos e os correspondentes testes ANOVA. (Bissos) Número bissos formados; (Trat) Tratamento; (Tempo) Tempo amostragem; (Temp) Temperatura e (Pseco) Peso seco.

Modelo estatístico	Resultado do modelo	Resultado da Anova
Bissos~ Trat*Tempo*Temp*Pseco	$F_{53,146} = 1,147, p = 0,260$	Pseco: $F_{6,146} = 0,631, p = 0,705$ Trat: $F_{7,146} = 1,325, p = 0,242$ Tempo: $F_{6,146} = 0,689, p = 0,658$ Temp: $F_{1,146} = 0,014, p = 0,905$ Pseco:Trat: $F_{3,146} = 0,389, p = 0,760$ Pseco:Tempo: $F_{4,146} = 0,126, p = 0,972$ Trat:Tempo: $F_{12,146} = 1,249, p = 0,255$ Pseco:Temp: $F_{1,146} = 0,390, p = 0,533$ Trat:Temp: $F_{3,146} = 0,028, p = 0,993$ Tempo:Temp: $F_{2,146} = 0,748, p = 0,474$ Pseco:Trat:Tempo: $F_{12,146} = 0,537, p = 0,887$ Pseco:Trat:Temp: $F_{3,146} = 0,499, p = 0,683$ Pseco:Tempo:Temp: $F_{2,146} = 1,194, p = 0,305$ Trat:Tempo:Temp: $F_{1,146} = 0,497, p = 0,481$ Pseco:Trat:Tempo:Temp: $F_{1,146} = 0,215, p = 0,643$
Bissos~ Trat*Tempo*Temp	$F_{26,173} = 1,154, p = 0,287$	Temp: $F_{1,173} = 0,458, p = 0,499$ Trat: $F_{3,173} = 1,311, p = 0,272$ Tempo: $F_{5,173} = 0,864, p = 0,506$ Trat:Temp: $F_{3,173} = 0,187, p = 0,904$ Temp:Tempo: $F_{4,173} = 0,171, p = 0,952$ Trat:Tempo: $F_{10,173} = 1,220, p = 0,280$ Trat:Tempo:Temp: $F_{1,173} = 0,515, p = 0,473$
Bissos~ Trat*Tempo*Pseco	$F_{39,160} = 1,465, p = 0,053$	Pseco: $F_{1,160} = 2,505, p = 0,115$ Trat: $F_{3,160} = 0,891, p = 0,447$ Tempo: $F_{4,160} = 1,356, p = 0,251$ Pseco:Trat: $F_{3,160} = 0,812, p = 0,488$ Pseco:Tempo: $F_{4,160} = 0,377, p = 0,824$ Trat:Tempo: $F_{12,143} = 1,654, p = 0,081$ Trat:Tempo:Pseco: $F_{12,160} = 1,739, p = 0,063$
Bissos~ Trat*Tempo	$F_{19,180} = 1,532, p = 0,079$	Trat: $F_{3,180} = 0,849, p = 0,468$ Tempo: $F_{4,180} = 1,525, p = 0,196$ Trat:Tempo: $F_{12,180} = 1,705, p = 0,068$

Tabela Suplementar 8. Resultados dos modelos de adição testados para bissos e os correspondentes testes ANOVA. Para este modelo apresentam-se os resultados correspondentes a cada covariável, excluindo a interação que não é calculada. (Bissos) Número bissos formados; (Trat) Tratamento; (Tempo) Tempo amostragem; (Temp) Temperatura e (Pseco) Peso seco.

Modelo estatístico	Resultado do modelo	Resultado da Anova
Bissos~ Trat+Tempo+Temp+Pseco	$F_{9,190} = 1,285, p = 0,247$	Trat: $F_{3,190} = 0,780, p = 0,506$ Tempo: $F_{4,190} = 0,731, p = 0,571$ Temp: $F_{1,190} = 0,085, p = 0,770$ Pseco: $F_{1,190} = 3,067, p = 0,081$

Bissos~ Trat+Tempo+Temp	$F_{8,191} = 1,051, p = 0,399$	Trat: $F_{3,191} = 0,767, p = 0,513$ Tempo: $F_{4,191} = 0,698, p = 0,593$ Temp: $F_{1,191} = 0,156, p = 0,693$
Bissos~ Trat+Tempo+Pseco	$F_{8,191} = 1,442, p = 0,181$	Trat: $F_{3,191} = 0,807, p = 0,490$ Tempo: $F_{4,191} = 1,395, p = 0,237$ Pseco: $F_{1,191} = 3,155, p = 0,077$
Bissos ~ Trat+Tempo	$F_{7,192} = 1,184, p = 0,313$	Trat: $F_{3,192} = 0,813, p = 0,488$ Tempo: $F_{4,192} = 1,461, p = 0,215$

Tabela Suplementar 9. Resultados dos modelos de interação testados para a presença ou ausência de bissos e os correspondentes testes ANOVA. (Fbissos) Bissos; (Trat) Tratamento; (Tempo) Tempo amostragem; (Temp) Temperatura e (Pseco) Peso seco.

Modelo estatístico	Resultado CIA	Resultado da Anova
Fbissos~ Trat*Tempo*Temp*Pseco	3135,7	Trat: $p = 0,332$ Tempo: $p < 0,001$ Temp: $p = 0,563$ Pseco: sem resultados Trat:Tempo: $p = 0,446$ Trat:Temp: $p = 0,540$ Tempo:Temp: $p = 0,176$ Trat:Pseco: $p = 1,000$ Tempo:Pseco: $p = 1,000$ Temp:Pseco: $p = 0,792$ Trat:Tempo:Temp: $p = 1,000$ Trat:Tempo:Pseco: $p = 1,000$ Tempo:Temp:Pseco: $p = 1,000$ Tempo:Temp:Pseco: $p = 1,000$ Trat:Tempo:Temp:Pseco: sem resultados
Fbissos~ Trat*Tempo*Temp	581,78	Trat: $p = 0,425$ Tempo: $p < 0,001$ Temp: $p = 0,271$ Trat:Tempo: $p = 0,603$ Trat:Temp: $p = 0,844$ Tempo:Temp: $p = 0,486$ Trat:Tempo:Temp: $p = 1,000$
Fbissos~ Trat*Tempo*Pseco	221,28	Trat: $p = 0,635$ Tempo: $p < 0,001$ Pseco: $p = 0,778$ Trat:Tempo: $p = 0,053$ Trat:Pseco: $p = 0,611$ Tempo:Pseco: $p = 0,140$ Trat:Tempo:Pseco: $p = 0,234$
Fbissos~ Trat*Tempo	207,91	Trat: $p = 0,618$ Tempo: $p < 0,001$ Trat:Tempo: $p = 0,051$

Tabela Suplementar 10. Resultados dos modelos de adição testados para bissos e os correspondentes testes ANOVA.

Para este modelo apresentam-se os resultados correspondentes a cada covariável, excluindo a interação que não é calculada. (Fbissos) Bissos; (Trat) Tratamento; (Tempo) Tempo amostragem; (Temp) Temperatura e (Pseco) Peso seco.

Modelo estatístico	Resultado CIA	Resultado da Anova
Fbissos~ Trat+Tempo+Temp+Pseco	208,65	Trat: $p = 0,637$ Tempo: $p = 0,001$ Temp: $p = 0,963$ Pseco: $p = 0,642$
Fbissos~ Trat+Tempo+Temp	206,86	Trat: $p = 0,635$ Tempo: $p = 0,001$ Temp: $p = 0,935$

Fbissos~ Trat+Tempo+Pseco	206,65	Trat: $p = 0,622$ Tempo: $p < 0,001$ Pseco: $p = 0,638$
Fbissos ~ Trat+Tempo	204,87	Trat: $p = 0,618$ Tempo: $p < 0,001$

Tabela Suplementar 11. Modelo de Fbissos~Tratamento+Tempo (fator binomial). Na análise é possível observar DS para a covariável tempo T2.

Modelo de análise: Fbissos ~ Tratamento + Tempo					
Fatores:					
	Estimativa	Erro padrão	z valor	Pr(> z)	
(Linha de corte)	1,6907	0,5316	3,180	0,00147	**
TratCIN	0,1437	0,5365	0,268	0,78880	
TratMC	-0,4960	0,5019	-0,988	0,32304	
TratMIX	-0,1343	0,5185	-0,259	0,79569	
TempoT1	-0,5872	0,5492	-1,069	0,28498	
TempoT2	-1,3662	0,5270	-2,592	0,00953	**
TempoT3	0,3984	0,6363	0,626	0,53122	
TempoT4	0,9679	0,7326	1,321	0,18644	
CIA: 204,87					

Tabela Suplementar 12. ANOVA do modelo Fbissos~Tratamento+Tempo. Análise apresenta DS para Tempo.

Modelo de análise: Fbissos ~ Tratamento * Tempo				
Resposta: Bissos				
	LR Chisq	Df	Pr(>Chisq)	
Trat	1.7856	3	0.6180717	
Tempo	20.2962	4	0.0004364	***

Parâmetros bioquímicos

4. Proteína total

Tabela Suplementar 13. Resultados dos modelos de interação testados para a proteína total e os correspondentes testes ANOVA. (Prot) Proteína total; (Trat) Tratamento; (Tempo) Tempo amostragem; (Temp) Temperatura e (Pseco) Peso seco.

Modelo estatístico	Resultado do modelo	Resultado da Anova
Prot ~ Trat*Tempo*Temp*Pseco	$F_{51,48} = 3,981, p < 0,001$	Pseco: $F_{15,48} = 0,664, p = 0,805$ Trat: $F_{22,48} = 1,805, p = 0,044$ Tempo: $F_{16,48} = 10,156, p < 0,001$ Temp: $F_{1,48} = 1,342, p = 0,252$ Pseco:Trat: $F_{8,48} = 0,870, p = 0,547$ Pseco:Tempo: $F_{5,48} = 0,279, p = 0,922$ Trat:Tempo: $F_{12,48} = 0,664, p = 0,775$ Pseco:Temp: $F_{1,48} = 0,380, p = 0,540$ Trat:Temp: $F_{3,48} = 0,566, p = 0,639$ Tempo:Temp: $F_{2,48} = 3,534, p = 0,036$ Pseco:Trat:Tempo: $F_{12,48} = 0,348, p = 0,974$ Pseco:Trat:Temp: $F_{3,48} = 0,192, p = 0,901$ Pseco:Tempo:Temp: $F_{2,48} = 0,247, p = 0,781$ Trat:Tempo:Temp: sem interação Pseco:Trat:Tempo:Temp: sem interação
Prot ~ Trat*Tempo*Temp	$F_{26,73} = 8,620, p < 0,001$	Trat: $F_{3,73} = 1,561, p = 0,205$ Tempo: $F_{4,73} = 44,175, p < 0,001$ Temp: $F_{1,73} = 0,443, p = 0,507$ Trat:Tempo: $F_{12,73} = 1,141, p = 0,341$ Trat:Temp: $F_{3,73} = 0,357, p = 0,783$ Tempo:Temp: $F_{2,73} = 7,223, p = 0,001$ Trat:Tempo:Temp: $F_{1,73} = 1,005, p = 0,319$
Prot ~ Trat*Tempo*Pseco	$F_{39,60} = 4,745, p < 0,001$	Trat: $F_{3,60} = 1,318, p = 0,276$ Tempo: $F_{4,60} = 36,879, p < 0,001$ Pseco: $F_{1,60} = 1,457, p = 0,231$ Trat:Tempo: $F_{12,60} = 1,415, p = 0,184$ Trat:Pseco: $F_{3,60} = 1,808, p = 0,155$ Tempo:Pseco: $F_{4,60} = 0,247, p = 0,910$ Trat:Tempo:Pseco: $F_{12,60} = 0,659, p = 0,782$
Prot ~ Trat*Tempo	$F_{19,80} = 9,492, p < 0,001$	Trat: $F_{3,80} = 1,576, p = 0,201$ Tempo: $F_{4,80} = 39,145, p < 0,001$ Trat:Tempo: $F_{12,80} = 1,586, p = 0,112$

Tabela Suplementar 14. Resultados dos modelos de adição testados para proteína total e os correspondentes testes ANOVA. Para este modelo apresentam-se os resultados correspondentes a cada covariável, excluindo a interação que não é calculada. (Prot) Proteína total; (Trat) Tratamento; (Tempo) Tempo amostragem; (Temp) Temperatura e (Pseco) Peso seco.

Modelo estatístico	Resultado do modelo	Resultado da Anova
Prot~ Trat+Tempo+Temp+Pseco	$F_{9,90} = 16,630, p < 0,001$	Tratamento: $F_{3,90} = 1,287, p = 0,283$ Tempo: $F_{4,90} = 35,528, p < 0,001$ Temperatura: $F_{1,90} = 0,156, p = 0,693$ Peso seco: $F_{1,90} = 1,010, p = 0,317$

Prot ~ Trat+Tempo+Temp	$F_{8,91} = 18,580, p < 0,001$	Tratamento: $F_{3,91} = 1,271, p = 0,289$ Tempo: $F_{4,91} = 35,515, p < 0,001$ Temperatura: $F_{1,91} = 0,144, p = 0,704$
Proteína total ~ Trat+Tempo+Pseco	$F_{8,91} = 18,860, p < 0,001$	Tratamento: $F_{3,91} = 1,491, p = 0,222$ Tempo: $F_{4,91} = 36,377, p < 0,001$ Peso seco: $F_{1,91} = 1,008, p = 0,318$
Prot ~ Trat+Tempo	$F_{7,92} = 21,410, p < 0,001$	Tratamento: $F_{3,92} = 1,464, p = 0,229$ Tempo: $F_{4,92} = 36,365, p < 0,001$

Tabela Suplementar 15. Modelo de Proteína total~Tratamento+Tempo. Na análise é possível observar DS para os Tempos T1, T3 e T4.

Modelo de análise: Proteína ~ Tratamento + Tempo					
Fatores:					
	Estimativa	Erro padrão	t valor	Pr(> t)	
(Linha de corte)	97,408	14,569	6,686	1,74e-09	***
TratCIN	22,811	14,569	1,566	0,121	
TratMC	22,385	14,569	1,536	0,128	
TratMIX	2,119	14,569	0,145	0,885	
TempoT1	69,817	16,289	4,286	4,47e-05	***
TempoT2	20,882	16,289	1,282	0,203	
TempoT3	90,814	16,289	5,575	2,46e-07	***
TempoT4	177,554	16,289	10,900	< 2e-16	***
Erro padrão residual: 51,51 em 92 graus de liberdade					
R-quadrado múltiplo: 0,6196, R-quadrado ajustado: 0,5907					
F-estatística: 21,41 em 7 e 92 DF, p-valor: < 2,2e-16					

Tabela Suplementar 16. ANOVA do modelo Proteína total~Tratamento+Tempo. Análise apresenta DS para Tempo.

Modelo de análise: Proteína ~ Tratamento + Tempo					
Resposta: Proteína total					
	Sum Sq	Df	F valor	Pr(>F)	
Trat	11656	3	1,4643	0,2294	
Tempo	385945	4	36,3650	<2e-16	***
Residuals	244101	92			

Tabela Suplementar 17. Matriz de combinação por pares e teste Tukey para as covariáveis Tratamento e Tempo do modelo Proteína total~Tratamento+Tempo. As DS podem ser observadas abaixo.

Trat	Tempo	Diferenças entre	Estimativa	SE	df	Relação t	Valor p	
C	.	T0 - T1	-69,8170	16,28888	92	-4,286	0,0031	**
C	.	T0 - T2	-20,8820	16,28888	92	-1,282	1,0000	
C	.	T0 - T3	-90,8140	16,28888	92	-5,575	<,0001	***
C	.	T0 - T4	-177,5540	16,28888	92	-10,900	<,0001	***

C	.	T1 - T2	48,9350	16,28888	92	3,004	0,2138	
C	.	T1 - T3	-20,9970	16,28888	92	-1,289	1,0000	
C	.	T1 - T4	-107,7370	16,28888	92	-6,614	<,0001	***
C	.	T2 - T3	-69,9320	16,28888	92	-4,293	0,0030	**
C	.	T2 - T4	-156,6720	16,28888	92	-9,618	<,0001	***
C	.	T3 - T4	-86,7400	16,28888	92	-5,325	<,0001	***
CIN	.	T0 - T1	-69,8170	16,28888	92	-4,286	0,0031	**
CIN	.	T0 - T2	-20,8820	16,28888	92	-1,282	1,0000	
CIN	.	T0 - T3	-90,8140	16,28888	92	-5,575	<,0001	***
CIN	.	T0 - T4	-177,5540	16,28888	92	-10,900	<,0001	***
CIN	.	T1 - T2	48,9350	16,28888	92	3,004	0,2138	
CIN	.	T1 - T3	-20,9970	16,28888	92	-1,289	1,0000	
CIN	.	T1 - T4	-107,7370	16,28888	92	-6,614	<,0001	***
CIN	.	T2 - T3	-69,9320	16,28888	92	-4,293	0,0030	**
CIN	.	T2 - T4	-156,6720	16,28888	92	-9,618	<,0001	***
CIN	.	T3 - T4	-86,7400	16,28888	92	-5,325	<,0001	***
MC	.	T0 - T1	-69,8170	16,28888	92	-4,286	0,0031	**
MC	.	T0 - T2	-20,8820	16,28888	92	-1,282	1,0000	
MC	.	T0 - T3	-90,8140	16,28888	92	-5,575	<,0001	***
MC	.	T0 - T4	-177,5540	16,28888	92	-10,900	<,0001	***
MC	.	T1 - T2	48,9350	16,28888	92	3,004	0,2138	
MC	.	T1 - T3	-20,9970	16,28888	92	-1,289	1,0000	
MC	.	T1 - T4	-107,7370	16,28888	92	-6,614	<,0001	***
MC	.	T2 - T3	-69,9320	16,28888	92	-4,293	0,0030	**
MC	.	T2 - T4	-156,6720	16,28888	92	-9,618	<,0001	***
MC	.	T3 - T4	-86,7400	16,28888	92	-5,325	<,0001	***
MIX	.	T0 - T1	-69,8170	16,28888	92	-4,286	0,0031	**
MIX	.	T0 - T2	-20,8820	16,28888	92	-1,282	1,0000	
MIX	.	T0 - T3	-90,8140	16,28888	92	-5,575	<,0001	***
MIX	.	T0 - T4	-177,5540	16,28888	92	-10,900	<,0001	***
MIX	.	T1 - T2	48,9350	16,28888	92	3,004	0,2138	
MIX	.	T1 - T3	-20,9970	16,28888	92	-1,289	1,0000	
MIX	.	T1 - T4	-107,7370	16,28888	92	-6,614	<,0001	***
MIX	.	T2 - T3	-69,9320	16,28888	92	-4,293	0,0030	**
MIX	.	T2 - T4	-156,6720	16,28888	92	-9,618	<,0001	***
MIX	.	T3 - T4	-86,7400	16,28888	92	-5,325	<,0001	***
.	T0	C - CIN	-22,8108	14,56921	92	-1,566	0,9999	
.	T0	C - MC	-22,3852	14,56921	92	-1,536	0,9999	
.	T0	C - MIX	-2,1192	14,56921	92	-0,145	1,0000	
.	T0	CIN - MC	0,4256	14,56921	92	0,029	1,0000	
.	T0	CIN - MIX	20,6916	14,56921	92	1,420	1,0000	

.	T0	MC - MIX	20,2660	14,56921	92	1,391	1,0000	
.	T1	C - CIN	-22,8108	14,56921	92	-1,566	0,9999	
.	T1	C - MC	-22,3852	14,56921	92	-1,536	0,9999	
.	T1	C - MIX	-2,1192	14,56921	92	-0,145	1,0000	
.	T1	CIN - MC	0,4256	14,56921	92	0,029	1,0000	
.	T1	CIN - MIX	20,6916	14,56921	92	1,420	1,0000	
.	T1	MC - MIX	20,2660	14,56921	92	1,391	1,0000	
.	T2	C - CIN	-22,8108	14,56921	92	-1,566	0,9999	
.	T2	C - MC	-22,3852	14,56921	92	-1,536	0,9999	
.	T2	C - MIX	-2,1192	14,56921	92	-0,145	1,0000	
.	T2	CIN - MC	0,4256	14,56921	92	0,029	1,0000	
.	T2	CIN - MIX	20,6916	14,56921	92	1,420	1,0000	
.	T2	MC - MIX	20,2660	14,56921	92	1,391	1,0000	
.	T3	C - CIN	-22,8108	14,56921	92	-1,566	0,9999	
.	T3	C - MC	-22,3852	14,56921	92	-1,536	0,9999	
.	T3	C - MIX	-2,1192	14,56921	92	-0,145	1,0000	
.	T3	CIN - MC	0,4256	14,56921	92	0,029	1,0000	
.	T3	CIN - MIX	20,6916	14,56921	92	1,420	1,0000	
.	T3	MC - MIX	20,2660	14,56921	92	1,391	1,0000	
.	T4	C - CIN	-22,8108	14,56921	92	-1,566	0,9999	
.	T4	C - MC	-22,3852	14,56921	92	-1,536	0,9999	
.	T4	C - MIX	-2,1192	14,56921	92	-0,145	1,0000	
.	T4	CIN - MC	0,4256	14,56921	92	0,029	1,0000	
.	T4	CIN - MIX	20,6916	14,56921	92	1,420	1,0000	
.	T4	MC - MIX	20,2660	14,56921	92	1,391	1,0000	

5. Glicogénio total

Tabela Suplementar 18. Resultados dos modelos de interação testados para glicogénio total e os correspondentes testes ANOVA. (Glic) Glicogénio total; (Trat) Tratamento; (Tempo) Tempo amostragem; (Temp) Temperatura e (Pseco) Peso seco.

Modelo estatístico	Resultado do modelo	Resultado da Anova
Glic~ Trat*Tempo*Temp*Pseco	$F_{51,48} = 1,671, p = 0,037$	Trat: $F_{9,48} = 1,723, p = 0,109$ Tempo: $F_{7,48} = 3,959, p = 0,001$ Temp: $F_{1,48} = 0,328, p = 0,569$ Pseco: $F_{5,48} = 2,642, p = 0,034$ Trat:Tempo: $F_{12,48} = 1,299, p = 0,250$ Trat:Temp: $F_{3,48} = 0,179, p = 0,910$ Tempo:Temp: $F_{2,48} = 0,783, p = 0,462$ Trat:Pseco: $F_{3,48} = 1,484, p = 0,230$ Tempo:Pseco: $F_{4,48} = 1,709, p = 0,163$ Temp:Pseco: $F_{1,48} = 0,112, p = 0,739$ Trat:Tempo:Temp: $F_{1,48} = 0,052, p = 0,819$ Trat:Tempo:Pseco: $F_{12,48} = 0,573, p = 0,852$ Trat:Temp:Pseco: $F_{3,48} = 0,206, p = 0,891$ Tempo:Temp:Pseco: $F_{1,48} = 0,287, p = 0,594$ Trat:Tempo:Temp:Pseco: sem resultados
Glic ~ Trat*Tempo*Temp	$F_{26,73} = 2,085, p = 0,007$	Trat: $F_{3,73} = 1,662, p = 0,182$ Tempo: $F_{4,73} = 6,345, p < 0,001$ Temp: $F_{1,73} = 1,397, p = 0,241$ Trat:Tempo: $F_{12,73} = 1,236, p = 0,275$ Trat:Temp: $F_{3,73} = 0,574, p = 0,633$ Tempo:Temp: $F_{2,73} = 1,092, p = 0,340$ Trat:Tempo:Temp: $F_{1,73} = 1,530, p = 0,220$
Glic ~ Trat*Tempo*Pseco	$F_{39,60} = 2,284, p = 0,001$	Trat: $F_{3,60} = 2,428, p = 0,074$ Tempo: $F_{4,60} = 5,624, p < 0,001$ Pseco: $F_{1,60} = 12,324, p < 0,001$ Trat:Tempo: $F_{12,60} = 1,416, p = 0,183$ Trat: Pseco: $F_{3,60} = 0,861, p = 0,466$ Tempo: Pseco: $F_{4,60} = 1,251, p = 0,299$ Trat:Tempo: Pseco: $F_{12,60} = 0,920, p = 0,532$
Glic ~ Trat*Tempo	$F_{19,80} = 2,558, p = 0,001$	Trat: $F_{3,80} = 2,165, p = 0,098$ Tempo: $F_{4,80} = 6,318, p < 0,001$ Trat:Tempo: $F_{12,80} = 1,403, p = 0,181$

Tabela Suplementar 19. Resultados dos modelos de adição testados para glicogénio total e os correspondentes testes ANOVA. Para este modelo apresentam-se os resultados correspondentes a cada covariável, excluindo a interação que não é calculada. (Glic) Glicogénio total; (Trat) Tratamento; (Tempo) Tempo amostragem; (Temp) Temperatura e (Pseco) Peso seco.

Modelo estatístico	Resultado do modelo	Resultado da Anova
Glic~ Trat+Tempo+Temp+Pseco	$F_{9,90} = 4,777, p < 0,001$	Trat: $F_{3,90} = 1,624, p = 0,189$ Tempo: $F_{4,90} = 5,986, p < 0,001$ Temp: $F_{1,90} = 0,001, p = 0,974$ Pseco: $F_{1,90} = 10,130, p = 0,002$

Glic ~ Trat+Tempo+Temp	$F_{8,91} = 3,733, p < 0,001$	Trat: $F_{3,91} = 1,895, p = 0,135$ Tempo: $F_{4,91} = 5,905, p < 0,001$ Temp: $F_{1,91} = 0,005, p = 0,940$
Glic ~ Trat+Tempo+Pseco	$F_{8,91} = 5,433, p < 0,001$	Trat: $F_{3,91} = 1,844, p = 0,144$ Tempo: $F_{4,91} = 6,092, p < 0,001$ Pseco: $F_{1,92} = 10,248, p = 0,001$

Tabela Suplementar 20. Modelo de Glicogénio total~Tratamento+Tempo+Peso seco. Na análise é possível observar DS para o tratamento CIN, para o tempo T2 e peso seco.

Modelo de análise: Glicogénio ~ Tratamento + Tempo + Peso seco					
Fatores:					
	Estimativa	Erro padrão	t valor	Pr(> t)	
(Linha de corte)	11,445	2,651	4,317	4,02e-05	***
TratCIN	3,860	1,650	2,339	0,02153	*
TratMC	2,068	1,662	1,245	0,21648	
TratMIX	1,670	1,651	1,012	0,31422	
TempoT1	-3,168	1,842	-1,720	0,08885	.
TempoT2	-8,786	1,849	-4,753	7,47e-06	***
TempoT3	-3,669	1,851	-1,982	0,05050	.
TempoT4	-2,421	1,871	-1,294	0,19895	
Pseco	7,786	2,432	3,201	0,00188	**
Erro padrão residual: 5,824em 91 graus de liberdade					
R-quadrado múltiplo: 0,3232, R-quadrado ajustado: 0,2638					
F-estatística: 5,433 em 8 e 91 DF, p-valor: 1,333e-05					

Tabela Suplementar 21. ANOVA do modelo Glicogénio total~Tratamento+Tempo+Peso seco. Análise apresenta DS para Tempo e Peso seco.

Modelo de análise: Glicogénio ~ Tratamento + Tempo + Peso seco					
Resposta: Proteína total					
	Sum Sq	Df	F valor	Pr(>F)	
Trat	187,74	3	1,8447	0,1446419	
Tempo	826,68	4	6,0921	0,0002174	***
Pseco	347,66	1	10,2482	0,0018849	**
Residuals	3087,12	91			

Tabela Suplementar 22. Matriz de combinação por pares e teste Tukey para as covariáveis Tratamento e Tempo do modelo Glicogénio total~Tratamento+Tempo. As DS podem ser observadas abaixo.

Trat	Tempo	Diferenças entre	Estimativa	SE	df	Relação t	Valor p	
C	.	T0 - T1	3,1682795	1,842128	91	1,720	0,9985	
C	.	T0 - T2	8,7857907	1,848526	91	4,753	0,0005	***
C	.	T0 - T3	3,6686426	1,850988	91	1,982	0,9734	

C	.	T0 - T4	2,4208643	1,870895	91	1,294	1,0000	
C	.	T1 - T2	5,6175112	1,846111	91	3,043	0,1932	
C	.	T1 - T3	0,5003631	1,848119	91	0,271	1,0000	
C	.	T1 - T4	-0,7474152	1,865606	91	-0,401	1,0000	
C	.	T2 - T3	-5,1171481	1,842051	91	-2,778	0,3729	
C	.	T2 - T4	-6,3649264	1,849821	91	-3,441	0,0596	.
C	.	T3 - T4	-1,2477783	1,847533	91	-0,675	1,0000	
CIN	.	T0 - T1	3,1682795	1,842128	91	1,720	0,9985	
CIN	.	T0 - T2	8,7857907	1,848526	91	4,753	0,0005	***
CIN	.	T0 - T3	3,6686426	1,850988	91	1,982	0,9734	
CIN	.	T0 - T4	2,4208643	1,870895	91	1,294	1,0000	
CIN	.	T1 - T2	5,6175112	1,846111	91	3,043	0,1932	
CIN	.	T1 - T3	0,5003631	1,848119	91	0,271	1,0000	
CIN	.	T1 - T4	-0,7474152	1,865606	91	-0,401	1,0000	
CIN	.	T2 - T3	-5,1171481	1,842051	91	-2,778	0,3729	
CIN	.	T2 - T4	-6,3649264	1,849821	91	-3,441	0,0596	.
CIN	.	T3 - T4	-1,2477783	1,847533	91	-0,675	1,0000	
MC	.	T0 - T1	3,1682795	1,842128	91	1,720	0,9985	
MC	.	T0 - T2	8,7857907	1,848526	91	4,753	0,0005	***
MC	.	T0 - T3	3,6686426	1,850988	91	1,982	0,9734	
MC	.	T0 - T4	2,4208643	1,870895	91	1,294	1,0000	
MC	.	T1 - T2	5,6175112	1,846111	91	3,043	0,1932	
MC	.	T1 - T3	0,5003631	1,848119	91	0,271	1,0000	
MC	.	T1 - T4	-0,7474152	1,865606	91	-0,401	1,0000	
MC	.	T2 - T3	-5,1171481	1,842051	91	-2,778	0,3729	
MC	.	T2 - T4	-6,3649264	1,849821	91	-3,441	0,0596	.
MC	.	T3 - T4	-1,2477783	1,847533	91	-0,675	1,0000	
MIX	.	T0 - T1	3,1682795	1,842128	91	1,720	0,9985	
MIX	.	T0 - T2	8,7857907	1,848526	91	4,753	0,0005	***
MIX	.	T0 - T3	3,6686426	1,850988	91	1,982	0,9734	
MIX	.	T0 - T4	2,4208643	1,870895	91	1,294	1,0000	
MIX	.	T1 - T2	5,6175112	1,846111	91	3,043	0,1932	
MIX	.	T1 - T3	0,5003631	1,848119	91	0,271	1,0000	
MIX	.	T1 - T4	-0,7474152	1,865606	91	-0,401	1,0000	
MIX	.	T2 - T3	-5,1171481	1,842051	91	-2,778	0,3729	
MIX	.	T2 - T4	-6,3649264	1,849821	91	-3,441	0,0596	.
MIX	.	T3 - T4	-1,2477783	1,847533	91	-0,675	1,0000	
.	T0	C - CIN	-3,8596669	1,650220	91	-2,339	0,7821	
.	T0	C - MC	-2,0683571	1,661886	91	-1,245	1,0000	
.	T0	C - MIX	-1,6703055	1,650511	91	-1,012	1,0000	
.	T0	CIN - MC	1,7913097	1,677292	91	1,068	1,0000	

.	T0	CIN - MIX	2,1893613	1,659203	91	1,320	1,0000	
.	T0	MC - MIX	0,3980516	1,651607	91	0,241	1,0000	
.	T1	C - CIN	-3,8596669	1,650220	91	-2,339	0,7821	
.	T1	C - MC	-2,0683571	1,661886	91	-1,245	1,0000	
.	T1	C - MIX	-1,6703055	1,650511	91	-1,012	1,0000	
.	T1	CIN - MC	1,7913097	1,677292	91	1,068	1,0000	
.	T1	CIN - MIX	2,1893613	1,659203	91	1,320	1,0000	
.	T1	MC - MIX	0,3980516	1,651607	91	0,241	1,0000	
.	T2	C - CIN	-3,8596669	1,650220	91	-2,339	0,7821	
.	T2	C - MC	-2,0683571	1,661886	91	-1,245	1,0000	
.	T2	C - MIX	-1,6703055	1,650511	91	-1,012	1,0000	
.	T2	CIN - MC	1,7913097	1,677292	91	1,068	1,0000	
.	T2	CIN - MIX	2,1893613	1,659203	91	1,320	1,0000	
.	T2	MC - MIX	0,3980516	1,651607	91	0,241	1,0000	
.	T3	C - CIN	-3,8596669	1,650220	91	-2,339	0,7821	
.	T3	C - MC	-2,0683571	1,661886	91	-1,245	1,0000	
.	T3	C - MIX	-1,6703055	1,650511	91	-1,012	1,0000	
.	T3	CIN - MC	1,7913097	1,677292	91	1,068	1,0000	
.	T3	CIN - MIX	2,1893613	1,659203	91	1,320	1,0000	
.	T3	MC - MIX	0,3980516	1,651607	91	0,241	1,0000	
.	T4	C - CIN	-3,8596669	1,650220	91	-2,339	0,7821	
.	T4	C - MC	-2,0683571	1,661886	91	-1,245	1,0000	
.	T4	C - MIX	-1,6703055	1,650511	91	-1,012	1,0000	
.	T4	CIN - MC	1,7913097	1,677292	91	1,068	1,0000	
.	T4	CIN - MIX	2,1893613	1,659203	91	1,320	1,0000	
.	T4	MC - MIX	0,3980516	1,651607	91	0,241	1,0000	