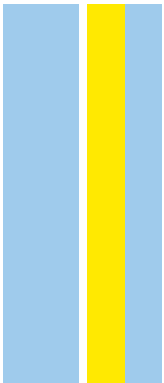


DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
TOXICOLOGIA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Identificação de cianotoxinas e do potencial biossintético de microcistina sintetase nas albufeiras do Alqueva, e análise de risco.

Tomé Oliveira Moreira Azevedo

M
2022



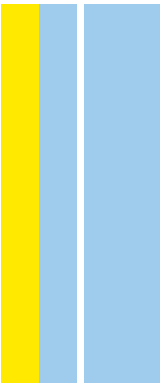
Tomé Azevedo. Identificação de cianotoxinas e do potencial biossintético de microcistina sintetase nas albufeiras do Alqueva, e análise de risco.



M.ICBAS 2022

Identificação de cianotoxinas e do potencial biossintético de microcistina sintetase nas albufeiras do Alqueva, e análise de risco.

Tomé Oliveira Moreira Azevedo



Tomé Oliveira Moreira Azevedo

Identificação de cianotoxinas e do potencial biossintético de microcistina sintetase nas albufeiras do Alqueva, e análise de risco.

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambiental, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor Alexandre Marnoto de Oliveira Campos

Categoria – Investigador Auxiliar

Afiliação: Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR)

Co-orientador: Doutor Vitor Manuel Oliveira Vasconcelos

Afiliação – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Categoria – Professor Catedrático

Investigador: Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR)

Agradecimentos

Ao meu orientador Alexandre Campos agradeço o seu acompanhamento, apoio e compreensão ao longo destes 2 anos, anos marcados por uma pandemia que veio alterar hábitos e modos de vida. Retiro boas lições sobre o nível de exigência e poder analítico necessário à persecução de uma carreira na investigação científica.

Agradeço ao professor Vitor Vasconcelos a disponibilidade em ser meu co-orientador e ajudar a definir o melhor sentido para os meus trabalhos numa fase preparatória.

O meu agradecimento à equipa da EDIA, nomeadamente à Eng. Ana Ilhéu e Eng. Manuela Ruivo, para além dos outros membros da equipa técnica, que nos acompanhou e providenciou os instrumentos necessários para o sucesso das campanhas de amostragem nas albufeiras do Alqueva.

Devo um grande agradecimento à Joana Azevedo, que teve um papel fundamental na execução dos trabalhos e na escrita da dissertação, não só pela sua disponibilidade em ensinar-me os meandros dos métodos, técnicas e instrumentos de análise química, mas também pela sua persistência mesmo quando os instrumentos teimavam em avariar.

Uma especial palavra deixo à Rita Mendes, pelo seu acompanhamento, fundamental no arranque dos meus trabalhos no laboratório, e pela sua presença e disponibilidade para me aconselhar e orientar. Deixo também uma especial palavra à Joana Martins por me ter “acolhido” sem aviso e acompanhado nos trabalhos de análise molecular.

Às minhas colegas Letícia Loss e Erica Santos um obrigado pela assistência na fase mais pesada dos trabalhos. À restante equipa do BBE deixo um especial agradecimento pela sua disponibilidade e prontidão em auxiliar qualquer situação dentro e fora do laboratório, para além do ambiente familiar em que somos integrados e que torna alguns momentos de trabalho intenso mais suportáveis.

O projecto TOXICROP recebeu financiamento do programa de inovação e investigação Horizonte 2020 da União Europeia, através do contrato No 823860 Marie Skłodowska-Curie, e do fundo estratégico UIDB/04423/2020 e UIDP/04423/2020 através de fundos nacionais concedidos pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDR) no contexto do programa PT2020.

Abstract

The Alqueva reservoirs system represent one of the most important economic drivers in Alentejo, South of Portugal, a region heavily affected by water shortages. They are used to produce energy, and provide water to agriculture and to the population of this region.

In a climate change context, freshwater cyanobacteria possess natural advantages, benefiting from eutrophication conditions, e.g. elevated nutrients, high CO₂ and high temperatures. Some cyanobacteria are responsible for the production of cyanotoxins. Due to their potent action, the release of these toxins can lead to severe consequences in other organisms, affecting greatly the water quality. Although regulatory limits were redefined in 2020, by the World Health Organization, for cyanotoxins in drinking and recreational waters, no limits have been defined for irrigation waters. Several studies raise concerns about the presence of toxic cyanobacteria in freshwaters and the recurrent use of contaminated water in agriculture, which can lead to a significant contamination of the soils and crops. This work aimed to monitor the presence of cyanotoxins and cyanobacteria in 3 reservoirs of the Alqueva water system, specifically São Pedro, Magra and Pisão, located in Beja district.

To this purpose, environmental samples were collected from these reservoirs, in a field campaign carried out in the summer of 2020 (July, August and September). Water samples were collected (2 to 3 samples per lake) and afterwards processed in the laboratory and analyzed for the presence of cyanotoxins employing Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC-MS). The presence of cyanobacteria (16S rRNA and phycocyanin operon) and microcystins (MCs) related genes (*mcyA-E* and *mcyG*) was detected using molecular biology techniques. The results revealed the presence of MC-LR in all of the 3 reservoirs, in the 3 months monitored. The concentrations of this toxin varied between 0.01 µg/L and 0.1 µg/L, being São Pedro the reservoir displaying higher concentrations of MC-LR in all months monitored. The chemical data are consistent with the molecular data, which suggests toxicogenic potential in the three reservoirs, due to the detection of several MC biosynthetic related genes. Gene amplification and sequencing analysis also suggests the presence of the genus *Microcystis* in the S. Pedro and Magra reservoirs. This coincides with previous studies, which indicate the predominance of this genus in lakes from this region and suggest its major role in the production of MCs, in the Alqueva reservoirs system.

Despite the absence of MC-LR concentrations above the regulatory limit of 1 µg/L (for drinking waters), the periodic monitoring of cyanotoxins is necessary, given the recurrent presence and proliferation of toxic cyanobacteria in the Alqueva system.

Keywords: Toxic Cyanobacteria, Cyanotoxins, Water Quality, Alqueva, Crop Irrigation.

Resumo

O sistema de albufeiras do Alqueva representa um dos mais importantes motores económicos do Alentejo, no Sul de Portugal, uma região fortemente afetada pela escassez de água. Este sistema é utilizado para produzir energia e fornecer água à agricultura e à população desta região.

Num contexto de alterações climáticas, as cianobactérias de água doce possuem vantagens naturais, beneficiando de condições de eutrofização, como elevados nutrientes, elevado CO₂ e temperaturas elevadas. Algumas cianobactérias são responsáveis pela produção de cianotoxinas. Devido à sua potente ação, a libertação destas toxinas pode levar a consequências graves noutros organismos, afetando grandemente a qualidade da água. Embora os limites regulamentares tenham sido redefinidos em 2020, pela Organização Mundial de Saúde, para as cianotoxinas em águas de consumo e recreio, não foram definidos limites para as águas de irrigação. Vários estudos levantam preocupações sobre a presença de cianobactérias tóxicas em águas doces e a utilização recorrente da água contaminada na agricultura, o que pode conduzir a uma contaminação significativa dos solos e das culturas. Este trabalho visou monitorizar a presença de cianotoxinas e cianobactérias em 3 albufeiras do sistema hídrico do Alqueva, especificamente São Pedro, Magra e Pisão, localizados no distrito de Beja.

Para este efeito, foram recolhidas amostras ambientais destas albufeiras, numa campanha de campo realizada no Verão de 2020 (Julho, Agosto e Setembro). As amostras de água foram recolhidas (2 a 3 amostras por albufeira) e posteriormente processadas em laboratório, e analisadas para a presença de cianotoxinas empregando Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massa (LC-MS). A presença de cianobactérias (16S rRNA e operação de ficocianina) e dos genes (*mcyA-E* e *mcyG*) relacionados com a produção de microcistinas (MCs) foi detectada utilizando técnicas de biologia molecular. Os resultados revelaram a presença de MC-LR em todas as 3 albufeiras, nos 3 meses monitorizados. As concentrações desta toxina variaram entre 0,01 µg/L e 0,1 µg/L, sendo São Pedro a albufeira com maiores concentrações de MC-LR em todos os meses monitorizados. Os dados químicos são consistentes com os dados moleculares, que sugerem potencial toxicogénico nas três massas de água, devido à deteção de vários genes relacionados com a biossíntese de MC. A análise à amplificação e sequenciação de genes também sugere a presença do género *Microcystis* nas 3 albufeiras. Isto coincide com estudos anteriores, que indicam a predominância deste género em lagos desta região e sugerem o seu papel principal na produção de MCs, no sistema de albufeiras do Alqueva.

Apesar da ausência de concentrações de MC-LR acima do limite regulamentar de 1 µg/L (para água de consumo), a monitorização periódica de cianotoxinas é necessária, dada a recorrente presença e proliferação de cianobactérias tóxicas no sistema do Alqueva.

Palavras-chave: Cianobactérias tóxicas, Cianotoxinas, Qualidade da Água, Alqueva, Irrigação de culturas.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	I
ABSTRACT.....	III
RESUMO.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....	X
TABELAS.....	X
FIGURAS	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.2. PROJETO TOXICROP	2
1.3. CIANOTOXINAS	2
1.3.1. <i>Anatoxina-a</i>	3
1.3.2. <i>Saxitoxinas</i>	4
1.3.3. <i>Cilindrospermopsina</i>	4
1.3.4. <i>Microcistinas</i>	5
1.3.4.a) Estrutura Química.....	5
1.3.4.b) Toxicidade	6
1.3.4.c) Exposição	7
1.4. LEGISLAÇÃO REFERENTE ÀS CIANOTOXINAS NO AMBIENTE.....	7
1.5. PRIMEIRAS OCORRÊNCIAS AMBIENTAIS EM PORTUGAL	9
1.6. CO-OCORRÊNCIA DE CIANOTOXINAS.....	9
1.7. ÁGUAS DE IRRIGAÇÃO	9
1.8. SISTEMA ALQUEVA.....	10
1.8.1. <i>Albufeiras</i>	11
1.8.2. <i>Enquadramento da monitorização</i>	12
1.9. METODOLOGIA.....	13
1.9.1. <i>Identificação molecular</i>	14
1.9.2. <i>Identificação e quantificação química</i>	15
1.9.2.a) Extracção em fase sólida (EFS)	15
1.9.2.b) LC-MS (Liquid Chromatography hyphenated Mass Spectrometry).....	16
1.9.2.b.1) Triplo-quadrupólo	18
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. ALBUFEIRAS E PONTOS DE AMOSTRAGEM	20
3.2. AMOSTRAGEM	22
3.2.1. <i>Albufeiras</i>	22
3.2.2. <i>Parque da Cidade (Ensaio de recuperação)</i>	23
3.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS (FILTRAÇÃO)	23
3.4. ANÁLISE MOLECULAR	24
3.4.1. <i>Extração de DNA</i>	24
3.4.2. <i>Amplificações por PCR</i>	25
3.4.2.a) Detecção de cianobactérias	25
3.4.2.b) Presença de <i>Microcystis</i> sp. e potencial tóxico para microcistina.....	25
3.4.2.c) Sequenciação DNA.....	27
3.5. ANÁLISE QUÍMICA	28
3.5.1. <i>Validação do método de determinação de cianotoxinas por LC-MS</i>	28
3.5.1.a) Determinação de MC-LR em biomassa de LEGE 91094	28
3.5.1.b) Validação do método de extração EFS	29
3.5.2. <i>Amostras ambientais - Componente intracelular</i>	30
3.5.3. <i>Amostras ambientais - Componente extracelular</i>	30
3.5.3.a) Liofilização	31

3.5.3.b) EFS.....	31
3.5.4 <i>Análise qualitativa e quantitativa com LC-MS</i>	31
3.5.4.a) Detecção e quantificação de 7 moléculas em simultâneo, por LC-MS.....	32
3.5.4.b) Detecção e Quantificação de MC-LR por LC-MS.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. ANÁLISE MOLECULAR	34
4.1.1. <i>Análise da deteção de cianobactérias</i>	34
4.1.2. <i>Análise da presença de Microcystis sp.</i>	35
4.1.3. <i>Análise dos genes da biossíntese de microcistina</i>	36
4.1.3.a) Genes <i>mcyA</i> e <i>mcyB</i> ao nível da comunidade	36
4.1.3.b) Genes <i>mcyABCDEG</i> de <i>Microcystis sp.</i>	37
4.1.3.c) Análise global do potencial de biossíntese de microcistina	38
4.1.3.d) Sequenciação do gene <i>mcyA</i>	39
4.2. ANÁLISE QUÍMICA	40
4.2.1. <i>Rastreo de cianotoxinas nas amostras ambientais</i>	41
4.2.2 <i>Quantificação de MC-LR</i>	42
4.2.2.1 Validação de métodos	42
4.2.2.1.a) Validação do método EFS.....	42
4.2.2.2. LC-MS e quantificação de MC-LR	43
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS	61

Lista de Abreviaturas

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

BMAA – β -N-methylamino-L-alanina

CID – *Collision Induced Dissociation*

CIN – Cilindrospermopsina

DABA – 2,4-Diaminobutírico

dc-GTX – Decarbamoil-Goniautoxina

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

EDIA – Empresa de Desenvolvimento e Infraestruturas do Alqueva

EFMA – Empreendimento de Fins Múltiplos

EFS – Extração em Fase Sólida

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESI – *Electrospray Ionization*

HLB – *Hydrophilic-Lypophilic Balanced*

HPLC – *High Pressure Liquid Chromatography*

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

IC50 – *Inhibitory Concentration at 50%*

INAG – Instituto da Água

L-aminoácidos – *Left-aminoácidos*

LC-MS – *Liquid Chromatography hyphenated with Mass-Spectrometer*

LD50 – *Lethal Dose at 50%*

MC – Microcistina

mcy – Microcistina Sintetase

NOAEL – *No Observed Adverse Effect Level*

NRPS – *Nonribosomal Peptide Synthetase*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PKS – *Polyketide Synthase*

PSP – *Paralytic Shellfish Poison*

qPCR – PCR quantitativo em tempo real

SGRA – Sistema Global de Rega de Alqueva

SIR / SIM – *Single Ion Reaction/Monitoring*

SRM / MRM – *Single/Multiple Reaction Monitoring*

TDI – *Tolerable Daily Intake*

TIC – *Total Ion Chromatogram*

TQ – Triplo-quadrupólo

TR –Tempo de retenção

VR – Valor de Referência

Índice de figuras e tabelas

Tabelas

Tabela 1. Características toxicológicas das cianotoxinas mais abundantes no ambiente: tipo de molécula, principal órgão alvo, LD50 por injeção i.p. em ratos, e gêneros produtores.	3
Tabela 2. Toxicidade das variantes de MCs mais comuns, resíduos (X, Z), LD50 (por injeção intraperitoneal [i.p.]) e Massa molecular.	6
Tabela 3. Valores de referência para as cianotoxinas e cenários de exposição selecionados.	8
Tabela 4. Nível de risco atribuído às albufeiras do sistema Alqueva.	20
Tabela 5. Conjuntos de <i>primers</i> aplicados em PCR convencional na detecção de cianobactérias (16S e operação de ficocianina), e do gene responsável pela informação presente no rRNA da subunidade ribossomal 16S, em <i>Microcystis sp.</i> (16s rRNA).	26
Tabela 6. Conjuntos de <i>primers</i> aplicados em PCR convencional para detecção dos genes responsáveis pela síntese de MCs, sem distinção taxonômica (Geral), e em <i>Microcystis sp.</i> 26	
Tabela 7. Programas de PCR convencional aplicados para detecção de cianobactérias, <i>Microcystis sp.</i> , e detecção de genes produtores de microcistinas.	27
Tabela 8. Etapas e condições da EFS	31
Tabela 9. Padrões moleculares utilizados, condições de detecção e limites de detecção do método.	32
Tabela 10. Detecção de fragmentos amplificados relacionadas com a presença de cianobactérias.	35
Tabela 11. Detecção de fragmentos amplificados relacionadas com a presença do genes 16S rRNA específico de <i>Microcystis sp.</i> , usando o par de primers Micr 184F/Micr 431R.	35
Tabela 12. Detecção de fragmentos amplificados relacionados com a presença do gene <i>mcyA</i> e <i>mcyB</i> na comunidade de cianobactérias, usando o par de primers CD1F/CD1R e FAA/RAA, respectivamente.	36
Tabela 13. Detecção de fragmentos amplificados relacionados com a presença do gene <i>mcyB</i> , <i>mcyD</i> , <i>mcyE</i> , <i>mcyG</i> específico para <i>Microcystis sp.</i> , usando os pares de <i>primers</i> 2156F/3111R, PKDF2/PKDR2, PKDE1/PKER1, e PKGF1/PKGR1, respectivamente.	37
Tabela 14. Resumo da análise molecular de genes codificadores do complexo microcistina sintetase. A verde encontram-se as amostras com resultado positivo (presença do gene), a cinzento as com resultado negativo (ausência do gene), e a riscado as amostras sem qualquer sinal de cianobactérias.	38
Tabela 15. Resultados da pesquisa de sequências homólogas por BLAST, dos amplificados do gene <i>mcyA</i> , detectados na Albufeira S. Pedro (SP).	39
Tabela 16. Detecção das cianotoxinas MC-LR,-YR,-RR, CYN, SAX, e ANA, fração intracelular das amostras ambientais.	41
Tabela 17. Concentrações da toxina MC-LR (µg /L) nas amostras ambientais	44

Figuras

Figura 1. Estrutura química de Anatoxina-a.	3
Figura 2. Estrutura química geral da saxitoxina.	4
Figura 3. Estrutura geral da cilindrospermopsina (CIN).	5
Figura 4. Estrutura química geral das microcistinas.	6
Figura 5. Sistema de albufeiras do Alqueva e imagem da grande barragem do Alqueva.	10
Figura 6. Albufeira do Pisão e a área beneficiada com água para rega.	11
Figura 7. Albufeira de S. Pedro e a área beneficiada com água para rega.	12
Figura 8. Representação esquemática do grupo de genes do sistema sintetase de microcistina.	14
Figura 9. Etapas da EFS.	15
Figura 10. Cartucho Oasis® HLB (3 cc/60 mg, Waters™, USA) e constituição do sorbente HLB.	16
Figura 11. LC-MS.	17
Figura 12. Exemplo de TIC.	18
Figura 13. Esquema estrutural do triplo-quadrupólo.	18
Figura 14. Imagem de satélite – Albufeira de S. Pedro.	21
Figura 15. Imagem de satélite – Albufeira da Magra.	21
Figura 16. Imagem de satélite – Albufeira de Pisão.	22
Figura 17. Lago 1 - Parque da cidade, Porto.	23
Figura 18. Processamento – filtração. Ilustração do sistema de filtração, e esquema explicativo.	24
Figura 19. Liofilizador Lyoquest-55.	31
Figura 20. Resultados das corridas dos fragmentos amplificados, correspondentes a <i>mcyD</i> (específico de <i>Microcystis</i> sp.), por eletroforese em gel de agarose.	34
Figura 21. Prevalência total de genes <i>mcy</i> nos meses de Verão de 2020.	39
Figura 22. Cromatogramas MRM e respectivas transições de MC-LR, na amostra SP3 de Julho.	40
Figura 23. Reta de recuperação de MC-LR ($\mu\text{g/L}$) após extração em fase sólida (EFS).	42
Figura 24. Reta de calibração de MC-LR em 50% MeOH aquoso com 0,1% de ácido fórmico. ...	43

1. Introdução

A escassez de água e a produção de alimentos são dos maiores desafios que a sociedade moderna enfrenta. Em muitos países, os reservatórios de água doce superficiais, que muitas vezes servem o consumo humano e a agricultura, estão vulneráveis devido às suas características biogeográficas e climáticas (EEA, 1996). Para além disso, o aumento no consumo de água e os crescentes impactos antropogénicos, como a retenção artificial dos cursos de água, a utilização excessiva de fertilizantes, a produção animal intensiva e a contaminação dos recursos hídricos com resíduos industriais e urbanos, estão a provocar a eutrofização das massas de água (Mur et al., 1999).

A eutrofização de massas de água, fruto do enriquecimento das massas de água em nutrientes (sobretudo azoto e fósforo) e minerais, é um fenómeno natural que tem registado um incremento considerável nas últimas décadas devido ao escoamento de nutrientes provenientes da agricultura intensiva e de outras atividades humanas já referidas. Este processo, aliado às alterações climáticas, contribui para uma maior multiplicação do fitoplâncton, e nomeadamente das cianobactérias (Mur et al., 1999).

1.1. Cianobactérias

Cianobactérias constituem um grupo muito diverso de microorganismos procariotas, que habitam quase todos os ecossistemas do planeta e fazem parte do fitoplâncton. Ao contrário de outros procariotas (*bacteria* e *archaea*), as cianobactérias realizam fotossíntese aeróbica e possuem clorofila-a (Chorus e Welker, 2021). Relativamente ao restante fitoplâncton, as cianobactérias apresentam vantagens adaptativas (Mantzouki, 2016) nos cenários decorrentes do aquecimento global e das alterações climáticas, como é o caso das maiores concentrações de dióxido de carbono, do aumento de temperatura média ou do aumento de eventos extremos como tempestades ou secas (OMS, 2020).

Quando se verifica eutrofização das massas de água e altas temperaturas, a probabilidade das cianobactérias se multiplicarem e tornarem predominantes aumenta (O'neil, 2021). Algumas espécies podem inclusivamente multiplicar-se de tal forma que começam a formar densos tapetes de biomassa designados florescências ou *blooms*. Este fenómeno de predominância pode causar diversos problemas ambientais: as florescências podem bloquear a passagem de luz, impedindo a atividade fotossintética do restante fitoplâncton e das plantas aquáticas subjacentes, traduzindo-se na redução da biodiversidade e portanto num forte impacto no ecossistema; algumas cianobactérias possuem a capacidade de produzir potentes toxinas que vão sendo libertadas para a água e afectam os seres vivos que entram em contacto com estes compostos; a decomposição da

florescência de cianobactérias pode, para além de libertar as toxinas presentes no interior das células após a lise celular, reduzir significativamente o conteúdo em oxigénio dissolvido, conduzindo a uma situação de hipoxia na massa de água, que pode tornar-se fatal para qualquer organismo que realize respiração aeróbica (Vasconcelos, 2006). As consequências relacionadas com a presença excessiva de cianobactérias nas massas de água traduzem-se na diminuição da qualidade da água.

1.2. Projeto TOXICROP

De facto, nas últimas décadas tem-se constatado um incremento na incidência e intensidade das florescências de cianobactérias (Mur et al., 1999). A crescente escassez de água com qualidade conduz à frequente utilização de água contaminada com florescências de cianobactérias e suas cianotoxinas, na irrigação de culturas agrícolas. Os produtos agrícolas obtidos sob este tipo de prática podem ser vectores de cianotoxinas para o Homem. Contudo, a informação acerca da utilização da água contaminada no crescimento e produtividade das culturas agrícolas está dispersa, o que resulta em escassas medidas protectoras (Campos et al., 2021).

O projecto internacional TOXICROP (www.toxicrop.com), financiado pelo programa Horizonte 2020, pretende esclarecer as várias lacunas no conhecimento relativas à utilização de águas contaminadas com cianobactérias na agricultura, portanto é parte integrante do projecto a monitorização e avaliação da dispersão de cianotoxinas nas massas de água de interesse.

1.3. Cianotoxinas

A presença de cianobactérias é frequentemente acompanhada da biossíntese de uma variedade de metabolitos secundários. Como foi referido, algumas estirpes de cianobactérias possuem potencial para produzir metabolitos secundários designados cianotoxinas, que representam uma ameaça para a saúde ambiental e para o Homem devido à sua elevada toxicidade (Ettoumi et al., 2011). As cianotoxinas possuem uma natureza química alcalóide ou peptídica, e podem ser classificadas em famílias consoante os órgãos que predominantemente afectam: neurotoxinas (sistema nervoso), hepatotoxinas (fígado), ou citotoxinas (células de diversos órgãos como fígado, rins, glândulas adrenais ou intestino grosso) (Tabela 1).

Tabela 1. Características toxicológicas das cianotoxinas mais abundantes no ambiente: tipo de molécula, principal órgão alvo, LD50 por injeção i.p. em ratos, e gêneros produtores.

Cianotoxina	Tipo de molécula	Principal órgão alvo	LD50 mg/kg	Gêneros produtores
Microcistina	Péptido cíclico	Fígado	0,02–0,15 [Carmichael, 1997]	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Dolichospermum</i> , <i>Gloeotrichia</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Plectonema</i> , <i>Rivularia</i>
Anatoxina-a	Alcalóide neurotóxico	Sistema nervoso	0,375 [Fawell et al. 1999]	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Dolichospermum</i>
Saxitoxina	Alcalóide neurotóxico	Sistema nervoso	0,01 [Pearson et al. 2010]	<i>Anabaena</i> , <i>Dolichospermum</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Planktothrix</i>
Cilindrospermopsina	Alcalóide citotóxico	Fígado Rim	0,30 [Ohtani et al. 1992]	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Dolichospermum</i> , <i>Raphidiopsis</i>

1.3.1. Anatoxina-a

Anatoxina-a é uma pequena molécula (Fig. 1) de 165 Daltons, que é estável na água apenas na ausência de luz (Chorus e Bartram 1999). A molécula é facilmente quebrada com luz ultravioleta, especialmente em pH alcalino, e por microorganismos (Oswald et al. 2007). Devido à sua elevada toxicidade (Tabela 1) apenas sintomas agudos foram reportados e nenhum caso de intoxicação crônica foi descrito.

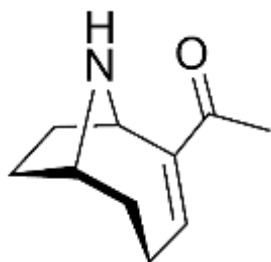


Figura 1. Estrutura química de Anatoxina-a. Fonte: Cacycle, 2007.

1.3.2. Saxitoxinas

Saxitoxinas (Fig. 2), também conhecidas como *paralytic shellfish poisoning toxins* (PSPs), compreendem uma família de cerca de 57 análogos químicos (Wiese et al., 2010). Os vários análogos apresentam massa molecular entre os 241 e os 491 Daltons (Sivonen e Jones 1999), e todos são solúveis em água e estáveis por cerca de 1-10 semanas em pH ácido. O tratamento com cloro (cloração) e pH alcalino rapidamente degrada estas moléculas, o que pode representar um problema, uma vez que as formas menos tóxicas (C-toxinas) desta família de toxinas podem quebrar e originar formas mais tóxicas (dc-GTXs) (Negri et al. 1997).

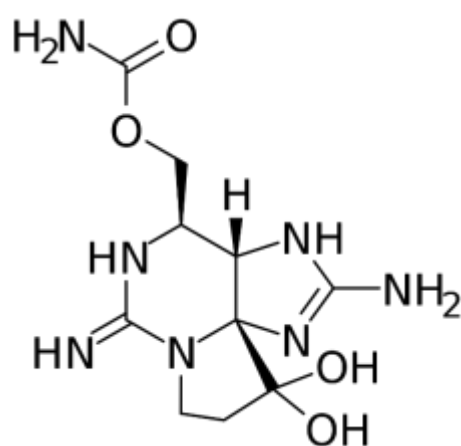


Figura 2. Estrutura química geral da saxitoxina. Fonte: Ed, 2016.

A exposição a esta toxina acontece através do consumo de água contaminada ou de crustáceos ou bivalves (Mur et al. 1999). A cozedura não degrada a saxitoxina (Doyle, 2011), mas uma vez no organismo é rapidamente removida pelos rins e excretada na urina (Metcalf and Codd, 2014).

1.3.3. Cilindrospermopsina

Cilindrospermopsina (CIN) é um alcalóide citotóxico, que apresenta uma estrutura em anel (Fig. 3) com uma massa molecular de 415 Daltons (Adamski et al. 2014). É altamente solúvel em água e é uma molécula estável, cuja estrutura não quebra com o calor, a luz do sol ou pH, e é resistente à biodegradação (Adamski et al. 2014). No entanto é degradada pelo tratamento de cloração (Kinnear 2010). A persistência desta toxina no meio ambiente remete para a possibilidade de bioacumulação nos tecidos animais, por exposição prolongada. A CIN foi descrita como potencial agente carcinogénico (Falconer e Humpage, 2001).

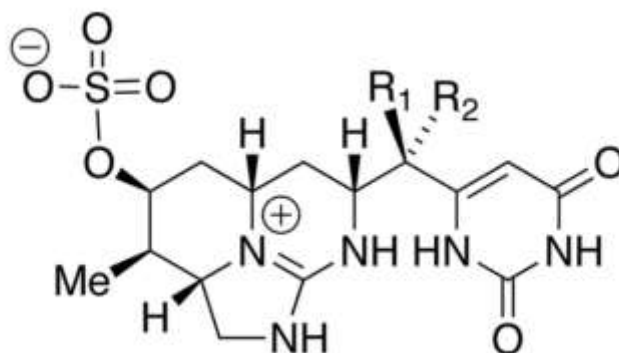


Figura 3. Estrutura geral da cilindrospermopsina (CIN). Fonte: Adaptado de Mazmouz et al. 2010.

1.3.4. Microcistinas

As microcistinas (MCs) pertencem à categoria das hepatotoxinas, uma vez que a sua acção toxicológica conhecida afecta sobretudo o fígado. A preocupação com este particular grupo de toxinas relaciona-se não só com a sua considerável toxicidade, mas também com a sua elevada ocorrência e persistência no ambiente aquático (OMS, 2020). As MCs são detectadas em cerca de 40-75% das florescências de cianobactérias (Sivonen e Jones, 1999).

1.3.4.a) Estrutura Química

As MCs são heptapéptidos cíclicos com a seguinte estrutura química: ciclo-(D-Ala1-X2-D-Masp3-Z4-Adda5-D-γ-Glu6-Mdha7) (Fig. 4), em que D-Masp corresponde a D-eritro-b-metil-ácido aspártico, Mdha a N-metil-ab-dehidroalanina e Adda a (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-(4E,6E)-ácido dienóico, enquanto X e Z são L-aminoácidos altamente variáveis que determinam grande parte da variabilidade química deste grupo de cianotoxinas. Esta nomenclatura universal surgiu pela necessidade de distinguir o crescente número de novos variantes químicos de MCs, descobertas desde a variante MC-LA, que apresenta por sua vez o aminoácido leucina (L) e alanina (A) nas posições X e Z, respectivamente (Carmichael et al. 1988). O aminoácido Adda é um β-aminoácido característico das MCs e de outro grupo próximo de cianotoxinas, as nodularinas, que partilham a estrutura peptídica cíclica mas diferem por serem pentapéptidos (Bouaïcha et al. 2019). O composto Adda é também responsável por grande parte da acção tóxica das MCs (Song et al. 2006).

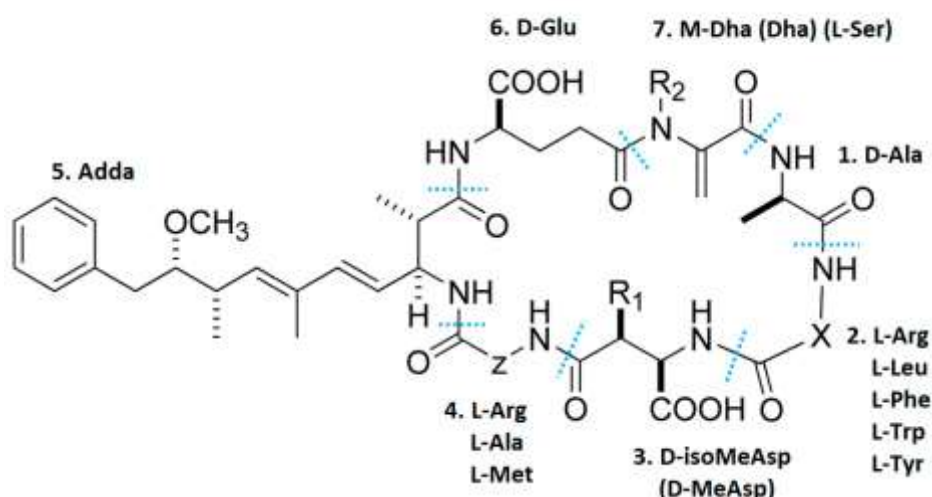


Figura 4. Estrutura química geral das microcistinas. Os números 1 a 7 representam sete resíduos de aminoácidos. As letras X e Z representam os L-aminoácidos altamente variáveis, sendo apresentadas algumas possibilidades. Fonte: Massey e Yang (2020).

As MCs apresentam um tamanho de cerca de 3 nm de diâmetro, e massa molecular entre os 900 e os 1100 Daltons, que depende sobretudo da composição aminoacídica. Além dos aminoácidos altamente variáveis, outros aminoácidos podem apresentar modificações (Heck et al. 2018).

1.3.4.b) Toxicidade

Quando sintetizadas, a maioria das MCs pode ficar retida no interior da célula, atingindo uma elevada concentração intracelular. Após a senescência das células e a lise celular, que pode ser resultado de condições de crescimento adversas ou tratamento algicida, esse conteúdo acumulado é libertado para a água (Rohrlack e Hyenstrand, 2007).

Embora todas as MCs apresentem elevada toxicidade (Tabela 2), a MC-LR é considerada a variante mais tóxica. Além disto, a actividade genotóxica e promotora de tumores da MC-LR levou a que em 2006, a Agência Internacional de Investigação em Cancro (IARC) tenha classificado a MC-LR como composto potencialmente carcinogénico (Grupo 2B).

Tabela 2. Toxicidade das variantes de MCs mais comuns, resíduos (X, Z), LD50 (por injeção intra-peritoneal [i.p.]) e Massa molecular.

Variante de microcistina	X	Z	LD50 mg/kg (i.p.,murganho)	Massa molecular (Da)
MC-LR	Leu	Arg	50	995,19
MC-YR	Tyr	Arg	70	1045,21
MC-RR	Arg	Arg	600	1038,22

1.3.4.c) Exposição

O consumo de água e alimentos contaminados (produtos agrícolas, moluscos ou peixe), a exposição dérmica e a inalação representam as vias mais comuns de exposição às MCs. Estas hepatotoxinas são resistentes à digestão no tracto gastrointestinal, visto que as ligações peptídicas não são susceptíveis à acção de enzimas hidrolíticas (Falconer, 2005).

1.4. Legislação referente às cianotoxinas no ambiente

Devido à frequência de florescências de cianobactérias produtoras de MCs nos reservatórios de água-doce e como reconhecimento da sua toxicidade, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu, em 1998, um valor de orientação provisório de 1 µg/L como concentração máxima aceitável do total de MC-LR na água para consumo humano. Vários países, como Portugal, adotaram este valor, para definir critérios de qualidade da água de consumo. Assim, o Decreto-Lei n.º 306/2007 estabelece o valor paramétrico de 1 µg/L para a MC-LR em água para consumo humano.

Recentemente, em 2020, esse valor de referência foi revisto e modificado, e passou a ser considerado o total valor de todas as MCs, quando se verifica ausência de dados sobre a toxicidade oral de outras variantes. O valor definido para a água de consumo é de 1 µg/L, numa situação de consumo vitalício, e para eventos de curta-duração é de 12 µg/L (OMS, 2020). Para além disto, os valores limite para a água de consumo, no caso da cilindrospermopsina, anatoxina-a, e saxitoxina, foram incluídos e são, respectivamente, 3, 30, e 3 µg/L (Filatova et al. 2021). Alguns destes valores são provisórios, uma vez que os valores de referência estabelecidos apenas consideram uma variante química, a base de dados é limitada, e porque novas evidências sobre a toxicidade das MCs podem surgir (Tabela 3).

O valor definido em 1998 pela OMS teve por base um ensaio de 13 semanas de aplicação oral em ratos, suportado por um estudo de 44 dias de aplicação oral em porcos (Chorus e Bartram, 1999), que resultou num NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level* – Nível de efeito adverso não observável) de 40 µg kg⁻¹ massa corporal (mc) d⁻¹. O valor de referência (VR) derivou do seguinte cálculo:

$$VR = 40\mu g\ kg^{-1}\ mc\ d^{-1} \times 60kg \times 0.8/2\ L\ d^{-1} \times 1000$$

em que 60 kg é a média da massa corporal de um adulto, 0.8 é a proporção da ingestão diária de MC atribuída à água consumida, 2 L é a média de consumo por dia, e o factor 1000 remete para a variação intra- e interespecífica (um fator de 10 por cada) e para incertezas nos dados, ou seja, falta de informação sobre a exposição vitalícia e

carcinogenicidade da MC-LR (fator de 10 acrescentado). Para o cálculo do valor de ingestão diária tolerável (em inglês TDI - *Tolerable Daily Intake*) dividiu-se o valor do NOAEL pelo fator de 1000, obtendo-se 0,04 g kg⁻¹ pc d⁻¹. Este valor foi também usado para os cálculos dos VR para a exposição recreacional segura (Chorus et al., 2020 e 2000).

Vários países implementaram diretrizes ou padrões e procedimentos para avaliar e gerir o risco que as cianotoxinas representam. Estas diretrizes e regulações padronizadas visam as concentrações de cianobactérias, ou suas cianotoxinas, que não devem ser excedidas. Normalmente são acompanhadas de acções imediatas e de curto-prazo a serem tomadas caso as concentrações sejam excedidas, de forma a prevenir ou minimizar os danos resultantes da exposição (Ibelings et al., 2014).

Tabela 3. Valores de referência para as cianotoxinas e cenários de exposição seleccionados. Adaptado de Toxic Cyanobacteria in Water (OMS, 2020).

Toxina	Tipos de águas ^a	Valor (µg/L)
Microcistina-LR	Água de consumo, vitalício	1
	Água de consumo, curto prazo	12
	Recreacional	24
Cilindrospermopsina	Água de consumo, vitalício	0,7
	Água de consumo, curto prazo	3
	Recreacional	6
Anatoxina-a ^b	Água de consumo, aguda	30
	Recreacional	60
Saxitoxina ^c	Água de consumo, aguda	3
	Recreacional	30

a Exposição de curto prazo refer-se ao período de cerca de duas semanas até que possam ser implementadas estratégias para atingir concentrações abaixo do valor de referência para o consumo vitalício.

b Valor de referência com base na saúde

c Valor de referência

Devido à qualidade geral das bases de dados para a sua derivação e visto que os valores de referência apenas dizem respeito a variantes químicas específicas, os valores são considerados provisórios.

Na ausência de outros dados de toxicidade oral para outras variantes químicas recomenda-se que os valores de referência sejam aplicados ao total de MCs, CInS e STXs como equivalentes gravimétricos ou molares, baseados na assunção do pior cenário, em que as várias variantes químicas apresentam toxicidade idêntica.

1.5. Primeiras ocorrências ambientais em Portugal

Data do final da década de 1980 a primeira identificação e caracterização de MCs em ecossistemas de água-doce, em Portugal (Vasconcelos et al., 1995). A espécie *Microcystis aeruginosa* foi identificada como sendo a maior responsável pela formação das florescências e pela produção de MCs. No final da década seguinte, Pereira et al. (2000) identificou a presença de saxitoxinas, cuja produção foi associada a *Aphanizomenon flos-aquae*, num reservatório no Sul de Portugal (Montargil). A presença de cilindrospermopsina apenas foi detectada em 2012 numa lagoa da região Centro (Lagoa da Vela) Com a ajuda da sequenciação de DNA foi possível identificar o produtor desta cianotoxina como pertencendo ao género *Chrysosporum* (Moreira et al., 2017), que tem sido reportado como principal produtor desta cianotoxina em Portugal, assim como noutros países Europeus (Moreira et al. 2020).

1.6. Co-ocorrência de cianotoxinas

Contudo verifica-se a co-ocorrência de várias cianotoxinas, o que tem sido constatado designadamente em massas de água artificiais, como é o caso das albufeiras: Moreira et al. (2017) reporta a co-ocorrência de MC e CIN na lagoa da Vela (Portugal), no ano de 2013; noutro trabalho, Ruiz et al. (2013) regista a co-ocorrência de anatoxina e MCs no reservatório de São Roque (Argentina); Al-Sammak et al. (2014) comunica a co-ocorrência das cianotoxinas BMAA (β -N-methylamino-L-alanina), DABA (2,4-diaminobutírico) e anatoxina-a num reservatório do Nebraska (EUA).

1.7. Águas de irrigação

Apesar da recente atualização dos valores de referência e da inclusão de outras cianotoxinas e diretrizes, não foi ainda definido nenhum valor para águas utilizadas na irrigação de culturas agrícolas. A acumulação de MCs e CIN nas plantas e vegetais após irrigação com água contendo florescências de cianobactérias foi já reportada (Machado et al, 2017; Campos et al. 2021). A maioria da informação disponível refere-se a ensaios controlados em que a irrigação transporta concentrações extremas de cianobactérias e cianotoxinas, o que pode ser pouco representativo de um cenário provável e realista. No entanto, as cianobactérias podem também aderir à superfície de culturas cujas partes edíveis sejam folhas, como a alface (Lee et al., 2021). Por isso, os produtos obtidos a partir da irrigação com águas contaminadas com florescências de cianobactérias são, em todo o caso, uma potencial fonte de exposição a considerar na avaliação de risco (OMS, 2020).

Conforme a EDIA (2017), “O Sistema Global de Rega de Alqueva (SGRA) do EFMA beneficia uma área com cerca de 120 000 hectares. É constituído por um total de 69 barragens, albufeiras e açudes.” O Sistema Global de Rega do EFMA divide-se em três subsistemas, de acordo com as diferentes origens de água: Alqueva, Pedrógão, e Ardila. Toda a água destes subsistemas provém das duas albufeiras principais, Alqueva e Pedrógão (EDIA, 2017).

1.8.1. Albufeiras

A albufeira de Alqueva é a origem da água do subsistema Alqueva, que abrange uma área total regada de cerca de 64 500 ha. Este subsistema serve, entre outras, a albufeira do Pisão (Fig. 6), que por sua vez se localiza no concelho e distrito de Beja, e beneficia cerca de 6 650 ha com água para rega.

O subsistema de Pedrógão compreende um total de 9 albufeiras, entre as quais a albufeira de São Pedro (Fig. 7), e abrange uma área total regada de 24 500 ha. A área de rega beneficiada a partir da albufeira de São Pedro é de cerca de 19 862 ha. Esta albufeira serve também, por sua vez, a albufeira da Magra (Fig. 7), que contribui com água para a irrigação de 145 ha.

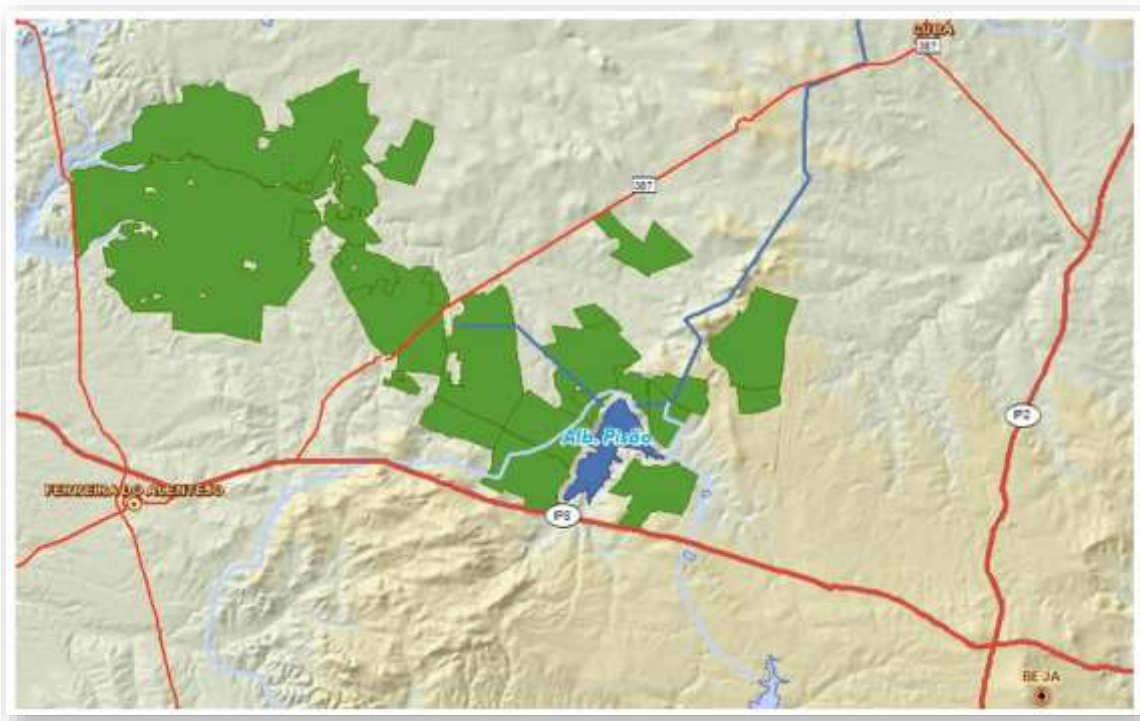


Figura 6. Albufeira do Pisão e a área beneficiada com água para rega (a verde). Fonte: Massas de água, EDIA, 2017.



Figura 7. Albufeira de S. Pedro e a área beneficiada com água para rega (a verde). Fonte: Massas de água, EDIA, 2017.

Uma vez que a utilização predominante de toda esta água é a irrigação de culturas agrícolas, torna-se necessário compreender qual o estado de saúde da água, e de que forma a sua qualidade pode afetar a atividade agrícola e a saúde ambiental.

1.8.2. Enquadramento da monitorização

Conforme o INAG (2009), “A Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000 (Directiva Quadro da Água), transposta para a ordem jurídica nacional através da Lei da Água, Lei n.º58/2005 de 29 de Dezembro (Lei da Água) e do Decreto-Lei n.º77/2006 de 30 de Março, introduz o conceito de “estado ecológico”, que exprime a qualidade estrutural e funcional dos ecossistemas aquáticos com base no “desvio ecológico” relativamente às condições de referência, isto é, com pressões antropogénicas pouco significativas. A classificação do “estado ecológico” é efectuada com recurso a indicadores de qualidade hidromorfológica, físico-química e biológica. O fitoplâncton é um dos indicadores de qualidade biológica utilizado na classificação do estado ecológico (...) para massas de água fortemente modificadas – albufeiras. Segundo o Anexo V da Directiva Quadro da Água, são considerados três atributos da comunidade fitoplanctónica para a avaliação da qualidade ecológica: a biomassa fitoplanctónica, a

composição e abundância fitoplanctónica, e a intensidade e frequência de florescências fitoplanctónicas (blooms).” No sistema de albufeiras do Alqueva é realizada a monitorização do fitoplâncton, cianobactérias e cianotoxinas, seguindo as indicações fornecidas pela Agência Portuguesa do Ambiente (APA). O Decreto-lei nº 135/2009, de 3 de Junho, prevê que a EDIA realize esta monitorização.

1.9. Metodologia

Na avaliação da qualidade da água, no que à presença de cianotoxinas se refere, vários métodos podem ser aplicados, nomeadamente *High pressure liquid chromatography* (HPLC), *Liquid chromatography mass spectrometry* (LC-MS), ou *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Estes métodos permitem detectar as cianotoxinas, quantificar a sua abundância e inferir o grau de toxicidade numa determinada amostra ou ecossistema, pela comparação do valor obtido com o valor de referência (Moreira et al. 2020).

Se pretendermos caracterizar um determinado ecossistema ou amostra relativamente ao seu potencial de produção de cianotoxinas, outros métodos podem ser aplicados: *polymerase chain-reaction* (PCR); PCR quantitativo em tempo real (qPCR); sequenciação de DNA de determinados genes de interesse estrutural ou toxicológico. Estes métodos permitem obter uma avaliação rápida e uma caracterização da presença de genes associados à ocorrência de cianotoxinas, para além de serem menos dispendiosos e menos complicados de realizar. Desta forma é possível inferir sobre os potenciais riscos para o ambiente e os associados com a utilização dos ecossistemas de água-doce pelo Homem (Moreira et al. 2020).

Enquanto LC-MS constitui uma técnica dispendiosa e necessita de alto grau de especialização, o PCR pode servir como técnica orientadora na avaliação da potencial cianotoxicidade previamente à pesquisa química. Neste trabalho, estas duas técnicas foram empregues de forma a complementar os dois tipos de resultados (moleculares e químicos) e obter uma avaliação mais completa do estado das massas de água. Nas seguintes secções será feita uma pequena introdução relacionada com a aplicação das diferentes técnicas (PCR, LC-MS). A técnica de PCR foi aplicada na deteção de genes que identificam a presença de cianobactérias, mas foi também e sobretudo aplicada na pesquisa dos genes responsáveis pela produção de MC, uma vez que esta constitui a cianotoxina mais estudada e de ocorrência mais frequente. A sua biossíntese será, em seguida, revista.

1.9.1. Identificação molecular

O sistema de biossíntese não-ribossomal das MCs em *Microcystis aeruginosa* é codificado por dois operões *mcyABC* e *mcyDEFGHIJ*, a partir de um promotor central bidireccional localizado entre *mcyA* e *mcyD* (Fig. 8). Este grupo de 10 genes, com cerca de 55 kb de comprimento, contém a informação necessária para a produção de um complexo enzimático integrado de “polyketide synthase (PKS)/nonribosomal peptide synthetase (NRPS)” (Tillett et al. 2000).

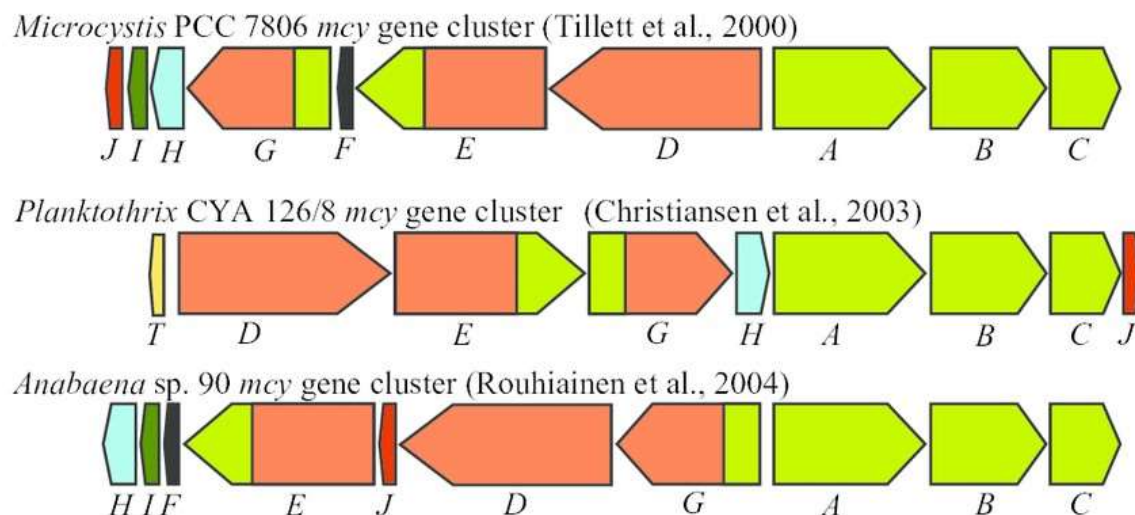


Figura 8. Representação esquemática do grupo de genes do sistema sintetase de microcistina: a verde-claro a representação dos genes de sintetases de péptidos, a cor laranja os genes de sintetases de policétidos. Os genes que codificam enzimas de corte são indicados com outras cores. Adaptado de Ylinen (2007).

Embora muitas estirpes de várias espécies tenham sido identificadas como responsáveis pela biossíntese das MCs, a sua produção nem sempre acontece. Existem estirpes que por mutação pontual, ou deleção parcial ou total de genes *mcy*, têm a capacidade para a biossíntese das MCs inativada. Por outro lado, diversos factores ambientais, como a intensidade luminosa ou os nutrientes, podem influenciar a expressão dos genes *mcy* e por conseguinte a produção de MCs (Sevilla et al. 2008, Pimentel et al. 2014, Van de Waal et al. 2009). Uma vez que as MCs são compostas de aminoácidos têm na sua constituição química uma considerável presença de azoto (N). A escassez deste elemento no ambiente onde habitam pode conduzir à diminuição da produção destas cianotoxinas e até alterar a quantidade relativa da síntese de várias variantes químicas (Van de Wall et al. 2009).

1.9.2. Identificação e quantificação química

1.9.2.a) Extracção em fase sólida (EFS)

É uma técnica muito usada para limpar e concentrar as amostras aquosas antes de uma análise cromatográfica (Fig. 9). Nesta técnica, um grupo funcional orgânico hidrofóbico está quimicamente ligado a uma superfície sólida, por exemplo sílica, formando a fase sólida ou estacionária, que se encontra no interior do dispositivo (cartucho). O exemplo mais comum é a presença de cadeias C18 ligadas à sílica, o que torna a fase estacionária reversa, isto é sem afinidade para os compostos polares.

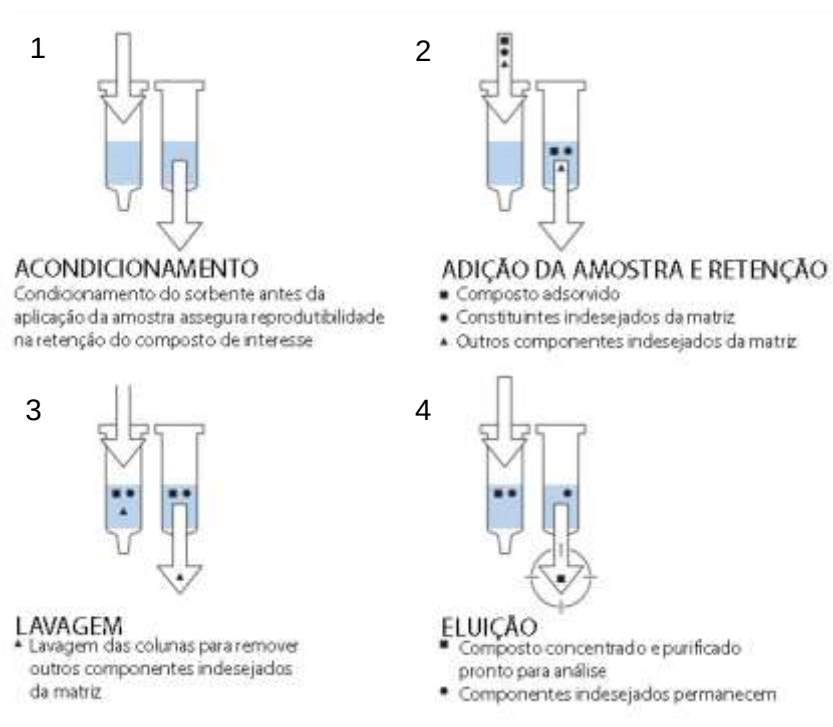


Figura 9. Etapas da EFS. Adaptado de Simpson, N. Am. Lab. August, 1992, p.37. Analytical chemistry 7ed. p. 586.

Embora este seja o exemplo mais comum, não é o melhor para compostos mais polares. Como os nossos metabolitos de interesse (ex: MCs) têm este tipo de natureza química optou-se por um tipo de cartucho HLB (*Hydrophilic-Lypophilic Balanced*) de fase reversa, mais eficiente com substâncias mais polares. Neste sentido, utilizaram-se para a EFS cartuchos Oasis® HLB (3cc) (Waters™, USA) com 60 mg de material adsorvente (enchimento). O material adsorvente é composto de uma resina com um co-polímero de 2 tipos de monómeros, o hidrofílico *N-vinylpyrrolidinone* e o lipofílico *divinylbenzene* (Fig. 10).

No processo de EFS, os compostos que não são retidos na coluna são mais apolares. No entanto, como representado na fase de “Lavagem” e “Eluição”, nem todos os componentes indesejados da matriz são removidos completamente. Como lidamos com uma matriz ambiental complexa (água de albufeira), muitos compostos possuem uma natureza química aproximada à dos nossos compostos de interesse e acabam por ser retidos na coluna. A quantidade de enchimento na coluna também influencia a sua eficiência, uma vez que, e também devido à sua complexidade, uma elevada quantidade de amostra adicionada pode saturar o material adsorvente.

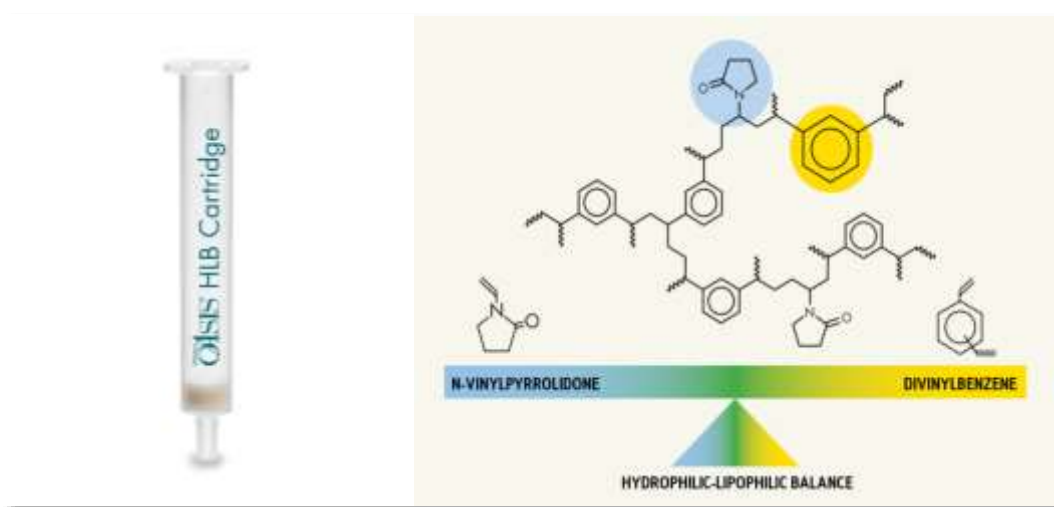


Figura 10. Cartucho Oasis® HLB (3 cc/60 mg, Waters™, USA) e constituição do sorbente HLB. Adaptado de Waters (2008). Oasis sample extraction products brochure. p. 6.

1.9.2.b) LC-MS (Liquid Chromatography hyphenated Mass Spectrometry)

O LC-MS (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa) é um instrumento que acopla a capacidade de separação do HPLC – *High Pressure Liquid Chromatography* – ou apenas LC (*Liquid Chromatography*) -, e a capacidade de deteção, identificação e quantificação de um analisador de massas (Fig. 11). É geralmente considerado o melhor método para detectar e quantificar cianotoxinas devido à sua superior sensibilidade, selectividade, precisão e eficiência (Oehrle e Westrick, 2003), embora seja mais dispendioso relativamente a outros métodos.

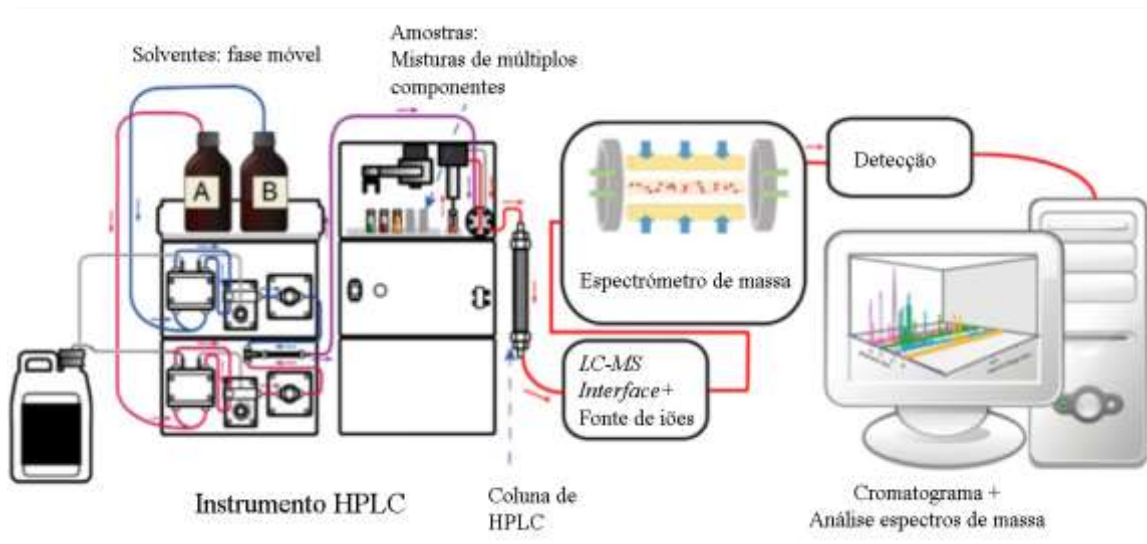


Figura 11. LC-MS. Fonte: Bustillos, O (2020). Revista analytica. Ed. 106.

O processo de cromatografia líquida permite separar os compostos presentes nas amostras (ex: toxinas) uns dos outros, com base nas propriedades químicas e na sua afinidade ao enchimento presente na coluna de HPLC. Este processo tem como resultado um cromatograma da corrente iónica total (*total ion current- TIC*), que nos apresenta os diversos compostos detectados em forma de pico, com diferentes tempos de retenção (TR) (Fig. 12).

O espectrómetro de massas detecta e quantifica as toxinas com base na massa das moléculas protonadas e na forma como fragmentam. Após a separação realizada pelo LC é necessário um dispositivo de nebulização para vaporizar e ionizar a amostra, e assim permitir a pesquisa das massas e dos respectivos espectros. Para este fim os métodos mais comuns são a ionização por electronebulização (ESI - *electrospray ionization*) e a ionização química em pressão atmosférica (APCI - *atmospheric pressure chemical ionization*) (Oehrle et al. 2010). Para analitos mais polares e com pesos moleculares maiores recorre-se à ionização por ESI (Cech and Enke, 2001). Este processo permite ionizar as moléculas positiva ou negativamente, e consoante este modo de ionização obtemos diferentes resultados consoante as moléculas que pretendemos analisar e as matrizes em que estão inseridas. No caso da MC-LR, por exemplo, obtém-se uma maior intensidade de sinal no modo positivo $[M+1]^+$, embora outras moléculas produzam um sinal mais intenso no modo negativo $[M-1]^-$. Após este processo, um analisador de massas analisa a amostra e detecta os compostos de interesse. Os sinais obtidos são convertidos em espectros de massa e permitem a pesquisa das cianotoxinas.

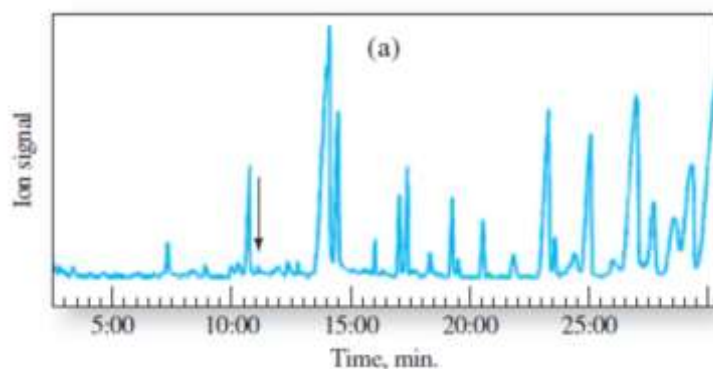


Figura 12. Exemplo de TIC. Adaptado de Skoog et al. (2013). Fundamentals of Analytical Chemistry 9ed. p. 896.

1.9.2.b.1) Triplo-quadrupólo

O analisador de massas que utilizamos para as medições dos compostos de interesse foi o triplo-quadrupólo (TQ). Este tipo de analisador compreende três módulos em série, dos quais 2 (Q1 e Q3) apresentam um conjunto de quatro barras magnéticas (por isso quadrupólos), e o módulo do meio (Q2) funciona como câmara de colisão (Fig. 13).

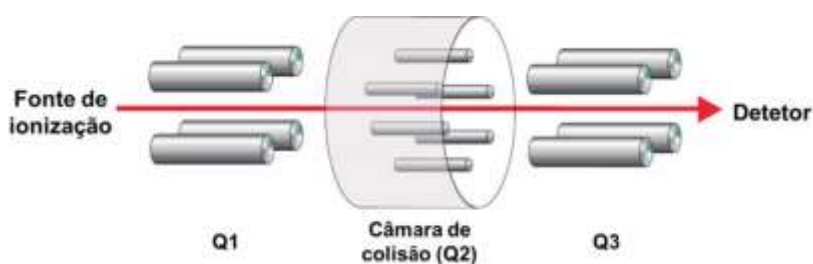


Figura 13. Esquema estrutural do triplo-quadrupólo. Adaptado de Waters Corporation (2002).

Neste tipo de analisador é comum efetuarem-se dois tipos de análises: monitorização de um ião-percursor (-pai) selecionado (*single/selected ion recording/monitoring* - SIR ou SIM) e monitorização de uma ou múltiplas reacções selecionadas (*single/multiple reaction monitoring* - SRM ou MRM) (Nováková, 2013). Na análise em modo SIM pretende-se que o equipamento selecione e identifique, entre os vários iões formados, apenas um ião em particular com um determinado valor de m/z (rácio de massa por carga) previamente definido, obtendo-se apenas um sinal relativo a esse ião. Na análise em modo SRM/MRM, um ião com um determinado valor m/z , designado de ião-pai ou ião-percursor, é selecionado no módulo Q1, fragmentado na câmara de colisão através da colisão com moléculas de gás inerte (ex: hélio ou árgon) – processo designado *collision induced dissociation* (CID) -, e um ou mais dos fragmentos produzidos são selecionados no módulo Q3 consoante o seu valor m/z . À seleção de um ião-pai (ou percursor) com um dos seus

fragmentos característicos (ião-filho) designa-se por transição, e a monitorização das várias transições permite maior especificidade no método analítico (van den Ouweland and Kema, 2012). Desta forma, e porque as análises com TQ são distintamente rápidas, é comum programar-se a monitorização de múltiplas transições de forma a quantificar múltiplos analitos numa única corrida (Christian, 2014). Para além disto, certos parâmetros, como energia de colisão e permanência de iões na câmara de colisão (Q2), são configurados para conferir um maior grau de especificidade (Seger, 2012). É por estes motivos que o TQ é bastante utilizado em análises quantitativas de matrizes complexas contendo quantidades vestigiais dos analitos de interesse (Christian, 2014). Os resultados destas análises permitem-nos identificar e quantificar os analitos de interesse, quer a partir dos iões-pai, quer a partir dos iões-filho resultantes da fragmentação.

2. Objetivos

Tendo em conta a relevância geoestratégica do sistema de albufeiras de água doce do Alqueva no Alentejo, e tendo em conta os potenciais efeitos adversos da presença de cianobactérias tóxicas na qualidade da água deste sistema de reservatórios e no uso deste importante recurso na região (ex: agricultura, abastecimento público, alimentação de gado), a presente dissertação visa analisar a presença dos principais grupos de toxinas produzidas por cianobactérias e a presença de cianobactérias tóxicas, em 3 albufeiras localizadas na região de Beja (São Pedro, Magra e Pisão), e inferir a qualidade da água com base nesta informação.

Os objetivos específicos consistiram no seguinte:

1. Realização de 3 campanhas de amostragem de água durante os meses de Julho, Agosto e Setembro de 2020;
2. Rastreio dos principais grupos de cianotoxinas (MCs, CIN, ANA, SAX) e quantificação de MC-LR por métodos químicos
3. Avaliar o potencial de toxicidade das cianobactérias das albufeiras do Alqueva (produção de cianotoxinas), por métodos moleculares;
4. Análise de risco das águas das albufeiras do Alqueva

3. Materiais e métodos

3.1. Albufeiras e pontos de amostragem

De forma a monitorizar as águas presentes no sistema de albufeiras do Alqueva, foram realizadas 3 campanhas de amostragem durante os meses de Julho, Agosto e Setembro, no Verão de 2020. Nestas 3 campanhas realizaram-se amostragens em 3 albufeiras: S. Pedro, Magra e Pisão.

A escolha das diferentes albufeiras teve em conta diferentes aspetos, como a localização relativa das albufeiras para a eficaz realização das amostragens, a diferente proveniência da água relativamente aos sistemas (Sistema Alqueva ou Pedrógão). Igualmente importante para a escolha destas albufeiras foi o estudo preliminar realizado por Silva et al (2020), utilizando os dados de fitoplâncton da EDIA, e que permitiu identificar as albufeiras mais problemáticas relativamente a situações de eutrofização e contaminação por cianobactérias (Tabela 4).

Silva et al. (2020) realizaram um estudo de avaliação da qualidade da água das albufeiras, utilizando dados históricos de fitoplâncton. Os autores elaboraram uma matriz de risco prioritizado tendo em conta 2 parâmetros: ocorrência de cianobactérias tóxicas (número de géneros ou espécies com potencial tóxico); densidade celular de cianobactérias tóxicas (≥ 20000 células/mL). Às diferentes albufeiras foi atribuído um nível de risco, recorrendo a dados de monitorização fornecidos pela EDIA nos meses de Julho e Agosto de 2016 a 2018, consoante os 2 parâmetros referidos (Tabela 4). O risco é assim avaliado conforme o historial de ocorrência e proliferação de cianobactérias com potencial tóxico, nestas albufeiras.

Tabela 4. Nível de risco atribuído às albufeiras do sistema Alqueva. Adaptado de Silva et al (2020).

Níveis de risco	Albufeiras
Alta ocorrência de cianobactérias tóxicas com densidade celular $\approx \geq 20\,000$ células/mL	Álamos; Alqueva; Alvito; Luceférit; Pisão ; Serpa
Ocorrência intermédia de cianobactérias tóxicas com densidade celular $\approx \geq 20\,000$ células/mL	Loureiro; Magra ; Pedrogão; S. Pedro ;
Baixa ocorrência de cianobactérias tóxicas com densidade celular $\approx \geq 20\,000$ células/mL	Alcarrache; Amoreira; Brinches; Cinco Reis; Furta Galinhas; Laje; Penedrão; Pias;
Baixa ocorrência de cianobactérias tóxicas com densidade celular $< 20\,000$ células/mL	Caliços; Sra. Ajuda

Os resultados desta classificação por nível de risco permitiram uma triagem inicial das albufeiras analisadas. Com base nesta classificação, e nas questões logísticas associadas às campanhas de amostragem, foram definidas, como objecto de amostragem e estudo para este trabalho, as albufeiras de Pisão, S. Pedro e Magra (Tabela 4).

Em cada albufeira foram escolhidos pontos de amostragem (2-3 pontos) representativos das diferentes zonas da albufeira (Figuras 14, 15 e 16): zona de entrada de água na albufeira; zona mais profunda (bóia); zona de captação de água.

Na campanha de amostragem de Julho foi feita a recolha na zona mais superficial (0-1 m de profundidade). Na campanha de Agosto recolheram-se, para posterior comparação, amostras superficiais e compostas, enquanto na campanha de Setembro recolheram-se apenas amostras compostas nos vários pontos.



Figura 14. Imagem de satélite – Albufeira de S. Pedro.



Figura 15. Imagem de satélite – Albufeira da Magra.



Figura 16. Imagem de satélite – Albufeira de Pisão.

3.2. Amostragem

3.2.1 Albufeiras

As amostragens nas albufeiras foram realizadas com auxílio de embarcação, de manhã, no período compreendido entre as 7h e as 12h. Em cada ponto de amostragem parâmetros físico-químicos da água, nomeadamente temperatura, pH, salinidade, e condutividade parcial e absoluta, foram medidos e registados com uma sonda multiparamétrica HANNA HI98194 (Hanna Instruments®, Itália). A identificação e o registo da localização geográfica foi feito com recurso a telemóvel com GPS (em Anexo: Informação suplementar 1).

De forma a obter amostras compostas representativas da zona eufótica, foi inicialmente realizado um teste de turbidez com recurso ao disco de Secchi (Preisendorfer, 1986), em cada ponto de amostragem. A partir do valor deste teste foram determinadas as 3 profundidades de recolha das sub-amostras. Em cada ponto de amostragem recolheram-se 3 litros de cada uma das 3 diferentes profundidades calculadas ao longo da zona eufótica, com recurso a uma garrafa hidrográfica *Van Dorn*, e homogeneizou-se a amostra composta num balde de 16 litros. Apenas 5 litros da amostra composta homogeneizada foram recolhidos para posterior análise. Ao contrário dos meses de Agosto e Setembro, em Julho apenas se realizaram amostras superficiais. Neste tipo de amostra, 5 litros de água foram recolhidos diretamente da zona superficial (0-1 m de profundidade).

As amostras foram armazenadas em garrafas de Polietileno tereftalato (PET) de 5 ou 6 litros previamente enxaguadas com água destilada. As garrafas foram devidamente fechadas e mantidas em arcas térmicas com gelo para manter as amostras refrigeradas, durante o transporte até ao Porto. Esta viagem realizou-se no mesmo dia da amostragem.

Após chegada ao laboratório foram mantidas em condições de refrigeração a 4° C, num período de 1 a 2 dias até ao seu processamento.

3.2.2 Parque da Cidade (Ensaio de recuperação)

Para o ensaio de recuperação para a extração em fase sólida (EFS) foram recolhidos 15 litros de água do lago nº 1 (Fig. 17) do Parque da Cidade, de forma a mimetizar uma matriz ambiental complexa próxima à das albufeiras do sistema Alqueva, e poder validar o método EFS. A amostra recolhida foi sujeita ao mesmo processo de filtração que as amostras ambientais recolhidas das albufeiras do Alqueva, com o objectivo de remover quaisquer microorganismos e detritos da água, e desta forma obter apenas a componente extracelular (filtrado) e que, segundo o modelo de processamento (Fig. 18) e protocolo utilizados, é submetida a EFS.



Figura 17. Lago 1 - Parque da cidade, Porto. Fonte: Google Earth Pro (2021). 41°10'7.71"N; 8°40'22.24"W

3.3. Processamento das amostras (filtração)

As amostras de água recolhidas foram filtradas com um sistema de filtração por vácuo, usando filtros de papel de microfibras de vidro Fisherbrand, com diâmetro 47 mm e porosidade 0,7 µm (Fisherbrand™, ref. 11764083, United Kingdom). A partir deste processo (Fig. 18) foi possível obter elementos para realizar 2 tipos distintos de análises: química e molecular. Para a análise molecular (genómica) filtraram-se 3 - 4 L de água, de

cada amostra. O filtrado, constituído por toda a matéria em suspensão (incluindo o fitoplâncton) retida nos filtros, foi armazenado a -20°C para posterior tratamento.

Para a análise química filtraram-se 2 L de água. O filtrado correspondente a este volume de amostra foi igualmente armazenado a -20°C para posterior tratamento. Por outro lado, a água filtrada (2 L) resultante foi utilizada de duas formas diferentes, de acordo com o tratamento subsequente a realizar: a) 1 litro foi distribuído por copos de 100 mL de polietileno para futura liofilização e b) 1 litro foi armazenado em garrafas de PET de 1,5 litros para posterior EFS.

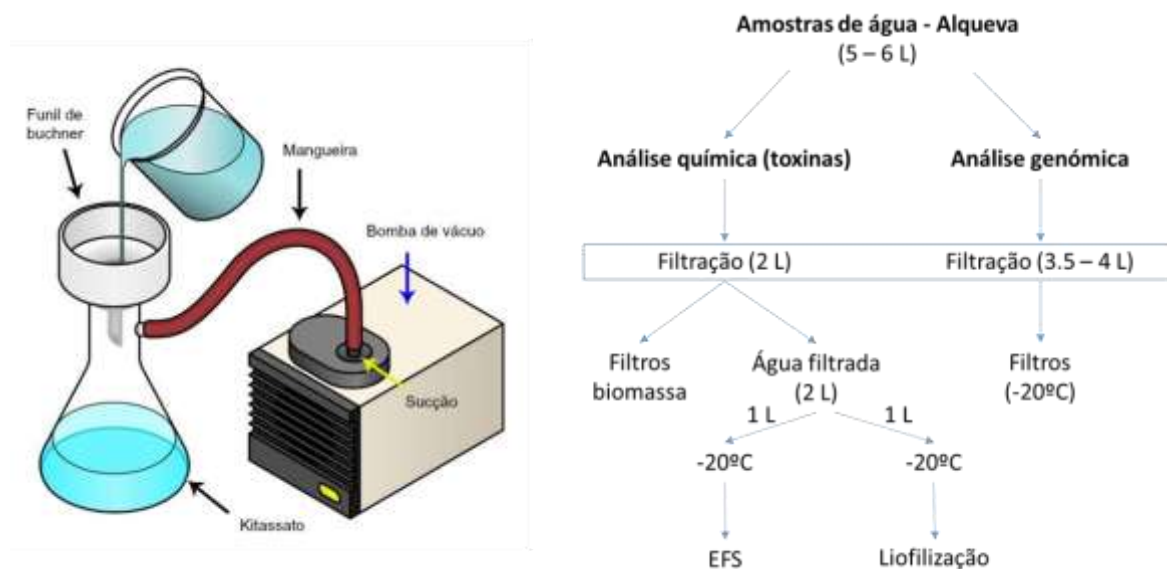


Figura 18. Processamento – filtração. Ilustração do sistema de filtração, e esquema explicativo.

3.4. Análise molecular

3.4.1. Extração de DNA

De forma a extrair o DNA do material filtrado (biomassa em suspensão nas amostras de água, incluindo as microalgas e cianobactérias), os filtros foram raspados com uma lâmina estéril e colocados em microtubos. O DNA genómico (gDNA) das amostras foi extraído com o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA), seguindo o protocolo do fabricante para as bactérias Gram-negativas. Para executar este protocolo foram usados uma centrífuga Micro Star 17 (VWR®, Germany) e um agitador térmico Thermomixer compact (Eppendorf, Germany). Na etapa da eluição foi usado um volume de 50 µL de solução eluente para cada amostra de DNA.

Com o intuito de confirmar a presença e integridade do gDNA foi realizada eletroforese em gel de agarose (1%, p/v) (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, CA, USA), com incorporação

da solução de SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, CA, USA) num tampão constituído por 40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8.3 ± 0.10. A eletroforese foi realizada a voltagem constante de 110 V durante 25 min. Em cada poço foi colocada uma amostra de gDNA (5 µl) com 1µL de 1x gel tampão de amostra constituído por 10mM Tris-HCL, pH 8, 5% Glicerol, 1mM EDTA, 0.04% azul de bromofenol e 0.04% xileno cianol FF. Para visualizar os resultados de todas as corridas por eletroforese foi usado um analisador de imagem Gel Doc™ EZ Imager (Biorad, USA), com luz UV. As imagens obtidas foram exportadas com o software ImageLab 6.1 (Biorad, USA).

3.4.2 Amplificações por PCR

Para as amplificações de sequências do DNA foram usados os reagentes do kit GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, WI USA), para um volume final de 20 µL. Cada mistura de reacção para PCR apresentou 4µL de tampão 5x Green GoTaq® Flexi, 2µL de solução 25mM MgCl₂, 2µL de *primer forward*, 2µL de *primer reverse*, 1µL de 2.5 mM de mistura de deoxinucleótido trifosfato (dNTP's), 0.5µL de albumina de soro bovino (BSA) (10 mg/mL), 0.1µL de GoTaq® DNA Polymerase (5u/µL) e 1µL de amostra de DNA. É de realçar a presença de BSA na mistura para PCR, associada à reconhecida capacidade desta proteína em se ligar à maioria dos inibidores da reacção de polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) normalmente encontrados em amostras ambientais, e também da sua capacidade em estabilizar a enzima DNA polimerase usada nesta reacção.

3.4.2.a) Detecção de cianobactérias

De modo a analisar a presença de DNA cianobacteriano nas amostras ambientais, realizaram-se amplificações, por meio da técnica PCR, de fragmentos do gene 16S de RNA ribossómico (rRNA) e do operão da ficocianina. Os pares de *primers* utilizados foram 27F/809R e 740F/1494R para o caso do 16S rRNA, e o PCβF/PCβR para o caso da ficocianina (Tabela 5).

3.4.2.b) Presença de *Microcystis* sp. e potencial tóxico para microcistina

Nas amostras positivas para a presença de DNA de cianobactérias realizaram-se, subsequentemente, amplificações aos fragmentos dos genes *mcyA* e *mcyB* da microcistina sintetase, para avaliar a presença de cianobactérias produtoras da toxina MC (Tabela 6). A análise da presença de *Microcystis* sp. foi realizada por amplificações de fragmentos do gene 16s rRNA, específico para estas espécies. Para determinação do potencial para a produção de MC em espécies *Microcystis* sp., fragmentos dos genes *mcyA-E* e *mcyG*, que

compõem o cluster de genes *mcy*, responsável pela biossíntese da MC, foram amplificados (Tabela 6).

Tabela 5. Conjuntos de *primers* aplicados em PCR convencional na detecção de cianobactérias (16S rRNA e operação de ficocianina), e do gene 16S rRNA de *Microcystis sp.*

Gene	Primer	Sequência do primer 5'-3'	Tamanho do produto (pares de bases)	Referência
16S rRNA cianobactérias	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	780	Neilan <i>et al.</i> , 1997; Jungblut <i>et al.</i> , 2005
	809R	GCTTCGGCAGGCTCGGGTCGATA		
	740F	GGCYRWAUWCTGACACTSAGGGA	754	Neilan <i>et al.</i> , 1997
	1494R	TACGGTTACCTTGTACGAC		
Operação ficocianina	PCβF	GGCTGCTTGTTCACGCGACA	700	Neilan <i>et al.</i> , 1995
	PCβR	CCAGTACCACCAGCAACTAA		
16S rRNA <i>Microcystis sp.</i>	Micr 184F	GCCGCRAAGTGAAAMCTAA	220	Neilan <i>et al.</i> , 1997
	Micr 431R	AATCCAAARACCTTCCTCCC		

Tabela 6. Conjuntos de *primers* aplicados em PCR convencional para detecção dos genes responsáveis pela síntese de MCs, sem distinção taxonómica (Geral), e em *Microcystis sp.*

Gene		Primer	Sequencia do primer 5'-3'	Tamanho do produto (pares de bases)	Referência
Geral	mcy A	CD1 F	AAAATTAAGCCGTATCAAA	297	Hisbergues <i>et al.</i> , 2003
		CD1 R	AAAAGTGTTTATTAGCGGCTCAT		
	mcy B	FAA	CTATGTTATTTATACATCAGG	758	Neilan <i>et al.</i> , 1999
		RAA	CTCAGCTTAAGTTGATTATC		
Microcystis sp.	mcy A	MSF	ATCCAGCAGTTGAGCAAGC	1300	Tillett <i>et al.</i> , 2001
		MSR	TGCAGATAACTCCGAGTTG		
	mcy B	2156-F	ATCACTTCAATCTAACGACT	955	Mikalsen <i>et al.</i> , 2003
		3111-R	AGTTGCTGCTGTAAGAAA		
	mcy C	PSCF1	GCAACATCCCAAGAGCAAAG	674	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
		PSCR 1	CCGACAACATCACAAAGGC		
	mcy D	PKDF1	GACGCTCAAATGATGAAAC	647	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
		PKDR1	GCAACCGATAAAACTCCC		
	mcy E	PKEF1	CGCAAACCCGATTTACAG	755	Ouahid <i>et al.</i> , 2006
		PKER1	CCCCTACCATCTTCATCTTC		
	mcy G	PKGf1	ACTCTCAAGTTATCTCCCTC	425	Ouahid <i>et al.</i> , 2007
		PKGR1	AATCGCTAAAACGCCACC		

Como controlo positivo das reacções de amplificação (PCR), foi usado DNA extraído de culturas puras de estirpes pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Ecotoxicologia e Genómica Evolutiva (LEGE CC, <https://lege.ciimar.up.pt>). Para o reconhecimento da presença de DNA cianobacteriano utilizou-se DNA de *C. raciborskii*,

estirpe LEGE 97047. No estudo da presença do género *Microcystis* sp., e dos genes pertencentes ao complexo microcistina sintetase, utilizou-se DNA de *M. aeruginosa*, estirpe LEGE 00063.

As reacções de PCR decorreram no termociclador Veriti™ 96-Well (Applied Biosystems, CA, USA). As eletroforeses que confirmaram a presença dos fragmentos amplificados foram realizadas em gel de agarose a 1,5%, nas mesmas condições indicadas para a confirmação da presença de gDNA. As condições de reacção de PCR encontram-se descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Programas de PCR convencional aplicados para detecção de cianobactérias, *Microcystis* sp., e detecção de genes produtores de microcistinas.

		Desnaturação inicial		35 ciclos						Extensão final	
				Desnaturação		Emparelhamento ("Annealing")		Extensão			
Gene-alvo		Temper.	Tempo	Temper.	Tempo	Temper.	Tempo	Temper.	Tempo	Temper.	Tempo
16S rRNA Cianobacteriano		92 °C	2 min	92 °C	20 seg	50 °C	30 seg	72 °C	1 min	72 °C	5 min
Operão ficocianina		94 °C	3 min	94 °C	30 seg	50 °C	30 seg	72 °C	30 seg	72 °C	5 min
16S rRNA <i>Microcystis</i> sp.		95 °C	2 min	95 °C	90 seg	56 °C	30 seg	72 °C	50 seg	72 °C	7 min
<i>mcy</i> A		95 °C	2 min	95 °C	90 seg	56 °C	30 seg	72 °C	50 seg	72 °C	7 min
<i>mcy</i> B		94 °C	2 min	93 °C	10 seg	50 °C	20 seg	72 °C	1 min	72 °C	5 min
<i>Microcystis</i> sp.	<i>mcy</i> A	95 °C	2 min	95 °C	90 seg	60 °C	30 seg	72 °C	50 seg	72 °C	7 min
	<i>mcy</i> B	94 °C	5 min	95 °C	1 min	52 °C	30 seg	72 °C	1 min	72 °C	7 min
	<i>mcy</i> C	94 °C	5 min	95 °C	1 min	52 °C	30 seg	72 °C	1 min	72 °C	7 min
	<i>mcy</i> D	94 °C	5 min	95 °C	1 min	52 °C	30 seg	72 °C	1 min	72 °C	7 min
	<i>mcy</i> E	94 °C	5 min	95 °C	1 min	52 °C	30 seg	72 °C	1 min	72 °C	7 min
	<i>mcy</i> G	94 °C	5 min	95 °C	1 min	52 °C	30 seg	72 °C	1 min	72 °C	7 min

3.4.2.c) Sequenciação DNA

Para confirmar a presença do gene *mcyA*, cerca de 60 µL do amplificado, obtido do PCR para este gene, foi purificado usando o Kit Combo *PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com o protocolo do produtor, seguido de sequenciação direta (Eurofins, Porto). As sequências de nucleótidos obtidas foram inicialmente examinados com o software BioEdit, e depois foi realizada uma pesquisa a partir da ferramenta de bioinformática BLAST, com a base de dados de nucleótidos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.5. Análise Química

Com vista à extração e detecção de cianotoxinas e outros metabolitos secundários nas amostras ambientais recolhidas, diferentes métodos e técnicas foram realizados. Nas etapas descritas posteriormente, os processos de separação por meio de centrifugação foram realizados com recurso às centrífugas Sorvall BIOS 16 (ThermoFisher, Alemanha) e Heraeus Megafuge 16R (ThermoFisher, Alemanha).

Para proceder às extracções em fase sólida preparou-se um sistema principalmente constituído de bomba de vácuo, manifold Supelco (Visiprep™) e cartuchos Oasis® HLB (3 cc/60 mg). Todo o processo ocorreu dentro de uma câmara de exaustão HL-ST01 (Laborial, Portugal), tendo em conta o manuseamento de solventes orgânicos, como o metanol.

No processo de remoção de impurezas dos solventes, aquando da colocação das amostras nos frascos de vidro para LC-MS, utilizaram-se filtros de seringa estéreis de poliétersulfona (PES) SFPE-22E-050 (Branchia, Reino Unido) de 25 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade.

3.5.1. Validação do método de determinação de cianotoxinas por LC-MS

A primeira fase deste projeto teve como propósito otimizar os processos e as condições de extração que melhor se ajustam para a separação cromatográfica das cianotoxinas em estudo, assim como otimizar as condições de análise para a detecção dessas cianotoxinas por espectrometria de massa. Uma vez que não existia biomassa suficiente das estirpes produtoras das outras toxinas, para a realização dos vários ensaios, apenas se prosseguiu com o método quantitativo para a cianotoxina MC-LR.

3.5.1.a) Determinação de MC-LR em biomassa de LEGE 91094

De forma a avaliar a capacidade de retenção de MCs nos cartuchos escolhidos e determinar a concentração média de MC-LR em biomassa de LEGE 91094 – estirpe de *Microcystis aeruginosa* -, da qual se tem conhecimento que produz MC, foi realizado um ensaio de EFS a partir da biomassa desta estirpe. Para este ensaio, realizado para 4 amostras, utilizou-se 50 mg de biomassa liofilizada à qual se adicionou inicialmente 10 mL de metanol (MeOH) a 50% (v/v). O processo de extração realizado seguiu o protocolo descrito em **3.5.2 Amostras ambientais - Componente intracelular**. Como forma de comparar amostras submetidas e não submetidas a EFS, uma das 4 amostras foi analisada diretamente sem EFS.

3.5.1.b) Validação do método de extração EFS

O efeito da complexa matriz presente em amostras ambientais pode alterar as análises extremamente sensíveis do sistema LC-MS, provocando um aumento ou supressão do sinal do analito de interesse. Para reduzir as interferências provocadas pela complexidade das amostras ambientais, e obter melhores leituras qualitativa e quantitativamente, foi aplicado a técnica EFS. Este ensaio pretendeu avaliar, para várias concentrações: a) a capacidade de recuperação de MC-LR dos cartuchos utilizados na EFS; b) avaliar o efeito matriz presente numa amostra ambiental de água, quer no processo de extração utilizado (EFS), quer na análise com LC-MS.

A validação de um método analítico consiste na obtenção de um conjunto de parâmetros estatísticos que caracterizam esse método e que permitem provar que o método é válido, ou seja, serve para o fim a que se destina. Por isso foi realizado um estudo de recuperação através da fortificação de uma matriz semelhante à das albufeiras em estudo. Como será descrito, é necessário para este teste preparar 3 concentrações da toxina a quantificar (extremos esperados e nível médio), cada um em triplicado.

O tratamento das amostras ambientais recolhidas no Lago 1 do Parque da Cidade (Fig. 17) está descrito em **3.2.2** e **3.3**. O filtrado obtido foi distribuído por 4 diferentes grupos. Em cada grupo, 3 réplicas de 0,5 L de água filtrada foram igualmente fortificadas com uma das concentrações de MC-LR: 0 µg/L; 0,1 µg/L; 0,5 µg/L; 1 µg/L). As fortificações de MC-LR partiram de um extrato aquoso obtido em **3.5.1.a)**, cujas concentrações da toxina foram previamente determinados por LC-MS. O protocolo de EFS encontra-se descrito em **3.5.3.b)**. Com os resultados obtidos neste ensaio construiu-se uma reta de recuperação (Ver **4.1**).

Para além da recuperação, outro parâmetro a considerar no método é a linearidade. Um estudo de linearidade permite determinar se o sinal obtido é linearmente proporcional à concentração do composto a ser analisado, na amplitude de concentrações esperadas nas amostras. Para isso o teste deve ser realizado com soluções-padrão em pelo menos 5 níveis de concentrações, entre os 50% e os 150% da concentração esperada, obtendo-se daqui uma reta de calibração. A partir desta reta obtemos o coeficiente de determinação (R^2) cujo valor deve ser superior a 0,998.

A exactidão é outro dos parâmetros a validar, e traduz o grau de proximidade com o valor real. Neste aspecto, todo o processo de tratamento da amostra até à sua análise podem causar alterações. O parâmetro *Carry-over*, que indica se há transferência de analito entre leituras de amostras no LC-MS, foi testado pela injeção de uma solução padrão em matriz

com concentração elevada (acima do padrão mais alto da reta), em triplicado, seguido da injeção de um branco. Como não foi obtido qualquer sinal de MC-LR no branco, concluiu-se que não existiu *Carry-over*.

3.5.2 Amostras ambientais - Componente intracelular

A extração de toxinas da componente intracelular, a partir do fitoplâncton retido nos filtros, implicou a prévia liofilização dos filtros usados no processo de filtração. Os filtros liofilizados, separados por pontos de amostragem, foram moídos com almofariz e pilão, após adição de nitrogénio líquido de forma a facilitar o rebentamento das células. De seguida, adicionou-se o solvente MeOH a 10% (v/v), numa proporção de 5 mL deste solvente por cada filtro, para completar a homogeneização. Para complementar a etapa de lise celular e libertação do conteúdo intracelular foi utilizado o sonicador Sonopuls HD-2070.2 (20 kHz/ 25% amplitude), com a sonda MS-72 e cabine isoladora LS-40 (Bandelin, Alemanha) em ciclos de 5x1 minutos a 20 kHz, em banho de gelo. A mistura foi incubada a 4° C de um dia para o outro. De seguida, a separação dos componentes dissolvidos e particulados utilizou a centrífuga Heraeus Megafuge 16R, numa velocidade de 13 000 g, por 20 min. Esta separação foi complementada com a passagem do sobrenadante por filtros SFPE-22E-050, com vista a reter quaisquer partículas e facilitar as etapas posteriores. O sobrenadante foi depois recolhido e armazenado a 4° C. O processo de extração, a partir da adição de solvente, foi repetido sem a etapa da sonicação. Os sobrenadantes foram reunidos. A subsequente remoção dos solventes realizou-se com um sistema *Acid-Resistant CentriVap Concentration* (Labconco®, USA) com uma *Coldtrap* a -50 °C, acoplada a uma bomba de vácuo RV5 *Rotary Vane* (Edwards, UK). As amostras desidratadas foram ressuspensas num banho de ultrassons em 1000 µL de MeOH a 50% (v/v), acidificado com ácido fórmico a 0,1% (v/v) e centrifugadas a 10000g por 5 min. Após este procedimento foram filtradas com SFPE-22E-050 e transferidas para viais de 2 mL para LC-MS.

3.5.3 Amostras ambientais - Componente extracelular

No caso do conteúdo extracelular, correspondente às águas filtradas, dois processos foram empregues: a) liofilização e b) EFS.

3.5.3.a) Liofilização

A liofilização permite, ao contrário da EFS, reter todo o tipo de conteúdo dissolvido na água filtrada, ocorrendo apenas a evaporação da amostra. Por cada ponto de amostragem, 1 litro de água filtrada foi liofilizada em copos de polietileno de 100 mL colocados no interior de cubas, num liofilizador Lyoquest-55 (Telstar®, Espanha) (Fig. 19).



Figura 19. Liofilizador Lyoquest-55 (Telstar®, Espanha)

3.5.3.b) EFS

Para proceder a este método, foi preparado o sistema já descrito em **3.5**. A EFS foi realizada em cartuchos Oasis® HLB (3 cc/60 mg) segundo a forma descrita na **Tabela 8**. O eluído resultante de EFS foi posteriormente levado à secura com Rotavapor® R-300 EL (BUCHI, Suíça) a 30°C, de forma a remover o solvente. As amostras foram depois ressuspensas em 1000 µL de metanol a 50% (v/v), acidificado com ácido fórmico a 0,1% (v/v), e finalmente filtradas com filtros SFPE-22E-050 para frascos de vidro de 2 mL para LC-MS.

Tabela 8. Etapas e condições da EFS

ETAPAS	SOLVENTES
Condicionamento	5 mL MeOH 100%
	5 mL H ₂ O desionizada
Adição da Amostra (0,5 a 1,0 L)	
Lavagem	5 mL MeOH 5% (v/v)
	30 min secagem (pressão máx. 10 mmHg)
Eluição	5 mL MeOH 95% (v/v) e ác. fórmico 5% (v/v)

3.5.4 Análise qualitativa e quantitativa com LC-MS

Todos os solventes usados no sistema HPLC foram filtrados com filtros de 0,2 µm (Pall GH Polypro 47 mm) e desgaseificados por banho de ultrassons.

3.5.4.a) Detecção e quantificação de 7 moléculas em simultâneo, por LC-MS

O método utilizado determina a presença/ausência de cianotoxinas, nomeadamente MCs (-LR, -RR, -YR), cilindrospermopsina, anatoxina e saxitoxina. Todos os padrões-analíticos e condições de deteção são listadas na Tabela 8. Fez-se também a dopagem da amostra com mistura-padrão e a pesquisa de iões característicos de outros análogos da MC. O sistema usado para identificar e quantificar as cianotoxinas foi o sistema *Liquid Phase Chromatograph Alliance e2695 HPLC*, acoplado a um detector espectrométrico triplo quadrupolo (Micromass® Quattro micro TM API) com uma interface eletrospray (ESI-*eletrospray ionization*). O software usado para a aquisição e processamento de dados foi a versão 4.1 do MassLynx. O espectrómetro de massas operou em modo *Full scan* e a quantificação foi feita com *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) nas condições seguidamente descritas. A voltagem capilar foi mantida a 3.5 kV; cone a 50 V, a voltagem em spray foi de 5.5 kV. A temperatura da fonte foi mantida a 120 °C e *Desolvation* a 350 °C e 700 L/hr. O azoto foi usado como lâmina/bainha e gás auxiliar, e o árgon como gás de colisão à pressão de 0.5 bar; A separação foi realizada numa coluna C18 Hypersil Gold (100 × 4.6 mm I.D., 5 µm, ThermoScientific, Waltham, MA, USA) mantida a 35 °C, com uma taxa de fluxo de 0.3 mL/min. O volume injectado foi de 10 µL em modo de loop parcial. As amostras foram injectadas em modo de polaridade positiva, em condições de varrimento total (30-2000 m/z); Os padrões e as amostras foram injectadas em duplicado e a cada conjunto de 10 amostras, um branco e dois padrões com diferentes concentrações foram introduzidos; Uma eluição em gradiente foi usada com a fase móvel A, água ultrapura e B, MeOH, ambas acidificadas com 0.1% de ácido fórmico (30 % A e 70 % B aos 0 min, 50 % A e 50 % B aos 10 min, voltando às condições iniciais aos 15 min e equilibrando durante 5 min). A quantificação nas amostras foi realizada em modo MRM (Fig. 21), usando as transições da Tabela 9.

Tabela 9. Padrões moleculares utilizados, condições de deteção e limites de deteção do método.

Cianotoxina	Transição massa-carga (m/z)	Energia de Colisão	Limite de Deteção (µg/L)
Anatoxin-a	166>131	20	5,7 ± 0,3
	166>149	25	
Cylindrospermopsin	416>336	20	3,8 ± 0,7
	416>194	28	

Saxitoxin	300>282	20	7,9 ± 1,3
	300>204	25	
Microcystin-LR	995.5>135	50	2,9 ± 0,8
	995.5>599	50	
Microcystin-RR	520>70	50	4,1 ± 0,3
	520>135	50	
Microcystin-YR	1045.5>135	50	3,2 ± 0,8
	1045.5>175	50	

Padrões de Anatoxin-a (CRM-03-ANA, Lote 16-001, 99% pureza), Saxitoxina (CRM-00-STX, Lote 16-001, 99% pureza), MC-LR (CRM-00-MC-LR, Lote 19-001, 96% pureza), MC-RR (CRM-00-MC-RR, Lote 19-001, 96% pureza), MC-YR (CRM-00-MC-YR, Lote 19-001, 96% pureza) e Cilindrospermopsina (CRM-03-CYN, Lote 16-001, 99% pureza) fornecidos pela CIFGA (Lugo, Espanha).

3.5.4.b) Detecção e Quantificação de MC-LR por LC-MS

O método de quantificação de MC-LR utilizado foi o do padrão-externo, em que amostra e padrão são injetados separadamente, e é construída uma reta de calibração a partir de diferentes concentrações da solução-padrão. A identificação do analito de interesse é obtida pelo tempo de retenção (TR) e análise do respectivo espectro de massa. O sistema foi calibrado usando 7 diluições da solução-padrão de MC-LR, no intervalo 0,01 a 1 µg/L, diluídas em 50% MeOH e acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, de forma a encontrar a equação da recta de calibração que serviu a quantificação de MC-LR. Esta solução-padrão de MC-LR, com uma concentração de 10 µg/mL, foi adquirida ao CIFGA S.A. (Espanha, lote nº 15-001).

O sistema usado para identificar e quantificar a MC-LR, as condições da corrida e a coluna foram as mesmas que em **3.5.4.a)**. No entanto, como o 1º quadrupólo (Q1) funcionou de modo a apenas seleccionar, para a câmara de colisão (Q2), iões com m/z igual a MC-LR (995.5), o ruído de fundo foi grandemente reduzido, aumentando a sensibilidade da pesquisa. As amostras foram injectadas em modo de polaridade positiva, em condições de varrimento total (30-2000 m/z) e MRM de 2 canais, 135 e 599 m/z. Os padrões e as amostras foram injectadas em duplicado e a cada conjunto de 10 amostras, um branco e dois padrões com diferentes concentrações foram introduzidos. Nestas condições, o TR de MC-LR foi de 5.71 min. A quantificação nas amostras foi realizada em modo MRM usando as mesmas transições.

4. Resultados

4.1. Análise molecular

Esta análise teve o propósito de identificar, por um lado a presença de cianobactérias e o género *Microcystis* nas amostras ambientais, e por outro os genes pertencentes à cadeia de biossíntese de MCs. Esta informação irá permitir inferir sobre o risco existente quanto à produção (e ocorrência) de MCs, nas albufeiras em estudo. O estudo molecular tem por base a amplificação de genes específicos, utilizando combinações de *primers* e recorrendo à reação de polimerase (PCR). O resultado desta análise, isto é, os produtos de PCR, são por sua vez detetados através de electroforese de agarose com recurso ao transiluminador de UV. Na Fig. 20 apresenta-se um gel de agarose típico, que revela a presença/ausência de fragmentos de DNA amplificados com determinado tamanho, neste caso o gene *mcyD*, contra um controlo positivo (c+) e negativo (c-). Os resultados do estudo molecular encontram-se descritos nas seguintes seções, nas Tabelas 12-16.



Figura 20. Resultados das corridas dos fragmentos DNA amplificados, correspondentes a *mcyD* (específico de *Microcystis* sp.), por eletroforese em gel de agarose. À esquerda o marcador de peso molecular, seguido dos produtos da amplificação por PCR nas amostras ambientais identificadas no topo. **C+** - controlo positivo; **C-** - controlo negativo. Amostras com banda luminescente com mesmo peso molecular que **C+** são positivas, enquanto as restantes são negativas para o fragmento associado ao gene *mcyD*.

4.1.1. Análise da deteção de cianobactérias

A presença de DNA cianobacteriano nas amostras de biomassa filtrada, presente nos filtros, foi confirmada através da amplificação dos genes 16S rRNA (pares de *primers* 27F/809R e 740F/1494R) e do operão da ficocianina (par de *primers* PCβF/PCβR). Os resultados foram considerados positivos na presença de ambos os genes 16S rRNA e do operão de ficocianina (Tabela 10).

Tabela 10. Detecção de fragmentos amplificados relacionadas com a presença de cianobactérias. A verde identificam-se as amostras em que foi confirmada a presença de genes marcadores de cianobactérias (16S rRNA e ficocianina).

	S. Pedro				Magra		Pisão			
Julho	SP1	SP2	SP3		M1	M2	P1	P2	P3	
Agosto	SP1	SP2	SP3	SP4	M1	M2	P1	P2	P3	P4
Setembro	SP1	SP2	SP3		M1	M2	P1	P2	P3	

Como ilustrado na Tabela 10, foi confirmada a presença de cianobactérias em apenas 16 das 26 amostras. As amostras de Julho provenientes da albufeira Pisão não revelaram qualquer presença de cianobactérias. A incidência destes organismos foi também mais acentuada na albufeira de S. Pedro, notando-se a presença dos fragmentos amplificados em 9 das 10 amostras recolhidas. O mesmo não acontece na albufeira de Pisão, em que esta presença apenas ocorre em 3 das 10 amostras recolhidas.

Esta primeira análise permitiu uma triagem inicial das amostras. Apenas as amostras em que se verificou a presença de fragmentos amplificados para 16S rRNA e do operão ficocianina foram analisados para a presença de *Microcystis* sp. e potencial de produção de MCs. As restantes amostras, uma vez que não apresentaram resultados positivos quanto à presença de DNA cianobacteriano, foram excluídas da restante análise molecular.

4.1.2. Análise da presença de *Microcystis* sp.

O estudo prosseguiu com a análise de genes que evidenciam a ocorrência de cianobactérias do género *Microcystis*, e subsequentemente dos genes envolvidos na biossíntese de MCs, nas amostras ambientais. Os resultados destas amplificações por PCR encontram-se reunidos nas Tabelas 11 a 14.

Tabela 11. Detecção de fragmentos amplificados relacionadas com a presença do genes 16S rRNA específico de *Microcystis* sp., usando o par de primers Micr 184F/Micr 431R. A verde identificam-se as amostras com resultado positivo (presença do gene) e a riscado as amostras negativas para a presença de cianobactérias.

Microcystis sp. 16s rRNA Micr 184F/ Micr 431R	S. Pedro			Magra		Pisão	
Julho	SP1	SP2	SP3	M1			
Agosto	SP1	SP2	SP3		M2		P3
Setembro	SP1	SP2	SP3	M1	M2	P2	P3

Após observação da Tabela 11, que revela os resultados da técnica PCR, usando o par de *primers* Micr 184F/Micr 431R, constata-se a ocorrência de cianobactérias pertencentes ao género *Microcystis* em todos os pontos em que foi inicialmente confirmada a presença de cianobactérias.

4.1.3. Análise dos genes da biossíntese de microcistina

A análise da presença de genes pertencentes ao complexo microcistina sintetase foi efectuada através do uso de pares de *primers* específicos para os vários genes pertencentes ao complexo *mcxABDEG*.

4.1.3.a) Genes *mcyA* e *mcyB* ao nível da comunidade

Inicialmente realizou-se uma análise aos genes *mcyA* e *mcyB*, recorrendo a pares de *primers* não específicos em termos taxonómicos (CD1F/CD1R e FAA/RAA). Os pares de *primers* utilizados permitiram portanto a deteção destes genes ao nível da comunidade de cianobactérias presente nas albufeiras monitorizadas.

Relativamente ao fragmento amplificado a partir do uso do par de *primers* CD1F/CD1R, este apenas está ausente em P3 (Agosto) e em SP1 e SP3 (Setembro), conforme Tabela 12. Quanto ao gene *mcyB*, a sua ausência só se verificou em Setembro, no ponto P2.

Tabela 12. Deteção de fragmentos amplificados relacionados com a presença do gene *mcyA* e *mcyB* na comunidade de cianobactérias, usando os pares de *primers* CD1F/CD1R e FAA/RAA, respectivamente. A verde encontram-se as amostras com resultado positivo (presença do gene) e a cinzento as com resultado negativo (ausência do gene), e a riscado as amostras não analisadas.

<i>mcyA</i> CD1F/ CD1R	S. Pedro			Magra		Pisão	
Julho	SP1	SP2	SP3	M1			
Agosto	SP1	SP2	SP3		M2		P3
Setembro	SP1	SP2	SP3	M1	M2	P2	P3
<i>mcyB</i> FAA/RAA	S. Pedro			Magra		Pisão	
Julho	SP1	SP2	SP3	M1			
Agosto	SP1	SP2	SP3		M2		P3
Setembro	SP1	SP2	SP3	M1	M2	P2	P3

4.1.3.b) Genes *mcy*ABCDEG de *Microcystis* sp.

Os resultados para os pares de *primers* *mcyA* MSF/MSR e *mcyC* PSCF1/PSCR1, específicos para o género *Microcystis*, não são apresentados, uma vez que se verificou a ausência do gene *mcyA* em todas as amostras ambientais. Por outro lado, verificou-se existir um problema com o par de *primers* para *mcyC* que não permitiu a amplificação do controlo positivo, e neste caso a validação dos resultados. Os restantes resultados podem ser observados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Deteção de fragmentos amplificados relacionados com a presença do gene *mcyB*, *mcyD*, *mcyE*, *mcyG* específico para *Microcystis* sp., usando os pares de *primers* 2156F/3111R, PKDF2/PKDR2, PKDE1/PKER1, e PKGF1/PKGR1, respectivamente. A verde distinguem-se as amostras com resultado positivo (presença do gene), a cinzento as amostras com resultado negativo (ausência do gene), e a riscado as amostras sem qualquer sinal de cianobactérias.

<i>mcyB</i> 2156-F/ 3111-R	S. Pedro			Magra		Pisão	
Julho	SP1	SP2	SP3	M1			
Agosto	SP1	SP2	SP3		M2		P3
Setembro	SP1	SP2	SP3	M1	M2	P2	P3
<i>mcyD</i> PKDF1/ PKDR1	S. Pedro			Magra		Pisão	
Julho	SP1	SP2	SP3	M1			
Agosto	SP1	SP2	SP3		M2		P3
Setembro	SP1	SP2	SP3	M1	M2	P2	P3
<i>mcyE</i> PKEF1/ PKER1	S. Pedro			Magra		Pisão	
Julho	SP1	SP2	SP3	M1			
Agosto	SP1	SP2	SP3		M2		P3
Setembro	SP1	SP2	SP3	M1	M2	P2	P3
<i>mcyG</i> PKGF1/ PKGR1	S. Pedro			Magra		Pisão	
Julho	SP1	SP2	SP3	M1			
Agosto	SP1	SP2	SP3		M2		P3
Setembro	SP1	SP2	SP3	M1	M2	P2	P3

A ocorrência do gene *mcyB*, específico para *Microcystis* sp. apenas foi confirmada em SP2 em Agosto, na albufeira de S. Pedro, e não foi detetada na albufeira Magra no mesmo mês.

A presença do gene *mcyD* não foi detectada na albufeira da Magra, no mês de Julho, e na albufeira do Pisão no mês de Julho como Agosto. Quanto ao gene *mcyE*, a sua presença não foi confirmada na albufeira da Magra, apenas no mês de Julho. O amplificado obtido a partir dos *primers* PKGF1/PKGR1 é apenas detectado no ponto P3, no mês de Setembro.

4.1.3.c) Análise global do potencial de biossíntese de microcistina

Os resultados relativos ao potencial de biossíntese de MCs encontram-se reunidos na Tabela 14. Apesar de nem todos os genes pertencentes ao complexo *mcy*ABCDEG *para* *Microcystis* sp. terem sido detectados, é de notar que foi no ponto SP2, em Agosto, que se detetaram mais genes deste conjunto *mcy*, evidenciando um forte potencial de *Microcystis* sp. para a síntese de MCs neste local.

Tabela 14. Resumo da análise molecular de genes codificadores do complexo microcistina sintetase. A verde encontram-se as amostras com resultado positivo (presença do gene), a cinzento as com resultado negativo (ausência do gene), e a riscado as amostras sem qualquer sinal de cianobactérias.

			Geral		Microcystis sp.			
			<i>mcyA</i>	<i>mcyB</i>	<i>mcyB</i>	<i>mcyD</i>	<i>mcyE</i>	<i>mcyG</i>
S. Pedro	SP1	J						
		A						
		S						
	SP2	J						
		A						
		S						
	SP3	J						
		A						
		S						
Magra	M1	J						
		A						
		S						
	M2	J						
		A						
		S						
Pisão	P2	J						
		A						
		S						
	P3	J						
		A						
		S						

Em relação à prevalência total de genes *mcy*, considerando todas as amostras submetidas à análise molecular (26 amostras), os resultados encontram-se na Fig. 21. Em relação ao gene *mcyA* geral registou-se uma prevalência de 70% em S. Pedro, 67% em Magra e 20%

em Pisão, e relativamente ao gene *mcyB* geral, S. Pedro apresentou 90%, Magra 67% e Pisão 20%. Quanto à frequência relativa de *mcy* específico de *Microcystis* sp., *mcyB* apresentou o mais baixo resultado estando presente em S. Pedro em 10% das amostras, e o mais alto na Magra em 50% das amostras, tendo o Pisão revelado uma prevalência de 20%. Em relação aos restantes genes *mcyD*, -E, -G, S. Pedro registou sempre a maior prevalência destes genes, seguido da Magra, e finalmente o Pisão.

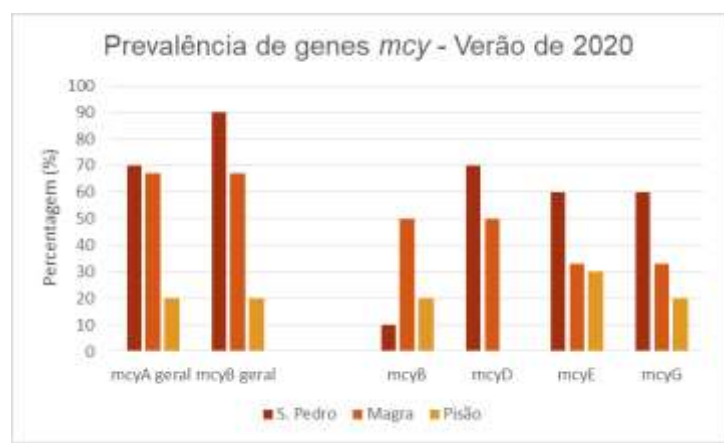


Figura 21. Prevalência total de genes *mcy* nos meses de Verão de 2020 (Julho, Agosto e Setembro).

4.1.3.d) Sequenciação do gene *mcyA*

A sequenciação dos fragmentos amplificados em 4.1.3. foi realizada com o intuito de identificar o grupo taxonómico presente nas amostras ambientais. Foi apenas possível obter dados de sequenciação com qualidade para as amostras pertencentes à albufeira de S. Pedro, no mês de Julho e Agosto. Após uma pesquisa de sequências homólogas utilizando a ferramenta bioinformática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi possível estabelecer homologia (identidade entre sequências) entre a putativa sequência *mcyA* amplificada e o gene *mcyA* de *Microcystis* (Tabela 15).

Tabela 15. Resultados da pesquisa de sequências homólogas por BLAST, do putativo gene *mcyA*, detectado na Albufeira S. Pedro (SP).

Amostra	E-value	% Identidade	Número de acesso
Julho	SP1 8,00E-111	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIBR18 CP086723.1
	SP2 8,00E-111	99,56	
Agosto	SP1 5,00E-103	100	
	SP2 8,00E-106	100	
Fragmento de gene sequenciado	<i>mcy A</i> geral	CD1F AAAATTAAAAGCCGTATCAAA CD1R AAAAGTGTTTATTAGCGGCTCAT	

4.2. Análise química

Após o processamento das amostras ambientais que deram origem às frações intracelular (biomassa filtrada) e extracelular (água filtrada), procedeu-se à sua análise química através de LC-MS, com o analisador de massas TQ. Numa primeira abordagem foi aplicado um método de rastreio de várias cianotoxinas. Numa segunda abordagem, procedeu-se à detecção e quantificação da toxina MC-LR. Para as duas abordagens, utilizaram-se diferentes métodos de análise por MS.

Como referido em **3.5.4.a)**, para identificar os compostos e validar a sua detecção é necessário conhecer o m/z (massa da partícula sobre a sua carga elétrica) do composto protonado, o TR nas condições cromatográficas específicas, e o espectro de fragmentos resultante da etapa de dissociação por colisão induzida (CID). Com o intuito de ilustrar este processo de detecção (Fig. 22), estão presentes os cromatogramas de uma das amostras ambientais (SP3 de Julho), onde foi detectada MC-LR, com a informação do tempo de retenção (RT) e o m/z da molécula, e as respectivas transições para os fragmentos (iões-filho) resultantes da colisão induzida e que identificam a molécula.

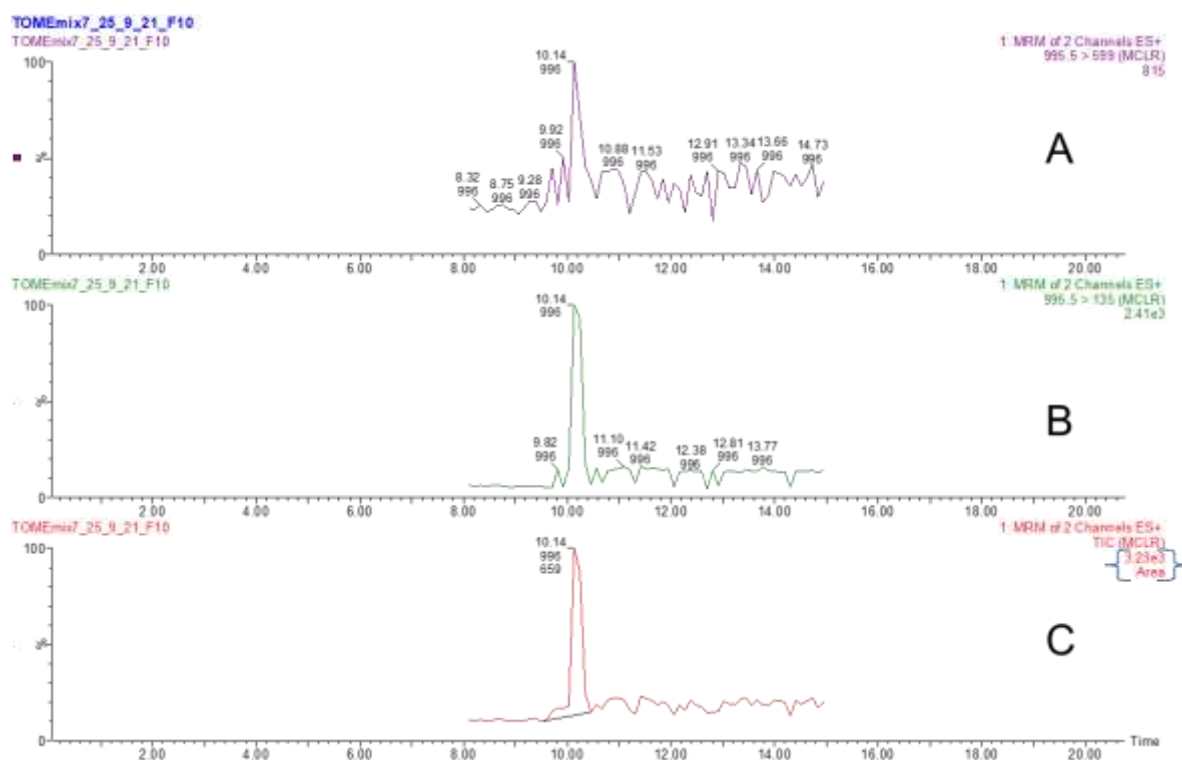


Figura 22. Cromatogramas MRM e respectivas transições de MC-LR, na amostra SP3 de Julho.

A - Cromatograma de iões extraídos (XIC) da transição 995,5 > 599

B - Cromatograma de iões extraídos (XIC) da transição 995,5 > 135

C - TIC do MRM e indicação a azul da área do pico associado a MC-LR, para quantificação.

Apesar do m/z do TIC corresponder à MC-LR, é necessário a detecção dos fragmentos que identificam a molécula. O fragmento de 135 m/z, por exemplo, corresponde ao aminoácido ADDA. Após identificação da MC-LR pela análise das transições para o RT específico da molécula, como ilustrado na Fig. 23, é registada a área do pico correspondente, obtida no cromatograma, para estimar a sua concentração.

4.2.1. Rastreio de cianotoxinas nas amostras ambientais

Inicialmente foi realizada uma pesquisa múltipla a 6 cianotoxinas (MC-LR,-YR,-RR, CYN, SAX, e ANA) em simultâneo, em todas as amostras ambientais obtidas (Tabela 16). O aminoácido fenilalanina (PHE), que também aparece no cromatograma da solução-padrão constituído por uma mistura das 6 cianotoxinas (em Anexo: Informação Suplementar 2), atua como controlo para a presença de ANA, uma vez que apresentam o mesmo m/z mas RT's diferentes.

Tabela 16. Detecção das cianotoxinas MC-LR,-YR,-RR, CYN, SAX, e ANA, fração intracelular das amostras ambientais. X – detecção da toxina.

		10.14	10.10	9.85	4.16	3.07	4.97	TR (min)
		MC-LR	MC-YR	MC-RR	CYN	SAX	ANA	Toxina
Filtrado								
Julho	SP1	X	X	X				
	SP2		X	X				
	SP3							
	M1	X	X					
	M2		X					
	P1							
	P2		X					
	P3		X					
Agosto	SP1	X						
	SP2			X				
	SP3			X				
	M1							
	M2	X						
	P1							
	P2							
	P3							
Setembro	SP1							
	SP2							
	SP3							
	M1							
	M2							
	P1							
	P2							
	P3							

Uma vez que não se detectou nenhuma cianotoxina na fração aquosa (água filtrada), apenas são apresentados os resultados relativos à fração intracelular, constituída pela biomassa retida nos filtros, aquando do processo de filtração da amostra ambiental.

Dado que apenas foram detectadas MCs nas amostras ambientais, por ser a mais perigosa (tóxica) das 3 variantes detectadas, e por limitação de tempo e falta de material de referência para as outras variantes químicas, procedeu-se apenas, de seguida, ao desenvolvimento e validação do método quantitativo para a variante MC-LR.

4.2.2 Quantificação de MC-LR

4.2.2.1 Validação de métodos

Para a validação de métodos a utilizar na quantificação de MC-LR, utilizou-se como material de referência a biomassa de *Microcystis aeruginosa* (LEGE 00063) que apresenta uma concentração de MC-LR por unidade de biomassa de 26,92 µg/g.

4.2.2.1.a) Validação do método EFS

De forma a validar o método EFS, obteve-se uma reta de recuperação (Fig. 23). Os valores de recuperação variaram entre os 75-99%, com um valor médio de 85,95 %. Sendo as taxas de recuperação bastante razoáveis, o método foi aceite e considerado apropriado para a análise de MC-LR.

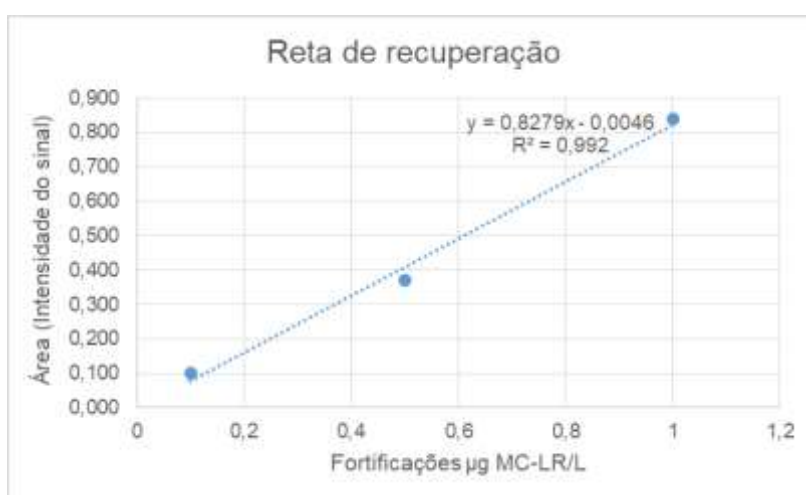


Figura 23. Reta de recuperação de MC-LR (µg/L) após extração em fase sólida (EFS).

4.2.2.2. LC-MS e quantificação de MC-LR

Para a quantificação de MC-LR nas amostras ambientais obteve-se inicialmente uma reta de calibração (Fig. 24). Para esse efeito registaram-se as áreas dos picos cromatográficos, correspondentes à molécula ionizada, dos duplicados de 7 diluições da solução-padrão de MC-LR e de um controlo negativo (branco). O LD e LQ do aparelho foram respectivamente 0,013 ng/L e 0,04 ng/L. A sensibilidade foi alta como se pode observar pelo elevado valor do declive (8027,6) e do limite de detecção. O coeficiente de determinação (R^2) tem também um valor adequado ($0,9991 > 0,998$). Os coeficientes de variação também não ultrapassaram os 10%, o que revela a precisão do aparelho.

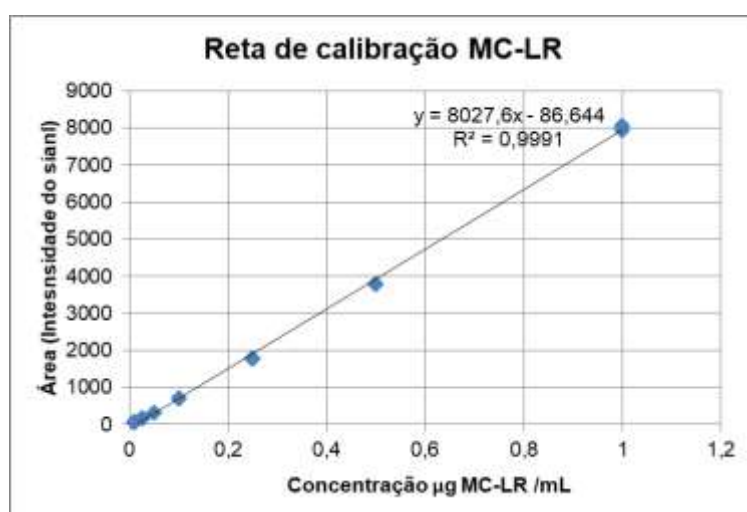


Figura 24. Reta de calibração de MC-LR em MeOH aquoso (50%) com 0,1% de ácido fórmico.

O método foi de seguida aplicado às amostras ambientais (fracções aquosas e intracelulares). Os resultados obtidos para as concentrações de MC-LR nas amostras ambientais encontram-se na Tabela 17. A fração aquosa foi sujeita a 2 processamentos diferentes (EFS e liofilização), mas foi a partir do método EFS que se obtiveram os valores mais elevados em todas as amostras ambientais, por comparação com a componente extracelular liofilizada. Tendo em conta a dificuldade na análise das amostras liofilizadas, apenas foram considerados os valores obtidos por EFS, juntamente com os valores da fração intracelular, para o cálculo da concentração da toxina na amostra ambiental.

Tabela 17. Concentrações da toxina MC-LR ($\mu\text{g/L}$) nas amostras ambientais

Concentração $\mu\text{g MC-LR/L}$									
Amostra	S. Pedro			Magra		Pisão			
Mês	SP1	SP2	SP3	M1	M2	P1	P2	P3	
Julho	0,038	0,055	0,036	0,038	0,029	0,022	0,015	0,018	Extracelular
	0,003	0,054	0,000	0,000	0,005	0,000	0,003	0,000	Intracelular
	0,041	0,109	0,036	0,038	0,034	0,022	0,018	0,018	Total
Agosto	0,055	0,039	0,042	0,036	0,044	0,012	0,018	0,013	Extracelular
	0,010	0,029	0,002	0,016	0,009	0,003	0,003	0,003	Intracelular
	0,058	0,068	0,053	0,052	0,053	0,015	0,020	0,016	Total
Setembro	0,030	0,015	0,027	0,019	0,023	0,013	0,019	0,012	Extracelular
	0,000	0,000	0,003	0,000	0,004	0,003	0,007	0,003	Intracelular
	0,030	0,015	0,030	0,019	0,027	0,016	0,026	0,014	Total

Pela análise dos valores totais na tabela constata-se que os valores mais elevados de toxina se registaram na albufeira de S. Pedro (0,109 $\mu\text{g/L}$), seguindo-se a albufeira da Magra (0,053 $\mu\text{g/L}$), e por último Pisão (0,026 $\mu\text{g/L}$). Relativamente aos meses de amostragem, embora Julho apresente o valor mais elevado em SP2 (0,109 $\mu\text{g/L}$), é em Agosto que se regista o maior número de valores totais mais elevados (SP1 - 0,058 $\mu\text{g/L}$; SP3 - 0,053 $\mu\text{g/L}$; M1 - 0,052 $\mu\text{g/L}$; M2 - 0,053 $\mu\text{g/L}$). Por sua vez Setembro tem os valores mais baixos de forma geral.

Considerando os valores parciais da fração intracelular que varia entre 0 e 49 % da concentração total de toxina na amostra ambiental e da fração extracelular cujos valores variam entre 51 e 100%, depreende-se que a toxina encontra-se maioritariamente na fração extracelular e que a análise desta fração é prioritária na monitorização destas toxinas nestas amostras ambientais. O ponto SP2 constitui um caso particular quanto aos valores parciais, uma vez que, tanto em Julho como Agosto, os 2 parciais apresentam valores muito próximos.

5. Discussão

A escolha dos meses de verão (Julho, Agosto e Setembro), para a realização das campanhas de amostragem na região do Alentejo, é sustentada por estudos anteriores (Galvão et al., 2008; Ruiz et al., 2013), que comprovam a existência de picos de maior abundância de cianobactérias durante o período estival, bem como por dados do fitoplâncton cedidos pela EDIA, relativos aos anos 2012 a 2018. Uma análise destes dados por Silva et al. (2020) permitiu perceber que os meses de verão apresentam maior abundância e diversidade de cianobactérias nas albufeiras do Alqueva. Com recurso à análise estatística das correspondências canónicas, foi possível inferir que a temperatura é a variável mais importante nos gradientes que definem a abundância dos vários grupos de cianobactérias, como já constatado por Willis et al. (2019). Silva et al. (2020) refere também o forte carácter sazonal desta variável e a sua correlação com a radiação solar, por sua vez altamente determinante no aumento de atividade das cianobactérias.

A aplicação de métodos moleculares, na deteção de genes relacionados com a presença de cianobactérias e produção de MCs, é frequente na análise e caracterização das comunidades microbianas (presença de cianobactérias) e na presença de cianobactérias tóxicas na água. O DNA extraído da biomassa, obtida nas amostras ambientais, é sujeito a PCR, que amplifica fragmentos de genes específicos conforme os *primers* utilizados. A elevada especificidade dos *primers* desenvolvidos permite-nos confirmar a presença dos genes, a partir da presença de sequências de DNA com homologia a estes genes. A confirmação (resultado positivo) da presença de sequências acontece quando, na leitura das bandas resultantes da migração do DNA ao longo do gel de agarose, se encontra correspondência entre a coluna referente à amostra e a coluna referente ao controlo positivo (C+), isto é, a banda obtida na coluna C+ é também encontrada na nossa amostra, na mesma latitude – correspondente ao tamanho do fragmento –, cuja leitura é auxiliada pelo *ladder* (Figura 20). Este marcador de massa molecular permite-nos uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA de uma dada amostra. A existência da banda, na posição pré-determinada, revela a amplificação da sequência de gene de interesse através de PCR. A ausência de banda nessa posição revela ausência de amplificação e portanto ausência do fragmento do gene na amostra. Este resultado é corroborado pelo controlo negativo (C-) que deve sempre apresentar ausência de bandas de forma a validar os resultados obtidos no PCR (Figura 20).

No entanto, algumas considerações são necessárias quanto aos resultados PCR. Um resultado negativo no PCR não exclui categoricamente a presença do gene, por muito específicos que sejam os *primers*. A existência de mutações pontuais, no local de

emparelhamento dos *primers*, pode resultar numa ausência de amplificações por PCR (Christiansen et al. 2006). Para além disto, o limite de deteção desta técnica pode tornar impossível a amplificação dos genes, na presença de uma baixa concentração de cianobactérias.

Numa 1ª fase, os genes marcadores da presença de cianobactérias (16S rRNA e operão de ficocianina) foram encontrados em 16 das 26 amostras. A não deteção de DNA de cianobactérias nalgumas amostras (ausência de genes marcadores), pode dever-se à reduzida quantidade de DNA cianobacteriano obtido em algumas das amostras. Os resultados negativos podem ainda estar relacionados com uma distribuição heterogénea das cianobactérias na albufeira, resultando numa amostragem incompleta. Um estudo de Valério et al. (2008), que acompanhou albufeiras de água doce do Alentejo – também pertencentes atualmente ao sistema Alqueva –, entre Maio e Dezembro de 2005, e Abril e Julho de 2006, utilizadas como fonte de água para consumo humano e rega, revelou que as cianobactérias são os organismos fitoplanctónicos dominantes, ocorrendo em 52 das 53 amostras ambientais analisadas.

Valério et al. (2008) constataram ainda que *Microcystis* constituiu o género predominante, correspondendo a 30 % da densidade total de cianobactérias, e que em duas das albufeiras tinham sido identificados florescências monoespecíficas de *Microcystis aeruginosa*. Salvaguarda-se contudo, que foi já registada a presença de outras espécies pertencentes a este grupo, nas águas destas albufeiras, nomeadamente *Microcystis incerta* e *Microcystis wesenbergii* (Galvão et al. 2008). Os dados de Valério et al. (2009) acompanham os resultados obtidos neste trabalho, relativos à presença de *Microcystis* sp. na maior parte das amostras ambientais (tabela 13), confirmada pela deteção do gene 16S rRNA específico para este género.

A análise relativa aos genes que codificam proteínas pertencentes ao complexo microcistina sintetase (*mcy*), responsável pela produção de MCs, tem em conta a prevalência dos genes nas massas de água. Desta forma, um maior número e frequência de genes *mcy* significa maior prevalência destes genes, e sugere maior risco na ocorrência de MCs (Moreira et al. 2020; Mendes, 2017).

Os genes relacionados com a produção de MCs variam entre espécies produtoras e estão organizados no operão *mcy*. Para este estudo foram amplificados, numa primeira abordagem, os genes *mcyA* e *mcyB* usando primers não específicos em termos taxonómicos, e numa segunda abordagem os genes específicos de *Microcystis* sp., *mcyA-E* e *mcyG*. A análise dos dados das tabelas 14 a 16 indica uma maior prevalência de genes *mcy* nas albufeiras de S. Pedro e Magra, embora Pisão também registe elevada

prevalência no mês de Setembro. Estes dados sugerem forte potencial de ocorrência de *Microcystis* tóxica, face aos resultados positivos para os genes *mcyB-G*.

A utilização dos *primers* gerais para os genes *mcyA* e *mcyB* serve para inferir o potencial biossintético de MCs em toda a comunidade de cianobactérias, e assim inferir também sobre a proveniência desse potencial. Deste ponto de vista, os dados sugerem presença de outros géneros produtores de MCs, uma vez que não se detectou o gene *mcyA* específico para *Microcystis*, mas sim sequências homólogas, que possivelmente pertencem a outros géneros. Esta hipótese é coerente com outros estudos que reportam que outras espécies, que co-ocorrem com *M. aeruginosa*, são potencialmente produtoras desta cianotoxina, nomeadamente *Anabaena* spp. (Vasconcelos, 1994; Valério et al., 2008; Galvão et al., 2008) e *Planktothrix rubescens* (Galvão et al., 2008; Valério et al., 2008; Paulino, 2009).

Pela análise molecular constata-se ausência do total potencial da cadeia de biossíntese para a produção de MCs, em espécies *Microcystis* spp., tendo em conta que nem todos os genes *mcy* foram detectados, com os pares de *primers* utilizados no estudo. Moreira et al. (2020) reporta que os marcadores genéticos *mcy* apresentam maior prevalência na zona Norte do que na zona Centro do país, sendo que no Centro do país, a presença de todos os genes *mcy* pesquisados (ABCDEG) apenas ocorreu no mês de Julho, no período de amostragem Abril-Setembro. É de salientar, no entanto, que Moreira et al. (2020) utiliza pares de *primers* específicos de *Microcystis* sp. para o estudo destes genes à excepção de *mcyA*, para o qual utiliza o par de *primers* mais geral, pouco específico para os diferentes grupos taxonómicos (CD1F/CD1R). O motivo para a ausência de deteção, no trabalho realizado, do gene *mcyA*, específico para este género, permanece incerto. Os *primers* desenvolvidos por Tillet et al. (2001) para *mcyA*, específicos de *Microcystis* sp., foram inicialmente testados com estirpes obtidas nas décadas de 50 a 80 do século passado, com origem em outras zonas geográficas, nenhuma destas pertencendo à região Mediterrânica ou Península Ibérica – o país mais próximo com ocorrência de algumas destas estirpes foi a Holanda –. A confirmação da presença do gene *mcyA*, utilizando os *primers* gerais CD1F/CD1R, e por meio de sequenciação dos fragmentos amplificados por PCR, permitiu confirmar a identidade da *M. aeruginosa*, nas águas da albufeira de S. Pedro. Neste sentido, é possível que exista uma falta de especificidade de alguns *primers*, nomeadamente MSF/MSR, para os genes-alvo *mcy*, das estirpes de *Microcystis* que ocorrem em Portugal. Podemos especular a ocorrência de uma evolução no sentido da mutação no local de emparelhamento dos *primers*, resultando numa ausência de amplificações por PCR. De facto, Christiansen et al. (2006) descreveu a ocorrência destas

alterações no conjunto de genes *mcy* de estirpes de *Planktothrix rubescens*, isoladas de diferentes regiões. Por outro lado, nem todas as espécies *Microcystis* spp. têm capacidade de biossíntese de MCs (Valério et al. 2009b). Em Portugal, por exemplo, foram também já isoladas estirpes da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, que não apresentaram capacidade toxigénica (Saker et al., 2003). Note-se que esta espécie tem sido descrita noutros países como produtora de cianotoxinas, nomeadamente MCs e CYN (Saker et al., 2003).

A identificação de *Microcystis* acompanha o estudo de Valério et al. (2009a) que, pela caracterização morfológica e molecular das comunidades de cianobactérias de 21 albufeiras do Alentejo, demonstrou que a espécie *M. aeruginosa*, pertencente a este género, representava 44% das estirpes isoladas. Neste estudo filogenético são utilizados *primers* para os genes 16S rRNA e *rpoC1* (subunidade de RNA polimerase dependente de DNA). Noutro estudo de Valério et al. (2009b), numa continuação da análise do potencial de biossíntese de 124 estirpes de cianobactérias, isoladas das águas de albufeiras do Alentejo, 26 estirpes produziam MCs, sendo que 25 das quais eram *M. aeruginosa*. No estudo de Galvão et al. (2008) é a biomassa desta espécie que apresenta a melhor correlação positiva com o nível de MCs, e não a biomassa total de cianobactérias (também inferido por Sabart et al. 2015). Este estudo revela ainda que em 23% das amostras foram detectadas MCs, maioritariamente associadas à espécie *M. aeruginosa*.

O recurso aos tipos de análises molecular e química permite observar a existência de alguma correlação entre os dados. No estudo de Moreira et al. (2020) reporta-se uma elevada percentagem de correlação entre os amplificados positivos e a presença de cianotoxinas. Ainda neste estudo, no caso das MCs, a percentagem de correlação foi de 78% entre as duas técnicas, e concluindo-se por isso que em Portugal, dados os valores encontrados no Norte e Centro do país, a aplicação de vigilância molecular era eficaz relativamente à presença de cianobactérias produtoras de toxinas e presença de cianotoxinas.

Segundo a tabela de risco de Silva et al. (2020), Pisão apresentava maior risco de desenvolver florescências tóxicas, seguido de Magra e S. Pedro com um risco intermédio. Considerando que o trabalho realizado neste estudo se circunscreve aos meses de Verão de 2020, a análise molecular sugere que esse nível de risco pode ter outra distribuição, uma vez que é na albufeira de Pisão (subsistema Alqueva) que se verifica menor ocorrência de cianobactérias, atendendo à baixa deteção dos genes 16S rRNA e operação de ficocianina. Curiosamente, na albufeira Magra verificaram-se resultados distintos dos da albufeira S. Pedro, apesar da Magra ser recipiente da água de S. Pedro, pertencendo

ambas as albufeiras ao subsistema Pedrógão. A análise química acompanha os resultados moleculares, quer pela deteção mais frequente e de maior número de variantes de MCs em S. Pedro, seguida da Magra (na pesquisa múltipla, apenas em Julho são encontradas cianotoxinas em Pisão), quer pelos valores de concentração de MC-LR nas várias albufeiras. Numa comparação entre albufeiras, em cada mês, esses valores são sempre superiores em S. Pedro, ocorrendo em Julho (em SP2) um valor de MC-LR intracelular do qual se deduz a presença de cianobactérias tóxicas. A albufeira Magra apresenta as concentrações de MC-LR mais próximas de S. Pedro, e Pisão apresenta os valores mais baixos. Coligindo estes resultados, o nível de risco de ocorrência de florescências tóxicas teria a ordem S. Pedro > Magra > Pisão.

Salienta-se que o método de amostragem é importante e deverá ser considerado, na explicação dos resultados deste e de outros estudos. Algumas espécies de cianobactérias, tais como a potencialmente produtora de MCs *Planktothrix rubescens* (Paulino et al., 2009), não formam florescências superficiais, uma vez que estão adaptadas a zonas de baixa intensidade luminosa na coluna de água (Zotina et al., 2003), pelo que estas cianobactérias poderão ocorrer a níveis mais profundos nas massas de água. Neste sentido, espécies com estas características ecológicas podem ter escapado à amostragem, afectando os resultados (sub-avaliação da toxicidade da água). A frequência e o tipo de amostragem (superficial, de profundidade ou composta) são aspectos essenciais a considerar no estabelecimento de programas de monitorização de cianobactérias e toxinas associadas, e na interpretação de resultados (Dias, 2009).

A análise de Silva et al. (2020) sugere uma forte correlação positiva entre a temperatura e a abundância de *Cylindrospermopsis raciborskii*, indicando o forte carácter sazonal da abundância desta espécie. As alterações climáticas atuais, que provocam um aumento global da temperatura, podem estimular o crescimento de espécies de cianobactérias tóxicas (Moreira et al 2020). Daqui se sugere um trabalho futuro de monitorização que contemple a presença do género *Cylindrospermopsis*, bem como os genes responsáveis pela biossíntese de cilindrospermopsina, a cianotoxina associada a este género.

De forma a aproveitar as potencialidades e a eficiência da técnica de LC-MS, têm sido desenvolvidos métodos e protocolos que permitem obter informação de múltiplas toxinas numa mesma análise. Várias dificuldades são no entanto apontadas no desenvolvimento destes estudos de monitorização, como por exemplo a análise de moléculas hidrofílicas e de baixa massa molecular a níveis vestigiais, em matrizes ambientais complexas (Al-Sammak et al. 2014). Apesar desta problemática se enquadrar no estudo realizado, LC-

MS é, no entanto, a técnica com maior sensibilidade e especificidade na detecção de analitos em concentrações vestigiais em amostras ambientais.

Numa 1ª fase deste estudo foi aplicado um método de rastreio simultâneo de várias cianotoxinas. Considerando a capacidade biossintética encontrada (análise molecular) e a identificação de *M. aeruginosa*, a detecção das MCs pesquisadas (MC-LR, -YR, -RR) nas amostras ambientais era esperada e é consistente com os resultados de Valério et al. (2009b). Neste estudo, o cultivo de isolados de estirpes produtoras de MCs desta espécie, provenientes de albufeiras da região do Alentejo, revelou que 42% produziam mais do que uma variante, e que as variantes detectadas eram: MC-LR (69%), MC-RR (62%) e MC-YR (31%). No estudo de Vasconcelos et al. (1995), a caracterização das MCs produzidas por 10 estirpes de *M. aeruginosa*, isoladas de albufeiras e lagoas do Norte e Centro do país em 1991, confirmou que a variante MC-LR era dominante, sendo produzida por todas as estirpes e correspondendo entre 44 a 100% da concentração total de MCs. A variante MC-YR só foi detectada em estirpes isoladas de albufeiras (20% das estirpes) e a sua concentração representou entre 11.6 e 14.7% da concentração total de MCs, enquanto a variante MC-RR foi detectada só numa estirpe (10%), mas em quantidades relativamente elevadas (33% da concentração total de MCs). Noutro estudo de Vasconcelos et al. (1996), a caracterização de MCs em amostras ambientais colhidas entre 1989 e 1992 nos rios Minho e Guadiana, nas Lagoas de Mira e Barrinha de Mira e nas albufeiras de Crestuma, Torrão, Carrapatelo, Agueira e Vale das Bicas, confirmaram que estas são as toxinas predominantes e que a variante MC-LR é a mais comum, com uma proporção de 45,5 a 99,8%, relativamente ao conteúdo total de MCs, sendo também frequentes as variantes MC-RR e MC-YR. Este estudo salienta a predominância das MCs em Portugal, e particularmente de MC-LR.

Numa 2ª fase do estudo, procedeu-se à quantificação de MC-LR, a variante estrutural mais tóxica das MCs. Os resultados apresentados na Tabela 11 sugerem a presença de concentrações de MC-LR bastante reduzidas face aos limites de referência para consumo humano (1 µg/L MC-LR no caso de consumo vitalício e 12 µg/L MC-LR para exposição de curta-duração), mas persistentes. De acordo com estudos anteriores sobre massas de água da mesma região (Valério et al., 2008; Galvão et al, 2008), esperava-se encontrar MC-LR, uma vez que é reportada uma predominância de *Microcystis* sp. nas albufeiras desta região, embora como referido nem todas as espécies possuam capacidade de biossíntese de MCs. Galvão et al. (2008) refere concentrações de MCs que atingiram 0,5 µg/L, na albufeira de Odivelas, em Setembro de 2005, associadas a uma elevada densidade de *Microcystis aeruginosa*. Num estudo de Moreira et al. (2020), que abrangeu a zona Norte e Centro do país, foi reportado uma prevalência de MCs em todos os

ecossistemas analisados. No entanto, estes autores reportam concentrações de MCs acima do valor de referência para águas de consumo (1 µg/L). Em 48% das amostras encontraram-se valores de MCs entre 1.6 e 18.8 µg/L, em pelo menos um dos meses de amostragem, em todos os locais amostrados. Porém, convém salientar que este estudo calcula os valores de concentração totais das MCs com base no método ELISA, para o aminoácido específico destas cianotoxinas ADDA. Para além da ausência de especificidade na identificação das variantes químicas, este método é também susceptível a falsos positivos. Apesar dos reduzidos valores de concentração de MC-LR, neste trabalho, a sua presença é constante nas albufeiras estudadas, o que também está de acordo com os estudos anteriores já referidos (Galvão et al. 2008; Valério et al. 2009b). Não obstante, este baixo mas persistente teor de MCs, registado no trabalho realizado, poderá acarretar um risco de exposição crónica.

A qualidade da água pode também ser afectada por outros metabolitos secundários. Para além das cianotoxinas reguladas, mais de 2000 metabolitos secundários de cianobactérias foram já identificados. Alguns deles podem ocorrer em simultâneo com cianotoxinas, por cianobactérias formadoras de florescências (Jones et al. 2020). Entre estes metabolitos, e especificamente produzidos por cianobactérias produtoras de MCs, encontram-se as cianopeptolinas, anabaenopeptinas, aeruginosinas, e microgininas (Welker et al. 2006; Martins et al. 2009). Compostos destas classes revelaram toxicidade aguda em zooplâncton ($LC_{50} < 10$ mg/L) e inibição de várias enzimas ($IC_{50} < 30$ µg/L, frequentemente < 8 µg/L) (Janssen, 2019). Ainda é necessário reunir mais informação sobre o seu modo de acção e a sua toxicidade, além de não existirem ainda padrões analíticos de referência desenvolvidos para auxiliar na quantificação destes cianopéptidos menos conhecidos. A percepção destes cianopéptidos pode contribuir com informação para melhorar a monitorização de massas de água, assim como já sucede com outros parâmetros como a clorofila-a e a abundância celular. Todas estas medidas contribuem para a detecção precoce de florescências e para o desenvolvimento de estratégias de gestão da água (Filatova et al. 2021).

Apesar das cianotoxinas detectadas e dos valores de MC-LR quantificados na água destas albufeiras do Alqueva, o nível de toxicidade encontra-se abaixo dos limites regulamentados para águas de consumo (vitalício – 1 µg/L; curto prazo – 12 µg/L) ou de uso recreativo (24 µg/L). No entanto, foi encontrado um forte potencial de ocorrência de *Microcystis* tóxica, o que representa um risco para a utilização destas águas, nomeadamente na agricultura. A irrigação de campos agrícolas com águas contaminadas conduz à contaminação de solos e culturas agrícolas. Neste caso em concreto, os valores encontrados não representam

risco aparente, contudo outros fatores intervêm na qualidade da água, nomeadamente outras MCs. No documento da EDIA (2017) é referido que as albufeiras sujeitas a avaliação da qualidade da água para rega seguem o anexo XVI do Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de Agosto. Dos vários parâmetros indicados no anexo XVI, o documento da EDIA reporta diversas ocasiões em que os valores de coliformes fecais, cloretos e pH não cumprem os valores recomendados, em algumas albufeiras. Os elevados valores de pH estão associados com o aumento da atividade biológica das algas durante primavera e verão. Os valores de coliformes fecais, embora pontuais, indicam contaminação microbiológica das águas. Quanto às elevadas concentrações de cloretos, a sua alegada origem segundo a EDIA (2017) “pode estar na drenagem natural dos terrenos ou nas escorrências agrícolas”. Este contaminante pode também afetar a estrutura do solo e originar problemas de corrosão em tubagens metálicas (EDIA, 2017). O controlo destes parâmetros requer um acompanhamento mais frequente e mais exigente quando o objetivo é produzir água para consumo, para além dos vários tipos de tratamento (físico, químico, entre outros).

Embora os valores de MC-LR encontrados sejam reduzidos, a existência de MCs nestas águas sugerem que esta análise, se bem que provisória, é importante para a avaliação da qualidade da água, dado o potencial de ocorrência de cianobactérias tóxicas.

6. Conclusão

Este trabalho combina dados de análise molecular e química, de forma a complementar informações e assim avaliar toxicidade das águas das albufeiras do Alqueva. Os dados obtidos da análise molecular sugerem a presença de *Microcystis* sp. e de genes relacionados com a produção de MCs, nas águas das albufeiras de S. Pedro, Magra e Pisão. A ausência de amplificação com o par de *primers* MSF/MSR (*mcyA* de *Microcystis* sp.) e a confirmação da presença de *Microcystis* sp. pelo par de *primers* CD1F/CD1R (*mcyA* sem especificidade taxonómica) sugere uma não correspondência do primeiro par de *primers* com as espécies *Microcystis* spp. presentes nestas albufeiras. O método SPE revelou-se útil pela maior eficácia na extração de MCs. O método analítico LC-MS permitiu, por outro lado, confirmar a presença de MCs na água. Os dados obtidos da análise química revelam a presença de MC-LR em todas as albufeiras, em todos os meses, embora com valores abaixo do limite estabelecido para água de consumo (1 µg MC-LR/L). É de salientar também a co-ocorrência de múltiplas microcistinas (MC-LR,-YR,-RR) no mês de Julho e Agosto, nas albufeiras de S. Pedro e Magra. Os dados sugerem a existência de estirpes produtoras de MCs, nomeadamente pertencentes ao género *Microcystis*, nas águas das albufeiras estudadas.

A acumulação de água nas albufeiras estudadas serve os propósitos de produção de eletricidade e uso agrícola. Apesar da inexistência de limites regulamentados para as cianotoxinas em águas de irrigação, registou-se uma ausência de concentrações de MC-LR acima do limite regulamentar de 1 µg/L, para águas potáveis. Neste sentido não será expectável a ocorrência de danos (contaminação dos solos) para o ambiente e para a produção agrícola, decorrente do uso desta água. Contudo, é importante referir que outros contaminantes podem ter um impacto negativo. A análise de risco deve considerar os múltiplos tipos de contaminantes, nomeadamente os encontrados nas albufeiras do Alqueva, como coliformes fecais, os cloretos, e os elevados níveis de pH. Uma vez que as cianobactérias e as cianotoxinas são contaminantes recorrentes nas albufeiras do Alqueva, o exercício de monitorização é necessário para seguir os níveis de diferentes cianotoxinas e a sua dinâmica, particularmente em períodos de seca severa e temperaturas extremas, tão características desta região, e que podem conduzir a um aumento significativo destes poluentes na água.

7. Referências

- Al-Sammak, M.A., Hoagland, K.D., Cassada, D., Snow, D.D. (2014). Co-occurrence of the Cyanotoxins BMAA, DABA and Anatoxin-a in Nebraska Reservoirs, Fish, and Aquatic Plants. *Toxins*, 6, 488-508. <https://doi.org/10.3390/toxins6020488>
- Bittencourt-Oliveira, M.C., Cordeiro-Araújo, M.K., Chia, M.A., Arruda-Neto, J.D.T., de Oliveira, Ê.T., dos Santos, F. (2016). Lettuce irrigated with contaminated water: Photosynthetic effects, antioxidative response and bioaccumulation of microcystin congeners. *Ecotoxicology and environmental safety*, 128, 83-90.
- Campos, A., Redouane, E. M., Freitas, M., Amaral, S., Azevedo, T., Loss, L., Máthé, C., Mohamed, Z., Oudra, B., Vasconcelos, V. (2021). Impacts of Microcystins on Morphological and Physiological Parameters of Agricultural Plants: A Review. *Plants*, 10(4), 639.
- Carmichael, W. W. (1997). The cyanotoxins. In *Advances in botanical research*, 27, 211-256. Academic Press.
- Cech, N.B., Enke, C.G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass spectrometry reviews*, 20, 362-387.
- Chorus, I., Welker, M.; eds. (2021). Toxic Cyanobacteria in Water, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton (FL), on behalf of the World Health Organization, Geneva, CH.
- Christian, G.D. (2014). Chapter 22: Mass Spectrometry. In *Analytical chemistry*. Seventh edition / University of Washington, Purnendu K. (Sandy) Dasgupta, University of Texas at Arlington, Kevin A. Schug, University of Texas at Arlington.
- Christiansen, G., Kurmayer, R., Liu, Q., Börner, T. (2006). Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 117-123.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S., Beattie, K.A., (1999). Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*, 37, 1181-1185.
- Dias, E. (2009). Avaliação do potencial cancerígeno de microcistinas (cianotoxinas). Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Doutor em Farmácia. Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa. Portugal

- Falconer, I.R., Humpage, A.R. (2005). Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2, 43–50.
- Fawell, J. K, Mitchell, R.E., Hill, R.E., Everett, D.J. (1999). The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II. Anatoxin-a. *Human and Experimental Toxicology*, 18(3), 168–73.
- Filatova, D., Jones, M. R., Haley, J. A., Núñez, O., Farré, M., Janssen, E. M. L. (2021). Cyanobacteria and their secondary metabolites in three freshwater reservoirs in the United Kingdom. *Environmental Sciences Europe*, 33(1), 1-11.
- Galvão, H.M., Reis, M.P., Valério, E., Domingues, R.B, Costa, C, Lourenço, D., Condinho, S., Miguel, R., Barbosa, A., Gago, C., Faria, N., Paulino, S., Pereira, P. (2008). Cyanobacterial blooms in natural waters in southern Portugal: a water management perspective. *Aquatic Microbial Ecology*, 53, 129-140.
- Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K., Börner, T. (2003). PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of microbiology*, 180(6), 402-410.
- Ibelings, B.W., Backer, L.C., Kardinaal, W.E., Chorus, I. (2015). Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe. *Harmful Algae*, 49, 63-74. doi: 10.1016/j.hal.2014.10.002
- INAG, I.P. (2009). Manual para a avaliação da qualidade biológica da água. Protocolo de amostragem e análise para o Fitoplâncton. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I.P.
- Janssen, E.M.L. (2019). Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Research*, 151, 488–499.
- Jones, M.R., Pinto, E., Torres, M.A., Dörr, F., Mazur-Marzec, H., Szubert, K., Tartagli-one, L., Dell'Aversano, C., Miles, C.O., Beach, D.G., McCarron, P., Sivonen, K., Fewer, D.P., Jokela, J., Janssen, E.M.L. (2020). Comprehensive database of secondary metabolites from cyanobacteria. *bioRxiv*, 78(7).
- Lee, S., Kim, J., & Lee, J. (2021). Colonization of toxic cyanobacteria on the surface and inside of leafy green: A hidden source of cyanotoxin production and exposure. *Food Microbiology*, 94, 103655.

Li, X., Dreher, T.W., Li, R. (2016). An overview of diversity, occurrence, genetics and toxin production of bloom-forming *Dolichospermum* (*Anabaena*) species. *Harmful Algae*, 54, 54-68.

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

Martins, J., Saker, M.L., Moreira, C., Welker, M., Fastner, J., Vasconcelos, V.M. (2009) Peptide diversity in strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Portuguese water supplies. *Applied Microbiology Biotechnology*, 82, 951–961.

Massas de Água do Alqueva...uma nova realidade territorial – 1ª fase (2017). Empresa de Desenvolvimento e Infra-estruturas do Alqueva (EDIA). Direção de Engenharia, Ambiente e Planeamento. Departamento de Ambiente e Ordenamento do Território. Beja. Portugal.

Mazmouz, R., Chapuis-Hugon, F., Mann, S., Pichon, V., Méjean, A., Ploux, O. (2010). Biosynthesis of Cylindrospermopsin and 7-Epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. Strain PCC 6506: Identification of the *cyr* Gene Cluster and Toxin Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4943-9. doi:10.1128/AEM.00717-10.

Mendes, R. (2017). Molecular monitoring of cyanobacteria and their related toxins in Portuguese freshwater systems. Dissertação submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar para obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar. Universidade do Porto. Portugal

Mikalsen, B., Boison, G., Skulberg, O. M., Fastner, J., Davies, W., Gabrielsen, T. M., Rudi, K., Jakobsen, K. S. (2003). Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcvABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2774-2785.

Moreira, C., Campos, A., Martins, J.C., Vasconcelos, V., Antunes, A. (2021). Review on Cyanobacterial Studies in Portugal: Current Impacts and Research Needs. *Applied Sciences*, 11, 4355. doi: 10.3390/app11104355

Moreira, C., Gomes, C., Vasconcelos, V., Antunes, A. (2018). Monitoring the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* - A case of dispersion into northern Portuguese freshwater systems. In: *Harmful Algae - From ecosystems to socioecosystems*.

Nantes. International Society for the Study of Harmful Algae 2020. In Proceedings of the 18th Intl. Conf. on Harmful Algae, Nantes, France, 130-134.

Moreira, C., Mendes, R., Azevedo, J., Vasconcelos, V., Antunes, A. (2017). First occurrence of cylindrospermopsin in Portugal: A contribution to its continuous global dispersal. *Toxicon*, 130, 87-90. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.02.024

Nováková, L. (2013). Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography–mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of Chromatography A*, 1292, 25-37.

Oehrle, S. A., B. J. Southwell, J. Westrick. 2010. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon*, 55, 965–72.

Oehrle, S. A., e J. Westrick. 2003. Analysis of various cyanobacterial toxins by LC-MS. *Liquid Chromatography Gas Chromatography North America*, 21(7), 634-40.

Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C. (1992). Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*, 114, 7941–42.

O'neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 14, 313-334. doi: 10.1016/j.hal.2011.10.027

Ouahid, Y., G. Pérez-Silva e F.F. del Campo (2005). Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. *Environmental Toxicology*, 20, 235-242.

Paulino, S., Valério, E., Faria, N., Fastner, J., Welker, M., Tenreiro, R., Pereira, P. (2009). Detection of *Planktothrix rebeszens* (cyanobacteria) associated with microcystin production in a freshwater reservoir. *Hydrobiologia*, 621, 207-211.

Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B. (2010). On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs*, 8(5), 1650–80. doi:10.3390/md8051650

Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araújo, F., Lagos, N., Oshima, Y. (2000). Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*,

isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon*, 38, 1689–1702. doi: 10.1016/S0041-0101(00)00100-8

Preisendorfer, R. W. (1986). Secchi disk science: Visual optics of natural waters 1. *Limnology and oceanography*, 31(5), 909-926.

Ramanan, S., J. Tang, Velayudhan, A. (2000). Isolation and preparative purification of microcystin variants. *Journal of Chromatography A*, 883(1-2), 103-112. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00378-2

Rohrlack, T., Hyenstrand, P. (2007). Fate of intracellular microcystins in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia*, 46, 277-283.

Ruiz, M., Galanti, L., Ruibal, A.L., Rodriguez, M.I., Wunderlin, D.A., Amé, M.V. (2013). First Report of Microcystins and Anatoxin-a Co-occurrence in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina). *Water Air Soil Pollution*, 224(1593). <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1593-2>

Sabart, M., Crenn, K., Perrière, F., Abila, A., Leremboure, M., Colombet, J., Jousse, C., Latour, D. (2015). Co-occurrence of microcystin and anatoxin-a in the freshwater lake Aydat (France): Analytical and molecular approaches during a three-year survey. *Harmful Algae*, 48, 12-20.

Seger, C. (2012). Usage and limitations of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) in clinical routine laboratories. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 162(21), 499-504.

Silva, I., Freitas, M. Campos, A., Barreiro, A. (2020). Monitorização de parâmetros físico-químicos e sua influência na proliferação de cianobactérias: caso prático das albufeiras do Alqueva. Projeto de Investigação em Saúde Ambiental entregue à Escola Superior de Saúde do Porto para obtenção do grau de licenciado. Departamento de Saúde Ambiental. Instituto Politécnico do Porto. Portugal.

Skoog, Douglas A., West, Donald M., Holler, F. James, Crouch, Stanley R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (Ed. 9th). Singapore: Cengage Learning.

Tillett, D., Parker, D. L., & Neilan, B. A. (2001). Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), 2810-2818.

van den Ouweland, J. M., & Kema, I. P. (2012). The role of liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Journal of chromatography B*, 883, 18-32.

Vasconcelos, V. (2006). Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. *Limnetica*, 25, 425-432.

Vasconcelos, V.M. 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese freshwaters. *Archiv für Hydrobiologie*, 130, 439-451.

Vasconcelos, V.M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Namikoshi, M. (1995). Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from portuguese strains of *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend Elekin. *Archiv für Hydrobiologie*, 134, 295–305.

Welker, M., Marsalek, B., Sejnohova, L., von Dohren, H., (2006). Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: toward an understanding of metabolic diversity. *Peptides*, 27(9), 2090-2103.

Welker. M., Bickel. H., Fastner, J. (2002). HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin - opportunities and limits. *Water Research*, 36(18), 4659-4663. doi: 10.1016/s0043-1354(02)00194-x

WHO (2020). Cyanobacterial toxins: microcystins. *Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments*. World Health Organization, Geneva.

WHO. (2020). Cyanobacterial toxins: microcystins. *Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments*. Geneva: World Health Organization. (WHO/HEP/ECH/WSH/2020.6). Licence: CC BY-NCSA 3.0 IGO.

Willis, A., Chuang, A. W., Orr, P. T., Beardall, J., Burford, M. A. (2019). Subtropical freshwater phytoplankton show a greater response to increased temperature than to increased pCO₂. *Harmful Algae*, 90(July), 101705.

Zervou, S.K., Christophoridis, C., Kaloudis, T., Triantis, T.M., Hiskia, A. (2017). New SPE-LC-MS/MS method for simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins. *Journal of Hazardous Materials*, 5, 56–66.

Zotina, T., Köster, O., Jüttner, F. (2003). Photoheterotrophy and light-dependent uptake of organic and organic nitrogenous compounds by *Planktothrix rubescens* under low irradiance. *Freshwater Biology*, 48, 1859–1872.

ANEXOS

Informação Suplementar 1

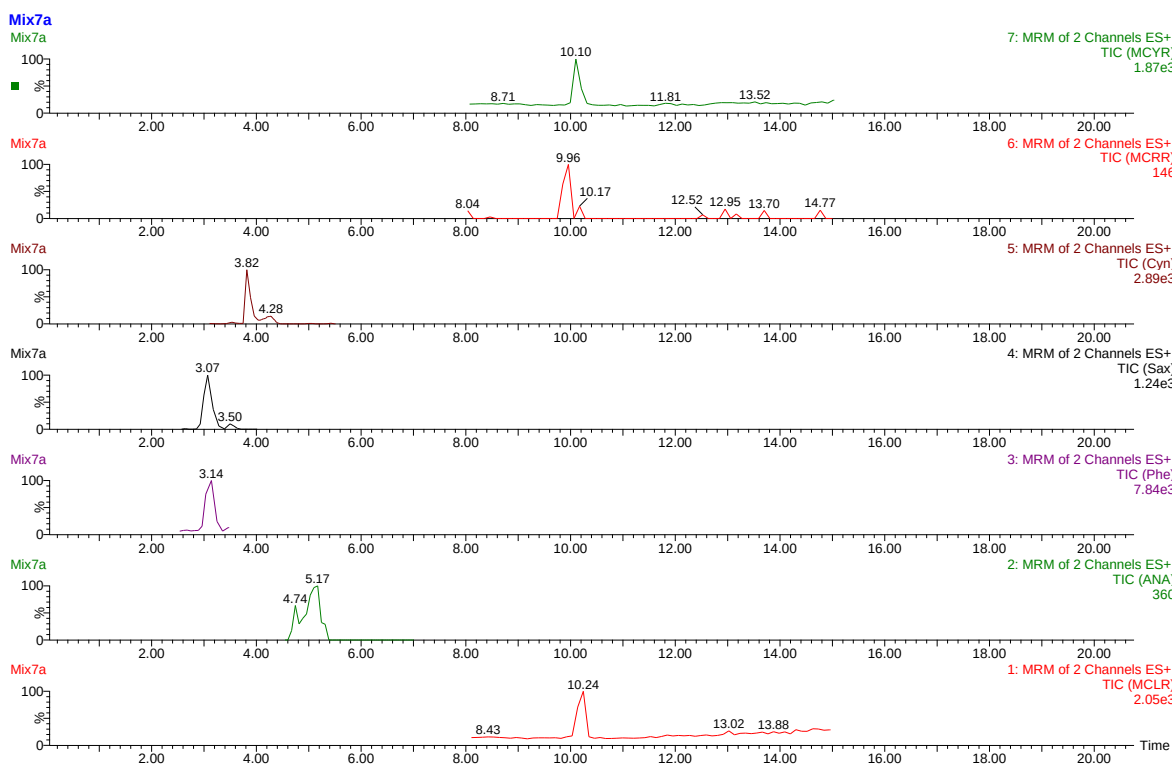


Figura. Cromatogramas MRM da mistura padrão (10 ppb)

Informação Suplementar 2

Informações recolhidas das campanhas de amostragem e posterior processamento das amostras (Localização geográfica, tipo de amostra, parâmetros físico-químicos, informações visuais do local, e processo de filtração)

Parâmetros Julho 2020														
NOTA: Valores in situ registados com uso de sonda, sem conhecimento real da sua calibração. Atenção ao uso destes dados!														
Ponto	Albufeira	Coordenadas GPS	Data colheita	Tipo de amostra	Parâmetros in situ			Data processamento	Volume por filtro / química (mL)	Nº filtros química	Volume por filtro / molecular (mL)	Observações	Observações in situ	
					pH	Temperatura (°C)	Condutividade (µS/cm)							
SP1		38°05'04.7"N 7°46'08.5"W	16.07.2020	Superficial	7,51	27,11	535	17.07.2020	1000	2	800			
SP2	S. Pedro	38°05'11.4"N 7°45'36.7"W	16.07.2020	Superficial	7,50	27,20	538	17.07.2020	1000	2	600			Presença de macroalgas ao longo do ponto de amostragem, especialmente em SP2
SP3		38°05'23.7"N 7°45'10.1"W	16.07.2020	Superficial	7,53	27,20	110	17.07.2020	1000	2	800			
M1	Magra	38°02'58.0"N 7°46'04.8"W	16.07.2020	Superficial	7,58	24,95	542	17.07.2020	1300	2	600			Blooms de macroalgas e/ou ciano nas margens
M2		38°02'43.4"N 7°46'00.8"W	16.07.2020	Superficial	7,68	26,43	545	17.07.2020	2000	1	800			
P1		38°04'43.0"N 7°58'50.6"W	16.07.2020	Superficial	7,63	26,83	568	17.07.2020	1000	2	600			
P2	Pião	38°04'21.7"N 7°58'29.8"W	16.07.2020	Superficial	7,71	27,16	572	17.07.2020	700	3	800			
P3		38°03'48.6"N 7°59'15.9"W	16.07.2020	Superficial	7,75	26,67	570	17.07.2020	1000	2	600			
PN1		38°00'25.9"N 8°04'20.7"W	16.07.2020	Superficial	7,63	27,15	521	17.07.2020	1500	2	600			
PN2		38°00'09.5"N 8°04'25.6"W	16.07.2020	Superficial	7,78	27,47	524	17.07.2020	1500	2	800			

Parâmetros Agosto 2020														
NOTA: Valores in situ registados com uso de sonda a partir de Magra, devido a reset do aparelho. Sem real conhecimento do seu nível de calibração. Necessita confirmação com dados da EDIA														
Ponto	Albufeira	Coordenadas GPS	Ponto de referência	Data colheita	Tipo de amostra	Parâmetros in situ			Data processamento	Volume por filtro / química (mL)	Nº filtros química	Volume por filtro / molecular (mL)	Observações	Observações in situ
						pH	Temperatura (°C)	Condutividade (µS/cm)						
SP1		38°04'50.7"N 7°45'48.4"W	Captação	19.08.2020	Composta	8,44	24,02	533	20.08.2020	800	3	600		Organismos verdes filamentosos visíveis na amostra
SP2	S. Pedro	38°05'25.0"N 7°45'12.0"W	Bóia	19.08.2020	Composta	8,56	24,11	527	21.08.2020	800	3	750		
SP3		38°05'26.0"N 7°45'12.0"W	Bóia	19.08.2020	Superficial	8,73	25,03	523	20.08.2020	1000	2	600		
SP4		38°05'06.0"N 7°46'12.8"W	Ponta oposta à bóia	19.08.2020	Composta	8,44	23,73	361	20.08.2020	1000	2	600		
M5	Magra	38°02'38.5"N 7°46'01.2"W	Junto à captação 1	19.08.2020	Composta	8,12	24,01	540	20.08.2020	1000	2	800		Blooms de macroalgas e/ou ciano nas margens; Disco de sechi (DS) - 2,40 m
M6		38°02'59.2"N 7°46'05.3"W	Junto à captação 2 (albufeira menor)	19.08.2020	Composta	8,53	24,71	537	20.08.2020	1000	2	600		
P7		38°03'49.9"N 7°59'16.8"W	Captação	19.08.2020	Composta	8,31	25,73	566	21.08.2020	800	3	600		
P8		38°04'44.2"N 7°58'52.9"W	Bóia	19.08.2020	Composta	8,29	25,08	558	21.08.2020	800	3	600		
P9	Pião	38°04'44.2"N 7°58'52.9"W	Bóia	19.08.2020	Superficial	8,32	25,55	292	21.08.2020	1000	2	600		
P10		38°04'52.3"N 7°58'57.6"W	Ponta oposta à barragem	19.08.2020	Composta	8,19	25,59	576	21.08.2020	300	7	300		Blooms de macroalgas e/ou ciano nas margens

Parâmetros Setembro 2020														
NOTA: Valores in situ registados com uso de sonda a partir de Magra, devido a reset do aparelho. Sem real conhecimento do seu nível de calibração. Necessita confirmação com dados da EDIA														
Ponto	Albufeira	Coordenadas GPS	Data colheita	Tipo de amostra	Parâmetros in situ			Data processamento	Volume por filtro / química (mL)	Nº filtros química	Volume por filtro / molecular (mL)	Observações	Observações in situ	
					pH	Temperatura (°C)	Condutividade Absoluta (µS/cm ³)							
SP1		38°05'06.0"N 7°46'12.8"W	Ponta oposta à bóia	16.09.2020	Composta	8,64	23,63	558	17.09.2020	1000	2	600		D.S. 1,00m
SP2	S. Pedro	38°04'50.7"N 7°45'48.4"W	Captação	16.09.2020	Composta	8,72	23,90	540	17.09.2020	1000	2	600		
SP3		38°05'25.0"N 7°45'12.0"W	Bóia	16.09.2020	Composta	8,86	24,03	539	17.09.2020	1000	2	600		
M1	Magra	38°02'38.5"N 7°46'01.2"W	Albufeira maior	16.09.2020	Composta	8,77	23,99	539	17.09.2020	1000	2	600		Blooms de macroalgas e/ou ciano nas margens
M2		38°02'59.2"N 7°46'05.3"W	Albufeira menor	16.09.2020	Composta	7,92	23,41	554	18.09.2020	1000	2	600		
P1		38°04'52.3"N 7°58'57.6"W	Ponta oposta à barragem	16.09.2020	Composta	8,48	24,21	549	18.09.2020	250	9	200		Alguns sedimentos finos depositados
P2	Pião	38°04'44.2"N 7°58'52.9"W	Bóia	16.09.2020	Composta	8,54	24,28	565	18.09.2020	800	3	600		
P3		38°03'49.9"N 7°59'16.8"W	Captação	16.09.2020	Composta	8,65	24,76	564	18.09.2020	1000	2	600		D.S. 1,00m

Informação suplementar 3

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Microsoft Word ... Apoio de Formação ... BEP - Bolsa de Emp... OCIANCLASS LabOrders - Softwa... COPFC - Gestão de... Publicações redes... Outros manua...

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

☒ select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Ass. Len	Accession
☒ Uncultured cyanobacterium clone LDBQ-HB-A02 peptide synthetase (mcyA) gene, partial cds	uncultured cyan...	396	396	98%	8e-106	100.00%	282	KJ416293.1
☒ Microcystis aeruginosa NBR18 chromosome, complete genome	Microcystis aer...	396	396	98%	8e-106	100.00%	5868528	CP086723.1
☒ Uncultured Microcystis sp. clone map microcystin peptide synthetase B (mcyA) gene, partial cds	uncultured Micr...	396	396	98%	8e-106	100.00%	287	KF567982.1
☒ Microcystis aeruginosa NIES-88 DNA, complete genome	Microcystis aer...	396	396	98%	8e-106	100.00%	5478552	AP024565.1
☒ Uncultured Microcystis sp. clone YD08MCA-30 microcystin synthetase A (mcyA) gene, partial cds	uncultured Micr...	396	396	98%	8e-106	100.00%	248	HM064694.1
☒ Uncultured cyanobacterium clone LE04s-367-F07 peptide synthetase (mcyA) gene, partial cds	uncultured cyan...	396	396	98%	8e-106	100.00%	246	EF178240.1
☒ Uncultured cyanobacterium clone LE04s-307-A01 peptide synthetase (mcyA) gene, partial cds	uncultured cyan...	396	396	98%	8e-106	100.00%	246	EF178210.1
☒ Uncultured cyanobacterium clone 01LO-SS8 McyA (mcyA) gene, partial cds	uncultured cyan...	396	396	98%	8e-106	100.00%	291	EF424327.1
☒ Uncultured cyanobacterium clone 01LO-IB0 McyA (mcyA) gene, partial cds	uncultured cyan...	396	396	98%	8e-106	100.00%	291	EF424328.1
☒ Uncultured cyanobacterium clone 01LO-NM5 McyA (mcyA) gene, partial cds	uncultured cyan...	396	396	98%	8e-106	100.00%	291	EF424329.1
☒ Uncultured cyanobacterium clone 01LO-NM4 McyA (mcyA) gene, partial cds	uncultured cyan...	396	396	98%	8e-106	100.00%	291	EF424322.1
☒ Uncultured cyanobacterium clone LE04-082-G06 peptide synthetase (mcyA) gene, partial cds	uncultured cyan...	396	396	98%	8e-106	100.00%	228	DQ379662.1
☒ Microcystis sp. 198 partial mcyA gene	Microcystis sp...	396	396	98%	8e-106	100.00%	291	AJ515452.1
☒ Microcystis ichthyoblabe NRERC-232 McyA (mcyA) gene, partial cds	Microcystis ich...	390	390	95%	4e-104	89.53%	291	MN872298.1

Feedback

Resultados de BLAST para S. Pedro – Agosto. Exemplo demonstrativo