

DESENVOLVIMENTO DE UM EQUIPAMENTO ÓPTICO PARA O ESTUDO DO
MOVIMENTO VERTICAL DE CIANOBACTÉRIAS – *Cylindrospermopsis raciborskii*

Otávio Gomes de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada a Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

Prof. José Paulo R. F. de Mendonça, Dr. (orientador)

Prof. Carlos Eduardo de Mattos Bicudo, Dr. (membro)

Prof. Antônio Carlos Guimarães de Almeida, Dr. (membro)

Prof. Fábio Roland, Dr. (suplente)

JUIZ DE FORA - BRASIL
MARÇO DE 2007

OLIVEIRA, OTÁVIO GOMES DE

Desenvolvimento de um Equipamento Óptico para o Estudo do Movimento Vertical de Cianobactérias – *Cylindrospermopsis raciborskii* [Minas Gerais] 2007

vii, 103 p., 29,7 cm (Instituto de Ciências Biológicas/UFJF, M.Sc., Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais, 2007)

Dissertação – Universidade Federal de Juiz de Fora, PGE BIO

1. Cianobactérias, 2. Equipamento de varredura 3. *Cylindrospermopsis raciborskii*

I. IB/UFJF II. Título (série)

*Ao Senhor Deus, senhor e rei da minha vida.
Aos meus pais, por um dia terem ousado vencer.*

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, razão do meu viver.

Aos meus pais, pelo suporte, atenção e carinho durante todo esse tempo.

Ao meu orientador, pelo suporte, dedicação, orientação e pela proposta de desafios que certamente me fizeram crescer significativamente.

À minha namorada, Gislaine, pelo grande apoio e companheirismo em um dos momentos mais difíceis deste período.

À aluna de iniciação científica Marcela, que sempre esteve pronta para colaborar com o fornecimento de amostras.

Aos alunos de iniciação científica Filipe e Jair, pelas discussões teóricas que certamente foram muito úteis.

Ao Prof. Raul, do laboratório de biologia celular, e aos seus alunos que estiveram envolvidos no trabalho com a eletroforese.

Ao Laboratório de Ecologia Aquática, pelo suporte técnico.

Ao departamento de Física.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia.

Ao CNPq, pelo suporte com uma bolsa de mestrado.

À FAPEMIG, pela aquisição do amplificador lock-in.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram envolvidos neste trabalho.

RESUMO

A *Cylindrospermopsis raciborskii* está entre as principais espécies observadas nas florações de cianobactérias no Brasil. Como essa espécie é potencialmente tóxica, podendo produzir hepatotoxinas e neurotoxinas, a formação de florações constitui um sério problema de interesse público, inclusive, no Brasil. A ocorrência de florações torna muito alto o custo de tratamento da água para consumo humano e, além disso, não existem hoje métodos eficientes para remoção das cianotoxinas da água. Por constituir um problema relevante para toda a sociedade, é imprescindível descrever qualitativa e quantitativamente as respostas desses organismos a fatores externos. Não considerando-se apenas uma situação real, mas também isolando fatores e buscando estabelecer em qual medida cada um deles determina o comportamento dessas cianobactérias.

Neste trabalho, foi desenvolvido um equipamento automatizado, de bancada, para ser usado em experimentos que tratem das respostas de cianobactérias ao meio ambiente via regulação de fluabilidade. Esse equipamento descreve o perfil de distribuição de organismos ao longo de um tubo contendo amostra. Ele pode ser configurado para monitorar essa distribuição ao longo do tempo. Com isso, é possível sujeitar os organismos a algum fator de interesse e avaliar as alterações nas concentrações dos organismos em função da profundidade.

ABSTRACT

Cylindrospermopsis raciborskii is among the most common species observed in cyanobacterial blooms in Brazil. Since this species is potentially toxic (it can produce hepatotoxins and neurotoxins), blooms formation constitute by itself a serious problem, of interest to all the society, including Brazil. The occurrence of cyanobacterial blooms makes the costs of water treatment for human use very expensive. Furthermore, there are no efficient methods nowadays for removing the cyanotoxins from water. Because it is a relevant problem to all the society, it is important to describe quantitatively and qualitatively the responses these organisms have to external factors. Not only considering a real situation, but also trying to isolate factors and establish how important each of them is in determining the behavior of these cyanobacteria.

In this work, a fully automatic system is developed to be used in laboratory experiments that focus on the responses of cyanobacteria to the environment via the floating regulation mechanism. This set can describe how the organisms are distributed along the tube which contains the sample. It can be configured to monitor this distribution periodically, so that it is possible to subject the organisms to some external factor of interest and to assess the changes over time in the concentration of organisms as a function of the depth in the water column.

SUMÁRIO

Introdução.....	01
Capítulo 1 – Cianobactérias.....	03
1.1 – Uma Breve Revisão sobre Cianobactérias.....	03
1.1.1 – Morfologia e Habitat.....	03
1.1.2 – Florações de Cianobactérias.....	07
1.1.3 – Respostas das Cianobactérias à Radiação UV.....	09
1.1.4 – Cianotoxinas.....	13
1.2 – Os Aerótopos.....	15
1.2.1 – Morfologia dos Aerótopos.....	16
1.2.2 – Propriedades Físicas dos Aerótopos.....	17
1.2.3 – A Interação entre os Aerótopos e a Luz.....	20
1.2.4 – As Vesículas de Gás em Cianobactérias.....	20
1.3 – A Espécie <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	22
1.3.1 – Introdução.....	23
1.3.2 – Morfologia e Ocorrência.....	24
1.3.3 – Resposta de Populações de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> a alguns Fatores Ambientais.....	26
1.3.4 – Toxicidade.....	28
Capítulo 2 – Materiais e Métodos.....	30
2.1 – Equipamento para Testes de Aplicação de Pressão.....	30
2.2 – O Equipamento de Varredura.....	32
2.2.1 – A Aplicação da Técnica de Atenuação de Luz.....	32
2.2.2 – Descrição do Equipamento Construído.....	35
2.2.3 – Experimentos Realizados com o Equipamento de Varredura.....	50
2.2.4 – Cálculo da Taxa de Sedimentação de Partículas.....	59
2.3 – Experimentos com Atenuação de Radiação UV.....	61
2.4 – Eletroforese.....	62
Capítulo 3 – Resultados e Discussões.....	64
3.1 – Testes com Aplicação de Pressão.....	64
3.2 – Experimentos com o Equipamento de Varredura.....	67
3.3 – Experimentos de Atenuação de UV-B.....	90
3.4 – Eletroforese.....	97
Conclusão.....	98
Referências.....	100

INTRODUÇÃO

A *Cylindrospermopsis raciborskii* (ordem Nostocales) está entre as principais espécies observadas nas florações de cianobactérias no Brasil. Como essa espécie é potencialmente tóxica, podendo produzir hepatotoxinas e neurotoxinas, a formação de florações constitui um sério problema de interesse público, inclusive, no Brasil. A ocorrência de florações torna muito alto o custo de tratamento da água para consumo humano e, além disso, não existem hoje métodos eficientes para remoção das cianotoxinas da água (AZEVEDO *et al.*, 2003).

Considerando-se então a importância do estudo e do melhor entendimento do comportamento dessa espécie em meio natural para a sociedade como um todo, torna-se imprescindível descrever as respostas desses organismos a alguns fatores externos, não só qualitativa, mas também quantitativamente.

Sabe-se que as cianobactérias, em geral, podem apresentar todo um mecanismo responsável pelo seu movimento vertical no meio aquático. Parte deste mecanismo é desempenhada pela presença de aerótopos os quais atuam na regulação da densidade dos organismos, possibilitando que estes possam se deslocar no meio. Essa estratégia lhes garante a possibilidade de procurar por profundidades que contenham condições mais favoráveis ao seu desenvolvimento. Entre essas condições, destaca-se a intensidade luminosa e a concentração de nutrientes (CHORUS *et al.*, 1999). Entretanto, em que medida cada um desses fatores (ou alguma combinação entre eles) contribui para a regulação da flutuabilidade dos organismos é uma questão em aberto para muitas espécies, incluindo a *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Este trabalho, então, se dispõe a contribuir para futuros estudos da dinâmica vertical de cianobactérias em uma coluna de água através do desenvolvimento de um equipamento automatizado de bancada, capaz de gerar perfis de distribuição de organismos ao longo de um tubo contendo amostra (equipamento de varredura). Um aparelho desse tipo permite a análise qualitativa e quantitativa da mudança de padrões de distribuição de cianobactérias pelo tubo ao longo do tempo. Com isso, pode-se sujeitar os organismos a alguma condição externa em específico e então usar

o equipamento para monitorar a alteração de concentrações ao longo da profundidade da coluna.

O equipamento de varredura será descrito na segunda parte desse texto (Materiais e Métodos). Antes será apresentado um tópico sobre cianobactérias contendo uma seção especificamente sobre a *Cylindrospermopsis raciborskii*. Essa parte é útil para a contextualização do problema em questão e, ao mesmo tempo, justifica o objetivo desse trabalho. Na segunda parte também serão descritos dois outros sistemas experimentais (testes com aplicação de pressão e testes de atenuação de radiação ultravioleta), construídos com a finalidade de se conduzir alguns testes que pudessem contribuir para o entendimento do mecanismo de regulação de flutuabilidade dos organismos. Uma descrição completa dos experimentos conduzidos, incluindo os de calibração do equipamento de varredura, será feita também na segunda parte do texto. Na última parte (resultados e discussão), serão apresentados os resultados dos experimentos em questão, seguidos de uma discussão acerca do potencial uso do equipamento para estudos e análises futuras.

CAPÍTULO 1

CIANOBACTÉRIAS

1.1 – UMA BREVE REVISÃO SOBRE CIANOBACTÉRIAS

Neste tópico, serão abordados aspectos gerais sobre as cianobactérias. Inicialmente, serão descritas as características mais importantes considerando-se a morfologia e habitat desses organismos. Depois, é tratada a questão da formação de florações e a influência de alguns fatores ambientais no comportamento de populações de cianobactérias. São destacadas em uma subseção as respostas das cianobactérias à radiação ultravioleta (UV). Logo após é feita uma abordagem sobre as cianotoxinas, onde se comenta sobre as toxinas que compõem esse grupo, suas características e riscos para o homem. Posteriormente, é tratada a questão dos aerótopos (organelas importantes na regulação de flutuabilidade dos organismos). Por fim, são apresentadas características gerais da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*.

1.1.1 – MORFOLOGIA E HABITAT

As cianobactérias, também conhecidas como algas azul-esverdeadas, são formas de vida relativamente simples e primitivas, cuja origem é estimada em 3,5 bilhões de anos (ROSET *et al.*, 2001). Provavelmente, foram os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberar oxigênio na atmosfera primitiva (CHORUS *et al.*, 1999). São procariontes e, portanto, são bioquimicamente e estruturalmente semelhantes às bactérias (AZEVEDO *et al.*, 2003). Entretanto, como as algas, possuem pigmentos que as tornam capazes de realizar fotossíntese, que é o seu principal modo de obtenção de energia para o metabolismo (WHO, 2003; AZEVEDO *et*

al., 2003). Seus processos vitais requerem apenas água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz (AZEVEDO *et al.*, 2003).

Esses organismos ocorrem em águas com variada composição iônica e orgânica e com salinidade que vai desde água doce até hipersalina (HAIDER *et al.*, 2003). Também podem se desenvolver em ambientes com temperaturas muito variadas (CHORUS *et al.*, 1999). Entretanto, os ambientes de água doce são os que apresentam as características mais favoráveis para o seu desenvolvimento, como pH, temperatura e concentração de nutrientes (AZEVEDO *et al.*, 2003).

A morfologia básica desses organismos compreende formas coloniais, unicelulares e filamentosas multicelulares. Em particular, a forma filamentosa é o resultado de repetidas divisões celulares ocorrendo em um único plano. A estrutura multicelular resultante, consistindo de uma cadeia de células, é chamada de tricoma e pode possuir formato espiralado ou retilíneo. A forma e tamanho das células variam muito dentro do grupo de cianobactérias filamentosas (CHORUS *et al.*, 1999).

Alguns gêneros de filamentosas contêm células especializadas na fixação de nitrogênio atmosférico – os heterocitos (HAIDER *et al.*, 2003). O papel dessas células é incorporar o nitrogênio atmosférico numa forma tal que seja útil para a produção de moléculas biológicas nitrogenadas (BERMAN-FRANK *et al.*, 2003). A fixação do nitrogênio ocorre por intermédio da enzima nitrogenase, convertendo o N_2 em amônio, NH_4 , que é a forma através da qual o nitrogênio entra na cadeia alimentar. A função dos heterocitos é fornecer um ambiente anaeróbico para essa enzima, pois a atividade da nitrogenase é rápida e irreversivelmente inibida na presença de oxigênio (ADAMS, 2000). Por possuírem a capacidade de fixar o nitrogênio, as cianobactérias podem ser favorecidas ecologicamente nos casos em que a presença de nitrogênio é um fator limitante, ao mesmo tempo em que outros nutrientes estão disponíveis (CHORUS *et al.*, 1999).

Outra célula especializada que pode se diferenciar em algumas cianobactérias é o acineto (esporos reprodutivos), o qual garante aos organismos a habilidade de sobreviver em condições desfavoráveis ao seu crescimento. Diante de um conjunto de fatores físicos e químicos favoráveis, a produção de acinetos é estimulada de modo que estes podem germinar, contribuindo, assim, para a manutenção de florações de cianobactérias (MOORE *et al.*, 2005). A figura 1.1 destaca os acinetos e heterocitos em um tricoma.

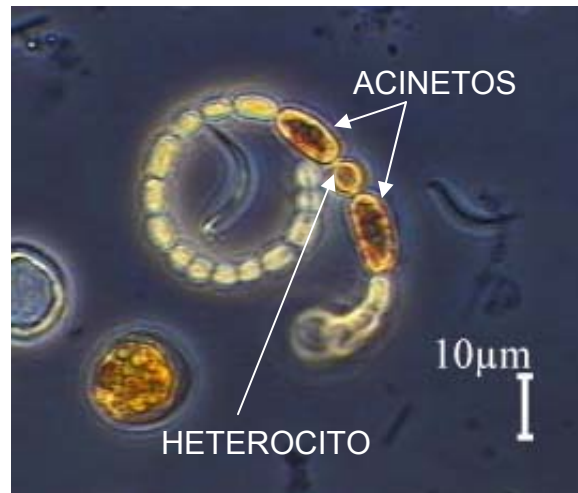


Figura 1.1. *Anabaena* sp. Com dois grandes acinetos (heterocito no meio).

Muitas espécies de cianobactérias possuem ainda os chamados aerótopos. São inclusões citoplasmáticas preenchidas com gás responsáveis por um importante mecanismo ecológico, o qual permite que o organismo ocupe diferentes profundidades na coluna de água. Isso garante às cianobactérias a possibilidade de procurar por profundidades que contenham variáveis físicas e químicas mais favoráveis ao seu crescimento.

Os aerótopos são estruturas rígidas com membrana protéica permeável a gases. A regulação da posição vertical dos organismos é feita através do número de aerótopos presente nas células (CHORUS *et al.*, 1999). Quando submetido a certo valor de pressão, chamado pressão crítica p_c , o aerótopo é colapsado irreversivelmente e o gás ali contido se dissolve na água circundante. Cada célula pode conter muitos milhares de aerótopos com uma distribuição de p_c bem definida. A diferença nos valores de p_c para cada vesícula é explicada em parte pela variação de sua espessura. O valor médio de p_c varia segundo a espécie e cepa consideradas (PORAT *et al.*, 1999).

Essa habilidade é uma importante vantagem ecológica das cianobactérias sobre outras espécies planctônicas (HAIDER *et al.*, 2003). Na seção 1.2, será feita uma abordagem mais completa sobre os aerótopos, sua estrutura e sua importância ecológica.

A figura 1.2, a seguir, mostra uma célula típica de uma cianobactéria.

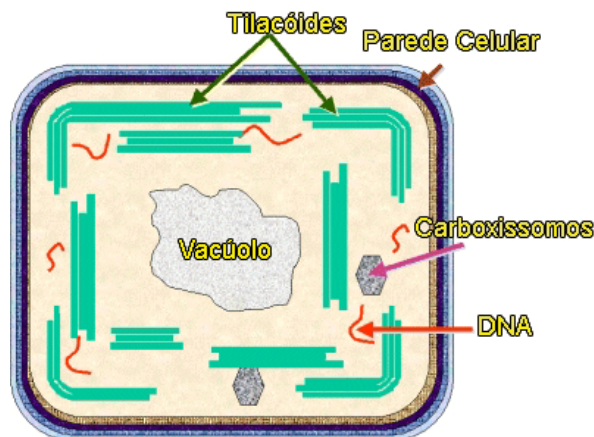


Figura 1.2. Esquema de célula de cianobactérias. Os tilacóides são membranas onde estão localizadas estruturas utilizadas nos processos de fotossíntese. Carboxissomos são estruturas que armazenam enzimas necessárias na fixação de carbono.

As cianobactérias possuem clorofila *a* e realizam fotossíntese (liberando oxigênio) associada aos fotosistemas I e II. Os fotosistemas I e II referem-se a duas reações distintas, porém correlacionadas, referentes ao uso, pelo organismo, de mais de uma frequência da luz incidente no seu mecanismo fotossintético. Cada uma dessas reações envolve um pigmento diferente (CHORUS *et al.*, 1999).

A clorofila *a*, permite o uso, pelos organismos, de duas faixas de comprimentos de onda nos processos de fotossíntese. São estas as regiões azul e vermelha do espectro de luz visível (TOBIN *et al.*, 1998). As cianobactérias contêm, além da clorofila *a*, o pigmento ficocianina. Quando florações de cianobactérias começam a morrer e se desintegrar, esse pigmento pode dar à água uma coloração azulada (CRAYTON, 1993). Mas existem outros pigmentos que também podem ser usados pelos organismos. Esses pigmentos mascaram a tonalidade verde da clorofila. Com esses pigmentos, as cianobactérias são capazes de usar, mais efetivamente, a região do espectro de luz entre os picos de absorção da clorofila *a* e dos carotenóides (pigmentos acessórios). Além disso, as cianobactérias são capazes de produzir o pigmento necessário para absorver a luz de forma mais eficiente no habitat em que estão (CHORUS *et al.*, 1999).

Outra característica a ser destacada é que as cianobactérias são capazes de armazenar nutrientes essenciais no citoplasma da célula (em inclusões proeminentes localizadas no citoplasma). Esses produtos são acumulados sob condições de suplemento excessivo de um determinado nutriente. (CHORUS *et al.*, 1999)

As cianobactérias são também capazes de produzir e liberar, para o meio, toxinas que podem afetar diretamente a saúde humana. A contaminação pode se dar por meio de ingestão de água contaminada, contato via atividades de recreação ou até consumo de pescado contaminado (AZEVEDO *et al.*, 2003). As toxinas de cianobactérias são também conhecidas por cianotoxinas. Nem todas as cianobactérias produzem toxinas e, dentro de uma mesma espécie, nem todas as cepas são tóxicas. A presença de cianotoxinas torna o problema das florações, a ser descrito, ainda mais sério. Na seção 1.1.4 será feita uma descrição um pouco mais ampla sobre as cianotoxinas.

1.1.2 – FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS

O uso de recursos hídricos pelo homem gera grandes impactos sobre os ecossistemas aquáticos. O despejo de rejeitos urbanos – saneamento e indústria – ou agroindustriais em um reservatório pode levar a uma diminuição da qualidade da água e a um processo de eutrofização. A eutrofização é o enriquecimento do corpo de água através da adição excessiva de nutrientes – principalmente fósforo e nitrogênio. Um ambiente eutrofizado se caracteriza, portanto, pela abundante presença de material orgânico (TOBIN *et al.*, 1998). Uma das conseqüências imediatas da eutrofização é o aparecimento de florações – ou “blooms” – de alguns organismos (AZEVEDO *et al.*, 2003). A presença dessas partículas orgânicas na água pode aumentar a turbidez do meio, ou seja, aumentar a atenuação de luz visível. Mas além da luz visível, outras freqüências de radiação também podem ser atenuadas, como o ultravioleta e o infravermelho.

Algumas espécies de cianobactérias podem desencadear um crescimento massivo e descontrolado de suas populações (florações) quando existirem condições favoráveis no ambiente, tais como disponibilidade de luz, concentração de nutrientes moderada ou alta, temperatura da água entre 15 e 30°C e pH maior que 6 (HAIDER *et al.*, 2003). Elas podem causar gosto e odor desagradáveis na água, além de alterar o equilíbrio ecológico do ecossistema aquático (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Para se entender melhor a formação de florações, é interessante considerar como as populações de cianobactérias em geral respondem à alguns fatores

ambientais. O primeiro deles é a intensidade luminosa. Como já foi descrito, as cianobactérias contêm clorofila *a*, entretanto, fazem uso também de outros pigmentos os quais, raramente, são usados por outras espécies de fitoplânctons. Isso garante às cianobactérias a vantagem de poderem utilizar mais efetivamente a energia luminosa. Muitas cianobactérias são sensíveis a períodos prolongados de exposição a altas intensidades luminosas. Por outro lado, as cianobactérias que formam florações de superfícies parecem possuir uma maior tolerância a altas intensidades de luz (CHORUS *et al.*, 1999). O efeito de auto-sombreamento pode desempenhar um papel importante, uma vez que os organismos que se encontram mais próximos da superfície protegem aqueles localizados em maiores profundidades. Com o tempo, os primeiros podem ceder lugar para os últimos, dando origem à uma dinâmica vertical que será melhor entendida com a seção 1.2.

A maior eficiência no uso da luz incidente, aliada a um balanço de energia favorável, – isto significa que as cianobactérias requerem pouca energia para a própria manutenção da função e estrutura celulares – garante às cianobactérias uma vantagem competitiva em lagos turvos porque conseguem manter uma taxa de crescimento relativamente mais alta do que outras espécies de fitoplânctons em condições de baixa luminosidade (CHORUS *et al.*, 1999).

Um outro fator ambiental é o movimento da água. As cianobactérias possuem uma taxa de crescimento muito mais lenta do que muitas espécies de algas. Com isso, as cianobactérias requerem águas menos turbulentas para que possam formar florações (CHORUS *et al.*, 1999). Como já mencionado, as cianobactérias possuem um mecanismo de movimentação vertical utilizando aerótopos. Mas esse movimento é lento e requer estabilidade da água.

As concentrações de fósforo e nitrogênio são fatores que também influenciam significativamente na formação de florações de cianobactérias. Devido ao fato de as florações de cianobactérias geralmente se desenvolverem em lagos eutrofizados, inicialmente se pensou que eram necessárias altas concentrações de nitrogênio e fósforo (CHORUS *et al.*, 1999). Essa idéia permaneceu mesmo depois de florações terem ocorrido em lugares nos quais as concentrações de fosfato dissolvido eram baixas. Dados experimentais mostram que as cianobactérias possuem mais afinidade ao nitrogênio e ao fósforo que muitos outros organismos fotossintéticos. Isso significa que elas podem se desenvolver melhor do que outros organismos fitoplanctônicos sob condições de limitação de fósforo e nitrogênio. Além de possuírem uma maior afinidade a nutrientes, as cianobactérias também possuem uma capacidade

significativa de armazenamento de fósforo. Por outro lado, uma alta concentração de fosfato também pode ser indiretamente um benefício para o desenvolvimento de cianobactérias. Isso porque as demais espécies de fitoplâncton se beneficiam e se reproduzem fazendo com que a água fique muito turva de forma que a intensidade da luz seja baixa. Sob baixas intensidades luminosas, muitas espécies de cianobactérias conseguem se reproduzir mais rapidamente do que outros organismos fitoplanctônicos (CHORUS *et al.*, 1999).

A baixa taxa de crescimento das cianobactérias, em comparação com outros microorganismos fitoplanctônicos, é em parte compensada pela alta estabilidade das populações, uma vez estabelecidas. As cianobactérias possuem poucos inimigos naturais e então a perda por predação não é significativa (CHORUS *et al.*, 1999).

E, por fim, vale citar a temperatura como um outro fator importante. Sabe-se que a maioria das cianobactérias possui maior taxa de crescimento em temperaturas acima de 25°C (CHORUS *et al.*, 1999).

Para cada espécie de cianobactérias, um desses comportamentos citados acima prevalece, isto é, a sensibilidade para cada um dos fatores ambientais citados é diferente. Assim, em cada ambiente, determinada espécie possui condições de se desenvolver melhor e formar florações, dependendo das características físicas e químicas do meio.

Quando uma floração de cianobactérias acontece e por quanto tempo ela permanece são questões que dependem muito das condições climáticas da região. Em zonas temperadas, as florações são significativas durante o fim do verão e começo do outono e podem persistir por 2 a 4 meses. Em regiões de clima mais subtropical, as florações podem se iniciar antes e persistir por mais tempo (CHORUS *et al.*, 1999).

1.1.3 – RESPOSTAS DAS CIANOBACTÉRIAS À RADIAÇÃO UV

Todos os organismos fotossintéticos dependem da radiação solar como fonte primária de energia. Assim, a luz é um dos principais fatores que determinam o sucesso do crescimento de cianobactérias em seus ambientes naturais. Entretanto, a

radiação solar inclui também comprimentos de onda que podem ser prejudiciais a esses organismos, como é o caso da radiação UV.

A radiação UV é geralmente classificada em UV-A, UV-B e UV-C, segundo os seus comprimentos de onda. A tabela 1.1 a seguir mostra essa classificação.

Tabela 1.1. Classificação da radiação UV segundo o comprimento de onda (OKUNO *et al.*, 2005). Os intervalos de energia em eletron-volts (eV) também são apresentados.

Denominação	Intervalo de comprimentos de onda (nm)	Intervalo de energias (eV)
UV-A	400 – 315	3,09 – 3,93
UV-B	315 – 280	3,93 – 4,42
UV-C	280 – 100	4,42 – 12,4

A radiação UV-C é a mais energética, pois compreende a faixa de maiores frequências. A título de comparação, são exibidos na tabela 1.2 valores típicos de energia de ligação.

Tabela 1.2. Alguns valores de energia de ligação (adaptada - ALBERTS *et al.*, 2002).

Ligação	Energia de ligação no vácuo por molécula em eV	Energia de ligação na água por molécula em eV
Covalente	3,89	3,89
Iônica	3,45	0,13
Ponte de Hidrogênio	0,17	0,04
Van der Waals	$4,31 \times 10^{-3}$	$4,31 \times 10^{-3}$

Pode-se notar então que as radiações UV-B e UV-C possuem energia suficiente para quebrar a ligação mais forte, isto é, a ligação covalente. Por isso, são responsáveis por gerar muitos danos à célula irradiada. Proteínas, por exemplo, podem ser diretamente afetadas, pois estas são polímeros de aminoácidos ligados por ligações peptídicas, que são ligações covalentes e, portanto, podem ser quebradas sob radiação UV-B ou UV-C. A faixa de UV-A é conhecida por também gerar efeitos prejudiciais à célula. Por outro lado, ela pode ser útil na fotossíntese e em mecanismos de proteção contra efeitos gerados pelo UV-B (WILLIAMSON *et al.*, 2001).

Ultimamente, tem-se visto um crescente interesse pelos efeitos do UV-B sobre processos biológicos. A razão é o aumento dos níveis dessa radiação na superfície terrestre, em virtude dos danos à camada de ozônio. O ozônio é o fator mais importante na atenuação do UV solar que atinge o planeta, pois a formação e a dissociação de moléculas de O₃ envolvem reações químicas ativadas pela energia dos fótons de UV-C e UV-B. Assim, a camada de ozônio absorve toda a radiação UV-C e grande parte da radiação UV-B (OKUNO *et al.*, 2005). Com a depleção dessa camada, os níveis de radiação que atingem a superfície terrestre imediatamente alterados são os de UV-B que, como já visto, possuem energia suficiente para quebrar ligações químicas e assim causar danos a moléculas biológicas importantes, como DNA e proteínas. Por isso, o UV-B é destacado por ser um componente do espectro solar bastante ativo, isto é, por ser responsável por uma variedade de efeitos nos seres vivos. Segundo SINHA (2001), todos os organismos aquáticos parecem ser susceptíveis ao UV-B, mas os efeitos gerados podem ser muito diversificados, o que inclui alteração na estrutura de proteínas, DNA e outras moléculas relevantes além de alterações em processos fisiológicos. Sendo assim, apesar de a porção de luz visível que atinge uma determinada população de organismos ser determinante no seu desenvolvimento, o nível de radiação UV-B pode ser crucial para a manutenção da população em um determinado habitat.

O nível de radiação ultravioleta solar que atinge um dado habitat depende das propriedades ópticas do meio em questão, bem como das condições climáticas do local. Deve-se ressaltar que a distribuição de intensidades de radiação ultravioleta solar ao longo da superfície terrestre não é homogênea, mas varia segundo a altitude, longitude, latitude e estação do ano.

É importante ressaltar que na avaliação dos efeitos gerados a organismos vivos por radiação, deve-se levar em conta não apenas a densidade de potência de radiação à qual o organismo em questão está exposto (expressa em W/m² – watt por metro quadrado), mas também o tempo pelo qual ele fica sujeito a essa radiação. Esse intervalo de tempo é chamado de tempo de exposição e é expresso em unidades do SI. Assim, define-se por dosagem uma grandeza que leva em conta tanto o nível de radiação (densidade de potência), como o tempo de exposição.

$$D = P \times t$$

A unidade de dosagem é W.s/m² (watt vezes segundo por metro quadrado).

Tratando-se de ambientes aquáticos, especificamente, é de se esperar então que populações de organismos como cianobactérias sejam afetadas por UV-B, uma vez que níveis de radiação suficientes para causar efeitos biológicos podem penetrar em grandes profundidades na água. A penetração da radiação na água depende das propriedades ópticas do meio. Então, a presença de partículas em um determinado corpo de água é um fator determinante na atenuação do UV-B no ambiente, levando-se em conta a concentração, natureza e formato geométrico das partículas (VAN DE HULST, 1981). Por isso, SINHA (2001) cita que a profundidade de água necessária para remover 90% da radiação solar a 310 nm pode variar de 20 m em regiões oceânicas muito limpas, a poucos centímetros em lagos e rios com alta concentração de matéria orgânica. Na seção 2.3, são descritos experimentos de atenuação de UV-B, conduzidos no presente trabalho, que ilustram esses dados.

Em cianobactérias, o UV-B pode afetar diretamente a taxa de crescimento da população e até a sua sobrevivência. Pode também destruir constituintes celulares que possuem picos de absorção nessa região do espectro luminoso, o que pode levar a alterações na permeabilidade da membrana celular e até à morte. SINHA (2001) cita que a fixação de nitrogênio pode ser severamente afetada pela radiação UV-B, que pode prejudicar a diferenciação de células em heterocitos e até tornar inativa a nitrogenase. Cita também que o conteúdo protéico total das células diminui com o aumento do tempo de exposição à radiação e ressalta que isso indica que as proteínas celulares são um dos principais alvos do UV-B. Os efeitos do UV-B sobre as proteínas incluem fotodegradação, aumento da solubilidade em água e fragmentação da cadeia peptídica.

Neste trabalho, esse efeito sobre proteínas foi também verificado, fazendo-se eletroforese de proteínas isoladas de amostras submetidas à radiação UV-B. O experimento será descrito na seção 2.4 e o resultado será discutido na seção 3.4.

Sendo assim, as cianobactérias desenvolveram algumas estratégias de combate aos efeitos nocivos do UV-B. SINHA (2001) cita que existem pelo menos cinco adaptações das quais esses organismos fazem uso. São elas:

- a) Produção de substâncias absorvedoras de UV-B, que funcionam como proteção para alguns alvos citoplasmáticos importantes.
- b) Migração para regiões com menores níveis de radiação UV-B. Para isso, a migração vertical na coluna de água representa uma estratégia importante.

c) Produção de moléculas que reagem e neutralizam substâncias tóxicas geradas pela exposição à radiação.

d) Disponibilidade de uma série de mecanismos de reparo a danos causados ao DNA e ao sistema fotossintético.

e) Adaptação cromática, isto é, habilidade de modificar a composição de pigmentos fotossintéticos, o que implica na regulação dos comprimentos de onda utilizados para a fotossíntese.

Vale ressaltar, por fim, que a sensibilidade à radiação UV-B, bem como os mecanismos de proteção aos efeitos nocivos causados pelo mesmo, podem ser muito diferentes, dependendo da espécie considerada e do habitat em que se encontram.

1.1.4 – CIANOTOXINAS

O maior problema das florações de cianobactérias é que esses organismos podem produzir toxinas (cianotoxinas) extremamente potentes atingindo um conjunto de indivíduos muito além daqueles presentes nas comunidades aquáticas. As cianotoxinas podem se acumular na rede trófica, dando origem a diferentes sintomas de intoxicação e efeitos crônicos, muitas vezes, difíceis de serem diagnosticados (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Inicialmente, a toxicidade de florações de cianobactérias chamou a atenção de cientistas através da ocorrência de casos de contaminação de animais registrados por fazendeiros. O primeiro caso documentado foi na Austrália em 1878. Desde então, a grande maioria dos casos, senão todos, dizem respeito a animais que ingeriram água de lugares onde havia a formação de escumas de cianobactérias nas superfícies (CHORUS *et al.*, 1999). Mas existem também vários relatos de casos de intoxicação por humanos. WHO (2003) dá uma lista de registros de doenças associados à exposição às cianobactérias.

As populações de cianobactérias podem ser compostas de uma só espécie ou de várias, sendo que algumas podem não ser tóxicas. E uma mesma espécie ainda pode conter cepas tóxicas e não tóxicas (cada espécie pode conter dezenas ou

mesmo centenas de cepas) e também cepas bem mais tóxicas do que outras. As cepas tóxicas e não tóxicas de uma mesma espécie não podem ser separadas por identificação microscópica (CHORUS *et al.*, 1999).

As cianotoxinas formam um grupo diverso de toxinas naturais, tanto no aspecto químico como no aspecto toxicológico. Segundo suas estruturas químicas, elas são classificadas como peptídeos cíclicos (microcistina e nodularina), alcalóides (anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxina, cilindrospermopsina, aplisiatoxina e lyngbiatoxina) e lipopolissacarídeos. Em termos de sua toxicidade para os animais, as cianotoxinas são mais comumente classificadas em hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas (KAEBERNICK *et al.*, 2001).

As toxinas mais estudadas são as hepatotoxinas e as neurotoxinas. As hepatotoxinas constituem o grupo de cianotoxinas mais frequentemente encontrado em florações de cianobactérias. São também as cianotoxinas mais comumente relacionadas com casos de envenenamentos de animais e humanos (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2003). Em bioensaios com ratos, as hepatotoxinas causam a morte por hemorragia no fígado após poucas horas. O fígado é o órgão alvo de sua ação em mamíferos (CHORUS *et al.*, 1999). Existem casos de mortes de humanos relacionados com a contaminação por essas cianotoxinas, como o episódio de Caruaru-PE em 1996 descrito por AZEVEDO *et al.* (2002). As neurotoxinas, por sua vez, possuem uma ação mais rápida. Apesar de cada uma delas possuírem um princípio de ação diferente, em geral elas interferem nas comunicações nervosas e o resultado final da ação de todas é a paralisação da atividade muscular do animal, o que ocasiona a morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

As cianotoxinas são armazenadas no interior das células das cianobactérias. Estudos levam a crer que a liberação de toxinas para o meio se dá muito mais através da lise celular do que da constante excreção. Assim, o conteúdo tóxico de um corpo de água aumenta significativamente quando há a morte de florações, pois a morte dos organismos implica na ruptura da membrana externa de suas células. Então, métodos químicos, como o uso de algicidas, nem sempre são os mais aconselhados para o tratamento de águas contaminadas (AZEVEDO *et al.*, 2003).

Tem-se assumido que as cianotoxinas garantem às cianobactérias uma proteção contra a herbivoria (AZEVEDO, 1998), o que não exclui a possibilidade de esses compostos desempenharem outras funções como, por exemplo, proteção contra

radiação UV, agindo como compostos absorvedores dessa faixa de radiação eletromagnética e, assim, protegendo algumas moléculas importantes para a sobrevivência das células. Maiores detalhes sobre como alguns compostos químicos protegem as cianobactérias da radiação ultravioleta são dados na seção 1.1.3. A figura 1.3 a seguir mostra o espectro de algumas cianotoxinas na região do ultravioleta. Nela, nota-se que a cilindrospermopsina, por exemplo, possui um pico de absorção na região de UV-B, o que significa que este composto poderia atuar na proteção contra o UV-B. A mesma lógica se aplica às demais cianotoxinas.

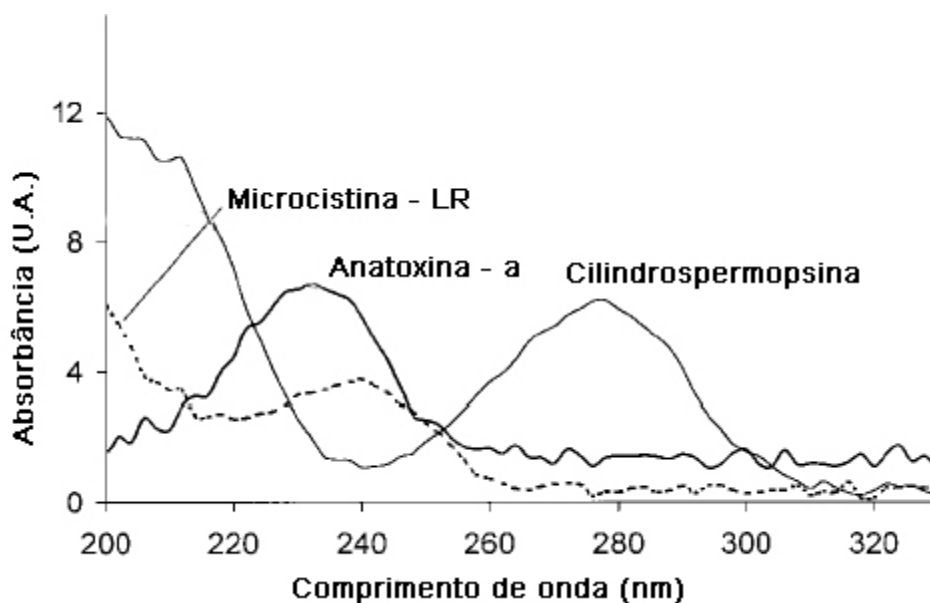


Figura 1.3. Espectro de absorção, em unidades arbitrárias, de algumas cianotoxinas na faixa do ultravioleta (adaptado de VASAS *et al.*, 2004).

1.2 – OS AERÓTOPOS

Dos muitos tipos de organelas e estruturas subcelulares de organismos procariontes, apenas uma, os aerótopos, encerram um espaço com uma porção de gás em seu interior. Essas estruturas são encontradas em diversas espécies de procariontes e ocorrem quase que exclusivamente em microorganismos aquáticos. Os aerótopos, também conhecidos por vesículas de gás, são os responsáveis pelo mecanismo de flutuabilidade observado em várias espécies de microorganismos (WALSBY, 1994).

Os aerótopos foram descobertos no final do século XIX em células de cianobactérias capazes de formar florações e, em 1965, estudos demonstraram que os aerótopos eram constituídos de cilindros cujas bases terminavam em cones (WALSBY, 1972). Essas estruturas desaparecem quando a diferença de pressão entre o exterior e o interior da vesícula ultrapassa um determinado valor crítico. A figura 1.4, abaixo, mostra a estrutura das vesículas.

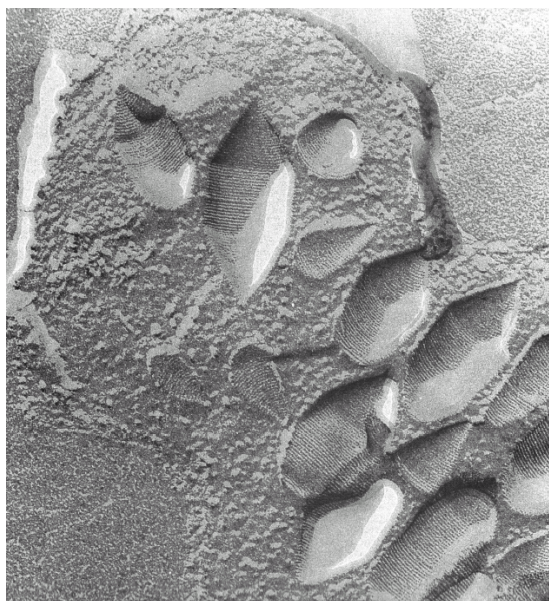


Figura 1.4. Aerótopos em uma célula de *Prosthecomicrobium pneumaticum*, mostrando as extremidades cônicas e a parte cilíndrica das estruturas (WALSBY, 1994).

1.2.1 – MORFOLOGIA DOS AERÓTOPOS

A membrana das vesículas de gás é formada, basicamente, por duas proteínas: uma proteína hidrofóbica (GVPa) que se organiza ao longo de anéis, responsável por dar forma à estrutura cilíndrica com extremidades cônicas, e uma segunda proteína (GVPC) que se adere ao exterior dos anéis garantindo estabilidade à estrutura (WALSBY, 1989; 1994). Com essa composição, os aerótopos possuem rigidez maior do que membranas lipídicas (como a membrana celular) e, portanto, colapsam sob menores valores de pressão. As vesículas de gás são estruturas ocas, preenchidas com gás, formadas apenas de proteínas, permeáveis a gases e

impermeáveis a líquidos, e rígidas, isto é, que não podem ser infladas de acordo com a quantidade de gás em seu interior (WALSBY, 1994). Suas propriedades de permeabilidade e características físicas são todas garantidas pelas proteínas constituintes (WALSBY *et al.*, 1989). O fato de serem rígidas faz com que as paredes externas sejam capazes de suportar pressões até um determinado valor crítico, a partir do qual as estruturas colapsam. Uma vez colapsadas, os aerótopos não podem ser reconstruídos, porém, estudos sugerem que as proteínas de vesículas destruídas podem ser recicladas (WALSBY, 1972; WALSBY, 1994).

Em cianobactérias, o comprimento dessas vesículas varia de 100 a 800 nm ou até mais enquanto sua espessura (medida do diâmetro da parte cilíndrica) varia de 62 a 84 nm dependendo, basicamente, da espécie considerada (WALSBY, 1994).

1.2.2 – PROPRIEDADES FÍSICAS DOS AERÓTOPOS

Permeabilidade da membrana

Originalmente, pensava-se que a vesícula seria capaz de reter gás em seu interior. Hoje em dia, sabe-se bem que isso não é verdade e que a membrana da vesícula de gás é altamente permeável a gases. A entrada do gás na vesícula se dá por meio de difusão. Assim, as moléculas de gás devem passar através da membrana por poros grandes o suficiente para acomodá-las (WALSBY, 1984).

Vários experimentos demonstram a permeabilidade da membrana a diferentes gases. Em particular, experimentos com vesículas de gás da cianobactéria *Anabaena* demonstraram a permeabilidade a H₂, N₂, O₂, CO₂, CO, CH₄ e Ar. A maior molécula a penetrar na vesícula foi a C₄F₈ cujo diâmetro de colisão é de 0,63 nm. Isso significa que devem existir, na membrana, poros com diâmetro de, no mínimo, 0,63nm. Assim, gases cujas moléculas possuem um diâmetro de colisão menor do que o diâmetro do poro devem conseguir penetrar na estrutura (WALSBY, 1994).

A razão de uma permeabilidade tão alta ainda permanece aberta, entretanto, duas conseqüências são imediatas: as vesículas não podem ser usadas para armazenar gases e não podem ser infladas pelo gás, ou seja, são rígidas (WALSBY, 1994).

Rigidez

Sabe-se que as vesículas de gás são estruturas rígidas, que não modificam o seu volume de acordo com a pressão do gás contido em seu interior. Assim, quando a diferença de pressão entre o meio externo e interno da vesícula se torna grande o suficiente, ela é colapsada (WALSBY, 1971).

Para se entender melhor, um esquema das pressões sofridas pela membrana da vesícula é mostrado na figura 1.5.

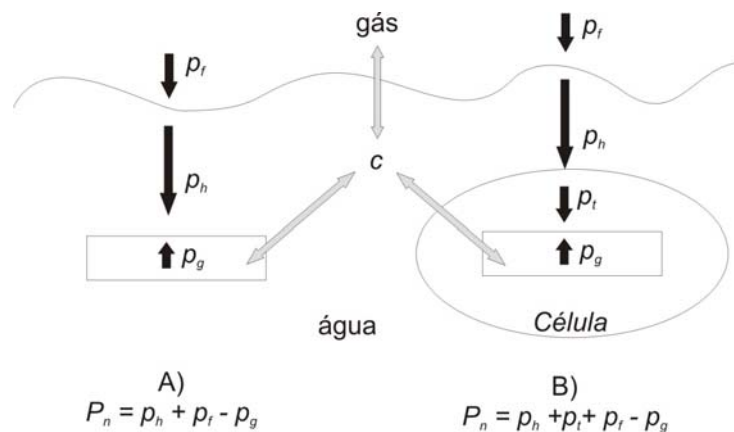


Figura 1.5. Pressões atuando em uma vesícula de gás suspensa em água. A) Uma vesícula de água isolada. B) Uma vesícula de gás dentro da célula. p_r é a pressão do gás acima da superfície do líquido, p_h é a pressão hidrostática, p_t é a pressão osmótica da célula (turgor pressure) e p_g é a pressão do gás dentro da célula, que é determinada pela concentração c de gás dissolvido na água (adaptado de WALSBY, 1994).

A pressão resultante que atua sobre a superfície da membrana da vesícula é dada pelas expressões P_n indicadas na figura 1.5.

Estudos mostram que as vesículas de gás possuem uma grande faixa de variação da pressão crítica. Fatores físicos tais como forma da estrutura e diâmetro são provavelmente os responsáveis por essa variação. A dependência com o comprimento parece ser insignificante. Um outro fator particularmente importante é a possibilidade do surgimento de irregularidades na formação da membrana (disposição das proteínas). Além disso, o fato de a membrana ser atacada constantemente por enzimas pode fazer com que sua rigidez diminua (WALSBY, 1994).

Parece também que as vesículas de gás em diferentes grupos de organismos são adaptadas a suportar as pressões prováveis a que cada grupo estará sujeito. Por exemplo, é claro que as vesículas de gás de cianobactérias devem possuir uma rigidez maior do que as de halobactérias uma vez que aquelas vivem em maiores profundidades e estão, portanto, sujeitas a uma maior pressão hidrostática (WALSBY, 1971).

Como os aerótopos são formados unicamente por proteínas, é de se esperar que a rigidez seja modificada por diferentes fatores químicos e físicos que afetam a conformação dessas proteínas e a interação entre elas (WALSBY, 1972).

Densidade da vesícula de gás

A principal função das vesículas de gás é prover a célula da capacidade de flutuabilidade. A eficiência desse recurso depende da densidade das vesículas, a qual varia em diferentes organismos. Essa densidade é calculada em função da massa total da vesícula (membrana e gás) e do seu volume total. Como a massa total é constituída pela massa da parede da estrutura e pela massa do gás no interior, quanto menor for o volume ocupado pela membrana em comparação com o volume ocupado pelo gás, maior será sua eficiência, pois menor será a razão massa total por volume total. Assim, a densidade da vesícula depende da razão entre o volume ocupado pela membrana e o volume ocupado pelo gás (WALSBY, 1972).

Dessa forma, quanto maior a vesícula, mais eficiente ela será em garantir flutuabilidade à célula. Entretanto, o diâmetro da vesícula é um fator limitante uma vez que a rigidez da estrutura diminui com o aumento do seu diâmetro, ou seja, quanto maior o diâmetro, menor a pressão crítica. Isso faz com que exista um limite superior para o diâmetro da vesícula. O aumento de seu comprimento, por outro lado, pode representar uma saída para que a vesícula possua um maior volume disponível para o gás. Entretanto, nota-se que, a partir de um determinado tamanho, a razão entre o volume ocupado pela membrana e o volume ocupado pelo gás atinge um máximo e então o aumento do comprimento da vesícula passa a não ter mais um efeito significativo (WALSBY, 1972). Então, como o tamanho é um fator limitante para a eficiência dos aerótopos, os organismos precisam de um grande número dessas estruturas para que possam regular a sua flutuabilidade.

1.2.3 – A INTERAÇÃO ENTRE OS AERÓTOPOS E A LUZ

Vesículas de gás aumentam a atenuação de luz em um dado meio. Vesículas isoladas em suspensão possuem um aspecto branco como leite. Elas não absorvem luz no espectro do visível, porém espalham fortemente. Esse espalhamento é devido, principalmente, à presença do espaço com gás no interior das estruturas (WALSBY, 1971). Esse gás faz com que as estruturas possuam um índice de refração significativamente diferente daquele do meio, o que contribui para o espalhamento de luz. Experimentos mostram que a quantidade de luz espalhada por uma amostra de estruturas isoladas diminui de 98% ou mais quando as vesículas são colapsadas por um aumento de pressão (WALSBY, 1994).

Dentro de uma célula, o espalhamento de luz pode ser bem diferente (quantitativamente), pois agora as vesículas estão reunidas em vacúolos, os quais contém não só os espaços com gás, mas também espaços com líquidos que se encontram entre uma vesícula e outra (WALSBY, 1994).

Em ambiente natural, as vesículas de gás contribuem grandemente para a atenuação da luz incidente no meio. Isso significa que uma grande concentração de organismos na superfície da água resulta em uma menor penetração da luz. Isso tem implicações ecológicas importantes como na competição por alimento (WALSBY, 1994).

1.2.4 – AS VESÍCULAS DE GÁS EM CIANOBACTÉRIAS

Estudos demonstram que a flutuabilidade de cianobactérias é regulada pela luz. Em baixas intensidades, a capacidade de flutuar é aumentada e, em altas intensidades, diminuída. Isso pode ser usado para se construir um modelo capaz de explicar como as cianobactérias se distribuem ao longo da profundidade do lago, segundo variações da intensidade luminosa incidente (WALSBY, 1994).

A regulação da flutuabilidade ocorre em virtude da variação da densidade dos organismos. Essa alteração na densidade das células pode ser explicada por uma

mudança no número de vesículas de gás ou na quantidade de material mais denso do que a água em seu interior. Estudos demonstram que o que acontece é uma combinação dos dois fatores. O controle de flutuabilidade por meio da regulação genética da produção das proteínas envolvidas na formação de vesículas não é descrita para a maioria das espécies de maior interesse (WALSBY, 1994).

A figura 1.6 mostra um esquema de um modelo que sintetiza os fatores que controlam a flutuabilidade das cianobactérias. Essa regulação ainda é uma questão em aberto para muitas espécies, pois diferentes fatores possuem maior ou menor importância dependendo da espécie em questão.

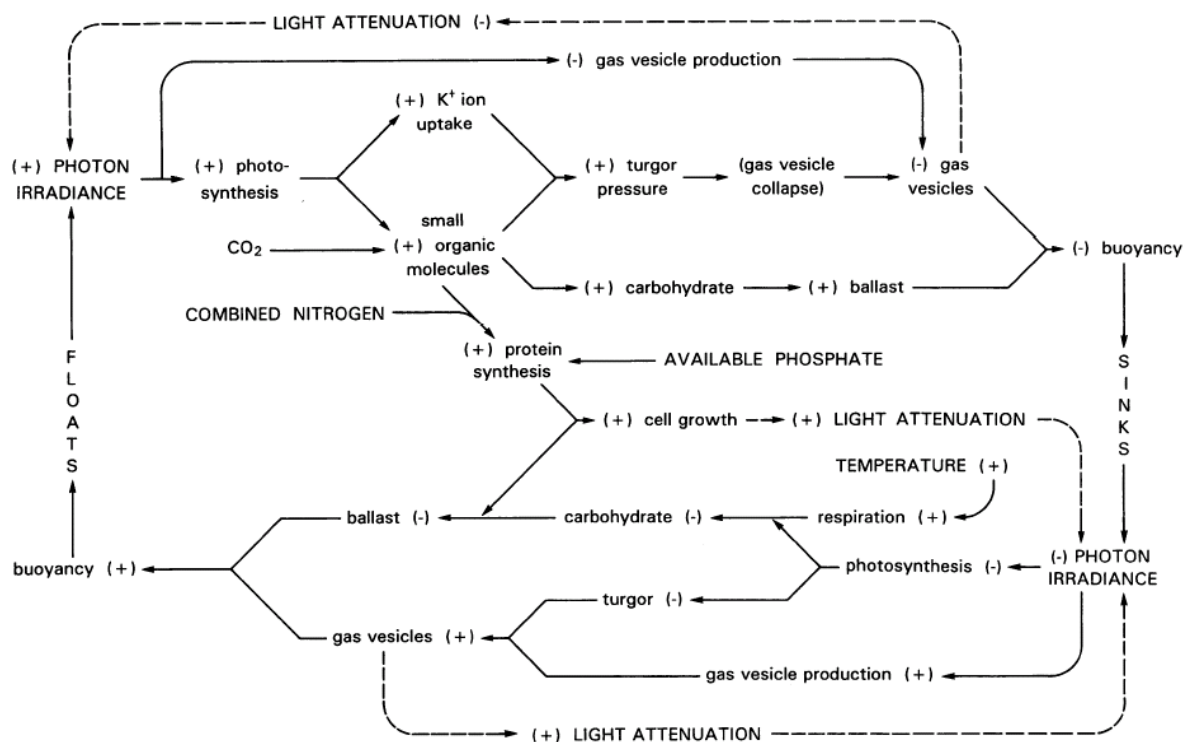


Figura 1.6. Esquema mostrando a relação de diferentes fatores com a regulação da flutuabilidade de cianobactérias. O sinal (+) indica aumento de um dado fator e o sinal (-) indica diminuição (WALSBY, 1994).

Apesar de o aumento da pressão osmótica da célula contribuir para o colapso de vesículas de gás, o principal fator para a perda de flutuabilidade é o acúmulo de substâncias mais densas do que a água, como carboidratos. Em regiões superficiais, a taxa de fotossíntese é aumentada, o que resulta em maior produção desses compostos orgânicos. O acúmulo desses compostos torna a célula mais densa do que a água e faz com que ela afunde. Em maiores profundidades, a taxa de produção

dessas substâncias é menor e o organismo passa a consumir as substâncias previamente armazenadas. Isso faz com que a célula diminua sua densidade e volte a flutuar. A produção de vesículas de gás também é aumentada para auxiliar na subida pela coluna de água, porém, não se conhece muito bem os mecanismos que a regulam (WALSBY, 1994).

Por fim, é importante ressaltar que essa capacidade de regulação da flutuabilidade constitui um importante recurso ecológico, que permite que os organismos busquem por nichos mais adequados em termos de concentração de nutrientes, luminosidade e competição (CHORUS *et al.*, 1999). Por isso, é importante que estudos sejam conduzidos com o objetivo de se compreender melhor em que medida cada fator contribui para essa regulação. E também, deve-se atentar para outros fatores até então não considerados pela maior parte dos trabalhos na literatura. Entre possíveis novos fatores, está o ultravioleta. Como já discutido, a radiação ultravioleta tem as proteínas como um dos principais alvos na célula. E, conforme já apresentado, os vacúolos são estruturas puramente protéicas. É razoável pensar então que a exposição à radiação ultravioleta pode implicar em conseqüências diretas na flutuabilidade dos organismos.

1.3 – A ESPÉCIE *Cylindrospermopsis raciborskii*

Esta seção é dedicada ao estudo da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, a fim de se justificar a importância de mais trabalhos sobre essa espécie. Uma completa caracterização dos organismos em questão é necessária também para um correto entendimento das discussões apresentadas no capítulo 3. Serão abordados inicialmente aspectos de sua morfologia e ocorrência, seguidos da apresentação das respostas dessa espécie a alguns fatores ambientais. Por fim, foram acrescentados alguns comentários sobre a sua toxicidade.

Por ser uma espécie capaz de produzir cianotoxinas e ainda formar florações, ela desperta um grande interesse por parte de órgãos de saúde pública (AZEVEDO *et al.*, 2003). Sua ocorrência se dá em ambientes de água doce muito diferentes, desde regiões subtropicais no hemisfério sul, até aquelas temperadas do hemisfério norte.

Serão abordados aqui aspectos gerais sobre sua morfologia e ecologia e sobre sua toxicologia.

1.3.1 – INTRODUÇÃO

A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (ordem Nostocales) é um componente importante entre as espécies formadoras de florações, pois pode produzir hepatotoxinas e neurotoxinas. O primeiro caso de intoxicação humana ocorreu na Austrália em 1979 e o composto responsável foi a cilindrospermopsina. No Brasil, populações de *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas de diferentes regiões demonstram produzir saxitoxinas (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Essa cianobactéria ocorre em diversos ambientes de água doce. Em regiões tropicais e subtropicais, ela se desenvolve geralmente em lagos estratificados e mais profundos enquanto que, em regiões temperadas, seu desenvolvimento se dá tipicamente em águas menos profundas. Florações de *Cylindrospermopsis raciborskii* já foram registradas em todos os continentes, exceto na Antártica (PADISÁK *et al.*, 1997).

Nem sempre é fácil identificar as florações de *Cylindrospermopsis raciborskii* porque elas podem não formar escumas na superfície e nem liberar substâncias responsáveis pelo odor e cheiro típicos de florações de cianobactérias. Assim, a contaminação de animais é mais comum do que humanos, uma vez que a presença de cheiro e odor poderia servir como um empecilho ao seu consumo (JONES *et al.*, 2005).

A *Cylindrospermopsis raciborskii* se caracteriza por possuir múltiplas estratégias adaptativas, o que lhe garante a possibilidade de ser encontrada em regiões muito diferentes em todo o mundo. No Brasil, existem muitos reservatórios de água para consumo humano que apresentam, por todo o ano, condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Isso torna o estudo dessa cianobactéria de grande interesse pela sua implicação direta na saúde pública nacional.

1.3.2 – MORFOLOGIA E OCORRÊNCIA

As *Cylindrospermopsis raciborskii* são pequenas se comparadas com outras algas. O diâmetro dos filamentos varia entre 2 e 3 μm , o que coincide com a espessura das células, e o comprimento pode atingir entre dezenas e centenas de micrometros. Populações naturais possuem comprimentos de células variáveis entre 3 e 10 μm (JONES *et al.*, 2005). As divisões entre as células não são visíveis ou dificilmente o são (PADISÁK, 2003). Os dois tipos de tricomas mais comuns são os retos e os espiralados. Dentro de cada tipo, o número de células por tricoma varia muito e o tipo reto tende a ser maior e a possuir um maior conteúdo tóxico por célula. O tipo espiralado parece crescer mais rapidamente em condições de baixa intensidade luminosa incidente e altas temperaturas (JONES *et al.*, 2005). A figura 1.7 mostra filamentos de *Cylindrospermopsis Raciborskii*.

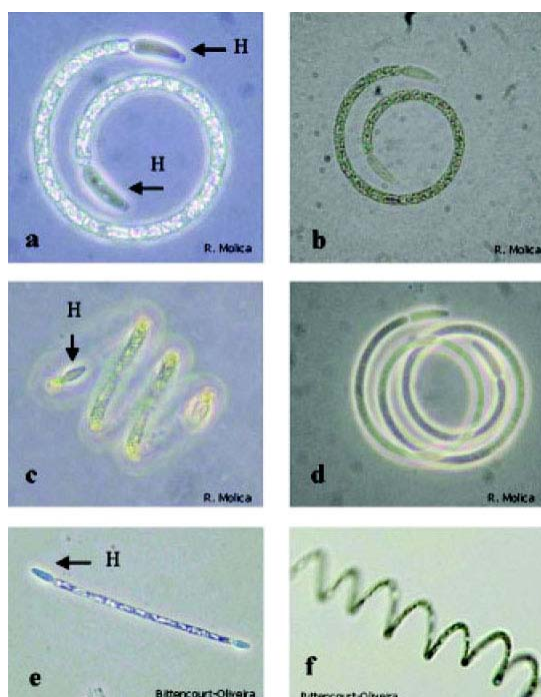


Figura 1.7. Filamentos retos e espiralados de *C. Raciborskii*. a - d) Cepa espiralada Recife/PE – Brasil com heterocitos (célula especializada na fixação do N_2 atmosférico) terminais. a e c. contraste de fase evidenciando os aerótopos que são responsáveis pela flutuação e migração do filamento na coluna d'água. e) Cepa reta Arcoverde/PE – Brasil com heterocitos terminais. f) Material da natureza não cultivado coletado no reservatório de Jucazinho – PE. H quer dizer heterocito (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Geralmente, os tricomas crescem sem heterocitos e raramente possuem acinetos (JONES *et al.*, 2005). Durante o desenvolvimento de novos tricomas, o organismo passa por mudanças em sua morfologia. A figura 1.8 mostra os estágios no desenvolvimento de jovens tricomas.

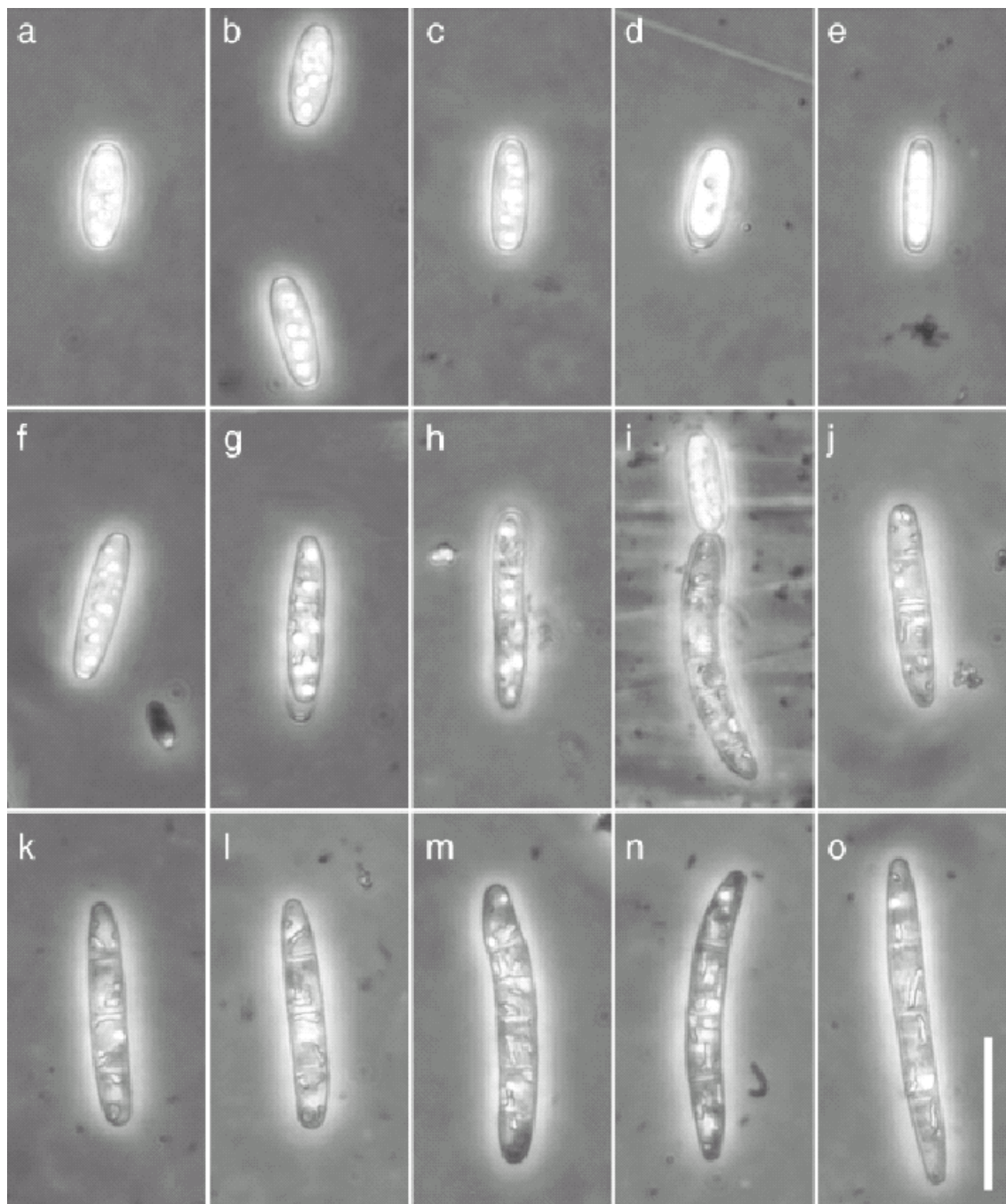


Figura 1.8. Fases de germinação em acinetos de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Fotografias por contraste de fase. A barra indica equivale a um tamanho de 10 μm (MOORE *et al.*, 2004).

Nessas fotos, podem-se identificar cinco fases no desenvolvimento do tricoma. A primeira (fotos a – c) mostra os acinetos maduros, com a parede do envoltório visível e nenhum espaço evidente entre ela e o material interno. A segunda fase (fotos d – f) compreende o estágio de alongação do acineto e da separação entre o material interno e a parede externa. A terceira fase (fotos g – i) é caracterizada pela ruptura do envelope do acineto e pela liberação das novas células. Na última fase (fotos j – o), há, finalmente, um novo tricoma (MOORE *et al.*, 2004).

A *Cylindrospermopsis raciborskii* pode se desenvolver em uma ampla variedade de condições ambientais. Para isso, ela possui estratégias adaptativas que justificam sua ocorrência em ambientes em que nem todas as condições são completamente favoráveis (PADISÁK *et al.*, 1997). Entre essas estratégias, destacam-se a resistência à herbivoria; tolerância a baixas intensidades de luz; possibilidade de migração na coluna de água, buscando estratos ricos em nutrientes e luz; tolerância às altas concentrações iônicas; armazenamento e utilização de reservas intracelulares de fósforo; alta afinidade ao NH_4^+ , que é a forma energeticamente mais acessível de nitrogênio; capacidade de fixar o N_2 atmosférico e flexibilidade às grandes variações de condutividade elétrica (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2003). As respostas dessa espécie a alguns fatores ainda serão mais bem discutidas a seguir.

1.3.3 – RESPOSTA DE POPULAÇÕES DE *Cylindrospermopsis raciborskii* A ALGUNS FATORES AMBIENTAIS

A temperatura parece ser o fator que mais influencia no comportamento de populações de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Aparentemente, esses organismos preferem temperaturas acima de 25°C. Isso, a princípio, explicaria porque se encontra florações perenes em águas mais quentes nas regiões tropicais, enquanto nas regiões temperadas, sua aparição se dá tipicamente em períodos de verão e em águas mais rasas. A necessidade por temperaturas mais elevadas pode estar associada ao desenvolvimento dos acinetos. Para que eles possam germinar, a temperatura ótima da água deve estar entre 22 e 23.5°C (PADISÁK *et al.*, 1997).

A *Cylindrospermopsis raciborskii* possui uma alta afinidade ao fósforo, além de uma grande capacidade de armazenamento, quando comparada com outras

cianobactérias. Estas adaptações permitem que a *Cylindrospermopsis raciborskii* se desenvolva em ambientes com baixas concentrações de fósforo, o que representa uma vantagem ecológica para esses organismos. O estoque de fósforo no interior de suas células é capaz de mantê-la quando os níveis no ambiente estão extremamente baixos (ISVÁNOVICS *et al.*, 2000). Entretanto, quando existem concentrações de fósforo muito altas no ambiente, a vantagem ecológica dessa cianobactéria pode desaparecer. Isso porque outros organismos podem se beneficiar melhor dessa situação e então se desenvolver mais eficientemente (JONES *et al.*, 2005).

A habilidade de fixar nitrogênio atmosférico, através dos heterocitos, é tida como uma outra vantagem ecológica para a *Cylindrospermopsis raciborskii* na ausência de fontes inorgânicas de nitrogênio. Entretanto, parece que essa cianobactéria não depende muito dessa sua capacidade. Ela faz uso inicialmente de uma outra habilidade que é a capacidade de assimilar o amônio. Assim, apenas quando as fontes inorgânicas (nitrato e amônio) se esgotam, é que a diferenciação dos heterocitos é disparada (PADISÁK *et al.*, 1997). Em cultura, esses organismos se desenvolvem mais rapidamente quando há fontes inorgânicas do que quando eles dependem da fixação de nitrogênio (JONES *et al.*, 2005). Assim, a capacidade de fixar nitrogênio representa uma vantagem ecológica durante a formação de florações, pois essa habilidade só permite o seu desenvolvimento quando outras espécies não competem (PADISÁK *et al.*, 1997).

A ocorrência da *Cylindrospermopsis raciborskii* se dá, tipicamente, em águas com pH entre 8.0 e 8.7. Em águas com pH ácido, não há o aparecimento dessa espécie, assim como a maioria das cianobactérias (PADISÁK *et al.*, 1997).

Quanto à salinidade, existem muitos registros contraditórios sobre a sua tolerância à salinidade (JONES *et al.*, 2005). Aparentemente, essa espécie é capaz de tolerar altas salinidades por algum tempo (PADISÁK *et al.*, 1997).

Densas populações de *Cylindrospermopsis raciborskii* podem persistir sem que haja um colapso repentino, pois essa espécie é capaz de tolerar baixos níveis de luz devido ao auto sombreamento (PADISÁK *et al.*, 1997). Estudos mostram que esses organismos são adaptados a baixas intensidades de luz. Existem registros de florações de *Cylindrospermopsis raciborskii* que sobreviveram sob intensidades até 160 vezes menores do que o valor tido como ótimo para seu desenvolvimento (JONES *et al.*, 2005). Se por um lado essa espécie necessita de níveis muito baixos de

radiação visível para se desenvolver, por outro ela é capaz de tolerar altas intensidades luminosas (PADISÁK *et al.*, 1997).

A necessidade de baixos níveis de nutrientes e baixas intensidades luminosas faz da *Cylindrospermopsis raciborskii* uma excelente competidora. Mas especula-se que essa competitividade é perdida quando as concentrações de nutrientes são altas (JONES *et al.*, 2005). Além disso, essa espécie possui resistência à predação pelo zooplâncton (PADISÁK *et al.*, 1997).

Muitos estudos sustentam a idéia de que a *Cylindrospermopsis raciborskii* é muito eficiente na regulação de sua flutuabilidade através dos aerótopos. Essa é mais uma estratégia adaptativa, pois permite que os organismos possam buscar por profundidades que lhes forneçam fontes mais ricas de nutrientes (PADISÁK *et al.*, 1997).

Apesar de poderem ser dominantes durante o ano todo, essas cianobactérias são mais comumente encontrados em períodos restritos, geralmente secos e de baixa pluviosidade (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2003). A formação de escumas na superfície da água não é comum, mas nos estudos em que é registrada, foi observada uma coloração esverdeada-amarelada após a desintegração da floração (PADISÁK *et al.*, 1997).

Resumindo, segundo PADISÁK *et al.* (1997), podem-se destacar as seguintes características que permitem o sucesso da *Cylindrospermopsis raciborskii* nos ambientes aquáticos: boa capacidade de regulação de flutuabilidade; tolerância ao auto sombreamento; alta afinidade à amônia; fixação de nitrogênio; alta afinidade ao fósforo, aliada à boa capacidade de armazenamento e resistência a predação.

1.3.4 – TOXICIDADE

A *Cylindrospermopsis raciborskii* pode produzir cilindrospermopsina e saxitoxina, sendo a primeira a toxina primária desses organismos (CHORUS *et al.*, 1999). A cilindrospermopsina é um alcalóide hepatotóxico, entretanto, já se tem observado danos severos também em células renais, pulmonares e cardíacas em animais testados. Seu mecanismo de ação se dá através da inibição da síntese

protéica (AZEVEDO *et al.*, 2003). Estudos preliminares sugerem até que ela possua também uma ação carcinogênica.

A cilindropermopsina é uma toxina de ação lenta e sua toxicidade é menor do que outras toxinas de cianobactérias, incluindo a saxitoxina, produzida pela própria *Cylindropermopsis raciborskii*. O mecanismo de produção da cilindropermopsina parece variar com as cepas, o tipo de tricoma (espiralado ou reto), a idade da cultura, as condições ambientais e a variabilidade genética. Alguns estudos sugerem que a produção de cilindropermopsina por tricomas espiralados é menor do que os tricomas retos. Outros destacam uma maior produção da toxina em culturas em que faltam fontes de nitrogênio fixado. Especula-se também que situações de estresse e pressão de predadores podem levar a um aumento da produção de cilindropermopsina (JONES *et al.*, 2005).

A saxitoxina, também conhecida por *Paralytic Shellfish Poison* (Veneno Paralisante de Marisco), é uma toxina neurotóxica. Sua ação se dá através da inibição da comunicação nervosa por bloqueio de canais de sódio, influenciando na permeabilidade ao potássio ou na resistência das membranas. É uma toxina muito potente, podendo causar sintomas apenas cinco minutos após a ingestão e levar a morte em poucas horas (AZEVEDO *et al.*, 2003).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (CHORUS *et al.*, 1999), não existem dados suficientes para a definição de um nível máximo aceitável para a concentração dessas toxinas em águas de consumo humano.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

Como já mencionado, a habilidade de se mover verticalmente em uma coluna de água é uma importante característica das cianobactérias. A proposta desse trabalho, já destacada, é a construção de instrumentação adequada, capaz de contribuir para um entendimento mais apurado sobre as condições que regulam a flutuabilidade desses organismos. Neste capítulo, será descrito um aparelho montado para a realização de testes com a aplicação de pressão sobre amostras de organismos. Em seguida, será apresentado o equipamento de varredura, desenvolvido para o estudo do movimento vertical de organismos numa coluna de água. Inicialmente é discutida a técnica utilizada na sua construção e posteriormente são descritas as várias partes que o compõem. Será apresentada também uma montagem construída para a realização de experimentos com atenuação de ultravioleta por amostras de água e organismos, que visam uma compreensão mais clara de alguns aspectos tratados na primeira parte do texto. Juntamente com cada montagem, serão descritos em detalhes os experimentos realizados.

2.1 – EQUIPAMENTO PARA TESTES DE APLICAÇÃO DE PRESSÃO

Como já descrito, as cianobactérias possuem, em suas células, aerótopos, que são estruturas protéicas permeáveis a gases. A regulação da flutuabilidade das cianobactérias se dá através do controle do número de aerótopos. Quando submetidos a uma pressão maior do que a pressão crítica, os aerótopos colapsam e as cianobactérias perdem sua flutuabilidade.

Levando isso em conta, alguns experimentos foram conduzidos com a *Cylindrospermopsis raciborskii* a fim de se verificar essas informações da literatura para os organismos em questão. Em todos os experimentos foi usada a cepa NPCS-1,

fornecida pelo Laboratório de Ecologia Aquática da UFJF. O meio de cultura utilizado na manutenção dessas populações foi o ASM-1.

Para a realização desses testes, foi construído um equipamento para aplicação de pressão em uma amostra de cianobactérias, capaz de quantificar a pressão aplicada. Isso permite avaliar a precipitação dos organismos sob diferentes valores de pressão. A figura 2.1 mostra o sistema construído.

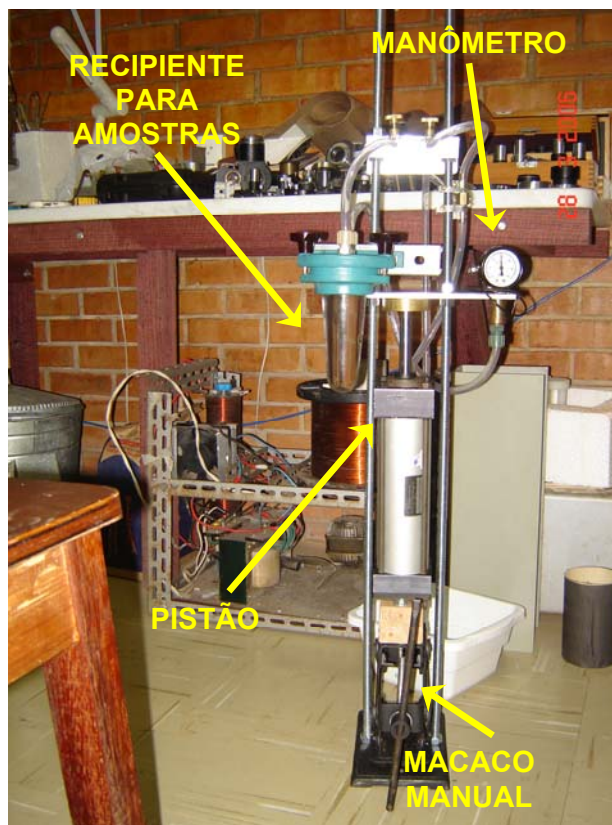


Figura 2.1. Aparelho construído para a aplicação de pressão.

Este equipamento é constituído de um macaco manual que pressiona um pistão no interior de um cilindro, dentro do qual existe um líquido. Este líquido possui contato com a amostra dentro do tubo através de uma mangueira. Com isso, comprimindo-se o pistão, é injetado líquido no interior do tubo de amostras, o que gera um aumento de pressão dentro do tubo e, portanto, sobre os organismos. No tubo, há uma conexão direta para um manômetro que é responsável pela medição da pressão aplicada na amostra.

Com este equipamento, foram aplicadas diferentes pressões sobre amostras iguais de organismos. Foi separado um tubo de controle e os outros tubos sofreram a

aplicação de pressões de 5 MCA, 15 MCA, 25 MCA e 35 MCA por 2 minutos cada um. Após a aplicada a pressão, os tubos foram deixados em repouso fechados e sob luz ambiente. Nenhum nutriente foi adicionado a qualquer um deles. O intervalo de tempo de 2 minutos é suficiente para que os aerótopos se colapsem. Outros intervalos poderiam ser utilizados, inclusive, uma aplicação instantânea da pressão. No presente caso, isso não seria possível por razões técnicas. O aparelho construído não suportaria uma variação de pressão tão brusca.

Nesses experimentos, a pressão está indicada com a unidade MCA que quer dizer metro de coluna d'água. Isso porque essa unidade é bastante usada em estudos na área de ecologia (9,8 MCA equivalem a 1 atm ou a $1,01325 \times 10^5 \text{ N/m}^2$).

2.2 – O EQUIPAMENTO DE VARREDURA

2.2.1 – A APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ATENUAÇÃO DE LUZ

Sabe-se que, quando um raio de luz passa por um meio (solução), a intensidade transmitida é, na maioria das vezes, menor do que quando comparada com a intensidade da luz incidente. Essa diminuição ocorre como resultado de diversos efeitos, dentre os quais destacamos a absorção e o espalhamento. Se considerarmos, então, um raio de luz incidente de intensidade I_0 que percorre uma distância x em um dado meio, pode-se relacionar as intensidades I_0 e I_x por meio da equação de Lambert-Beer:

$$I_x = I_0 e^{-\alpha x} \quad (\text{eq. 2.1});$$

onde
$$\alpha = N (C_{abs} + C_{esp}) = NC_{ext} \quad (\text{eq. 2.2}).$$

em que N é a densidade volumétrica de partículas presentes no meio, C_{abs} e C_{esp} são as seções de choque de absorção e espalhamento, respectivamente, e C_{ext} , é a chamada seção de choque de extinção (BOHREN *et al.*, 1983). A unidade de α (coeficiente de atenuação), no SI é m^{-1} . Já a unidade de C_{abs} , C_{esp} e C_{ext} é m^2 . A atenuação de um feixe por um dado meio é então a soma das atenuações por

absorção e por espalhamento. Assim, a seção de choque de extinção é a grandeza que quantifica diretamente a atenuação do feixe independentemente de qual dos efeitos citados prevalece. Para uma melhor compreensão desses fenômenos, vale destacar um exemplo interessante que consiste em incidir luz visível em dois tubos, contendo um deles pó de café em água e o outro microesferas de poliestireno com diâmetro de 400 nm. O pó de café absorve toda a luz que nele incide, sendo esta a razão do seu aspecto negro quando observado diretamente por reflexão. As microesferas, por outro lado, espalham a luz devido à diferença de índice de refração entre o meio e as partículas. Por isso são esbranquiçadas quando observadas por reflexão. A figura 2.2 a seguir mostra esses dois tubos.



Figura 2.2. Tubos de pó de café e microesferas. No primeiro, destaca-se o efeito de absorção, enquanto no segundo o efeito de espalhamento é mais pronunciado.

Mas numa foto como a anterior, o que se observa é a luz refletida pelos tubos. No caso da luz transmitida por eles, a situação é diferente. Toda a luz é atenuada pelos tubos, o que pode ser verificado na figura 2.3.

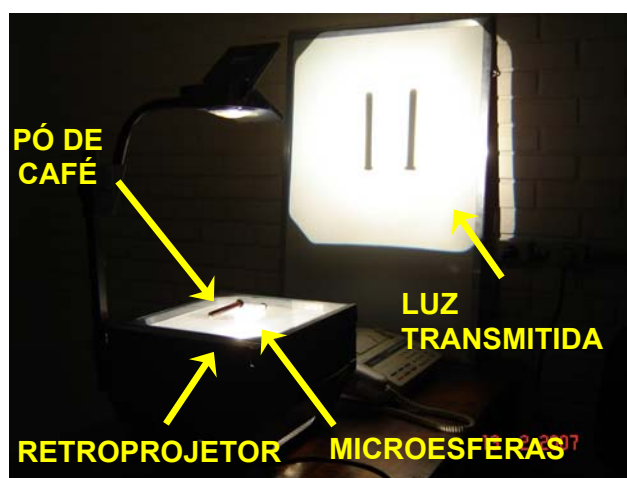


Figura 2.3. Luz transmitida pelos tubos de pó de café e microesferas.

Como pode ser observado, a imagem gerada pela projeção é a mesma para os dois tubos, o que significa que toda a luz incidente é atenuada por eles, mas, como já explicado, por efeitos diferentes. Neste caso, o que se tem são duas situações extremas, isto é, um meio que absorve e não espalha e outro meio que espalha e não absorve. Na primeira, a seção de choque de absorção é suficiente para quantificar a atenuação do feixe de luz incidente, enquanto a segunda é expressa pela seção de choque de espalhamento apenas. Na maior parte dos casos de interesse, no entanto, ocorre uma situação mista, em que o meio espalha e absorve luz simultaneamente. Assim, usa-se a seção de choque de extinção, ao invés das seções de choque de espalhamento ou de absorção separadamente, para quantificar a luz atenuada pelo meio.

A seção de choque de espalhamento está relacionada com o tamanho e a forma das partículas que estão embebidas no meio, com o comprimento de onda da onda incidente e com a parte real do índice de refração. Já a seção de choque de absorção está associada a efeitos referentes à parte imaginária do índice de refração, que por sua vez também dependem do comprimento de onda usado. Assim, a intensidade da luz espalhada depende do número de partículas presentes no meio, da natureza dessas partículas, de suas formas geométricas e ainda do comprimento de onda da luz incidente. Quanto maior a densidade de partículas, maior é a atenuação do feixe incidente, pois mais luz é espalhada e absorvida. Diferentes formas geométricas espalham de formas distintas, isto é, partículas esféricas possuem uma seção de choque de extinção característica enquanto partículas cilíndricas possuem outra e assim por diante.

Então, se, por exemplo, as partículas de uma amostra tiverem um formato padrão, a porção de luz atenuada dependerá, em sua maior parte, do número de partículas presentes. Surge então a idéia de usar essa técnica para estudar o movimento vertical de cianobactérias. Se esses organismos forem considerados como partículas espalhadoras de luz, pode-se construir um equipamento para incidir luz em uma amostra de organismos e então medir a porção de luz transmitida por essa amostra. Vale ressaltar que o tamanho das partículas espalhadoras utilizadas neste trabalho é maior ou da ordem do comprimento de onda da luz incidente. Isso significa que o limite em questão é o limite Mie. A atenuação da intensidade luminosa está relacionada com a natureza, o número e a forma das partículas por meio das seções de choque C_{abs} e C_{esp} . Como espécies diferentes possuem formas diferentes, a quantidade de luz atenuada dependerá da espécie em questão. Considerando-se uma

única espécie como objeto de estudo, a intensidade luminosa transmitida pela amostra dependerá basicamente da concentração de organismos, uma vez que o comprimento de onda da luz incidente, a espessura da amostra e a forma geométrica das partículas são mantidos constantes.

É importante ressaltar que, neste trabalho, mede-se apenas parte da porção de luz transmitida pela amostra (luz espalhada somente na direção do laser). A situação ideal seria medir não só a luz espalhada na direção do laser, mas também a luz espalhada pela amostra em todas as outras direções, o que permitiria uma maior sensibilidade do equipamento em detectar diferenças na concentração de organismos. Para tal, seria necessária uma montagem em formato cilíndrico (cilindro integrador) que envolvesse o tubo de amostra e permitisse a captura de toda a luz proveniente da amostra. Este não é o caso deste trabalho por razões técnicas e também por não ser necessária tamanha precisão na construção dos perfis de concentração ao longo do tubo contendo a amostra de organismos.

2.2.2 – DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO CONSTRUÍDO

Essa técnica de medição de concentração de partículas é utilizada, neste trabalho, na construção de um equipamento capaz de mapear uma coluna vertical de água segundo a concentração de cianobactérias ao longo da mesma. A idéia principal é obter um perfil qualitativo de distribuição de organismos ao longo de um tubo contendo amostra, identificando regiões de maior e menor concentração. Com a análise da modificação desses perfis com o tempo, é possível avaliar a movimentação dos organismos quando estes forem sujeitos a diferentes condições externas, como luz e temperatura. Deve-se ressaltar que o perfil gerado pelo equipamento é qualitativo, isto é, não é medida a concentração de organismos em termos absolutos, ou seja, o aparelho não gera valores absolutos do número de organismos presentes em determinada profundidade. O equipamento gera valores arbitrários, mas que estão diretamente relacionados ao número de indivíduos na amostra. O aparelho em questão foi totalmente desenvolvido pelos autores do trabalho no Laboratório de Óptica e na oficina mecânica do Departamento de Física da UFJF, usando-se sempre material de baixo custo que pode ser facilmente conseguido. A sua montagem será descrita a seguir.

O aparelho deve, então, ser capaz de incidir luz em uma amostra de cianobactérias e medir a porção transmitida pelo meio. Além disso, ele deve fazer uma varredura com a luz incidente ao longo de todo o tubo, para gerar o mapa de distribuição de organismos. É importante mencionar que o feixe de luz utilizado deve possuir um comprimento de onda bem definido, pois o coeficiente de extinção varia também com o comprimento de onda da luz incidente. E ainda é desejável que o equipamento seja automatizado, por conveniência e precisão das medidas.

Para um melhor entendimento do funcionamento do equipamento construído, convém dividi-lo nas várias partes que o compõem. No organograma a seguir (figura 2.4), estão destacados os módulos de trabalho do aparelho. Posteriormente, cada um deles será descrito com maiores detalhes.

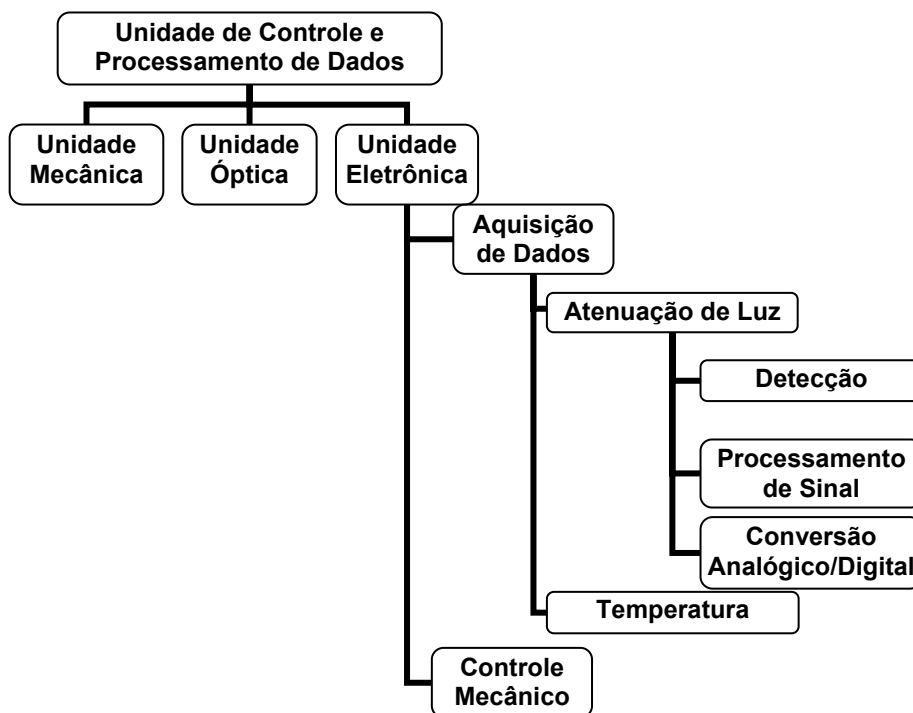


Figura 2.4. Organograma esquemático da montagem do equipamento.

A figura 2.5, a seguir, mostra os passos envolvidos no controle mecânico e no processo de aquisição de dados e temperatura.

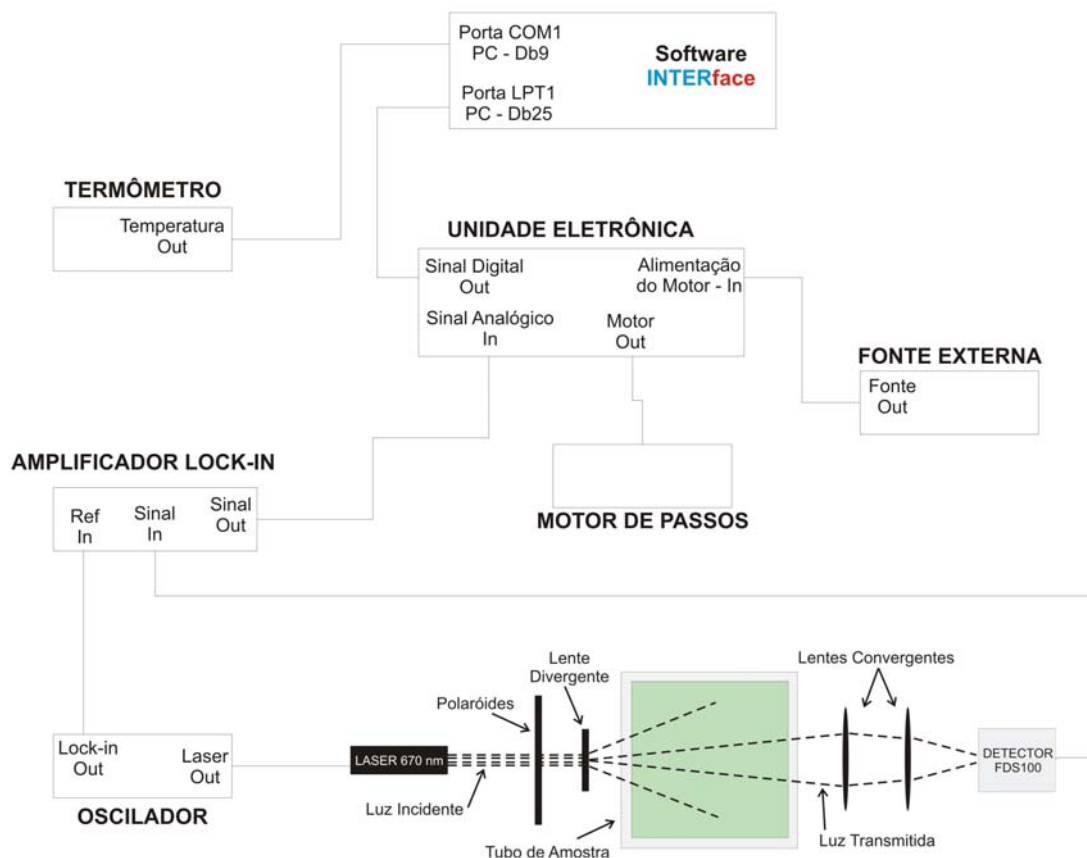


Figura 2.5. Unidades que compõem o equipamento de varredura. Em azul, está destacado o processo de controle mecânico e em vermelho, o processo de aquisição de dados. A aquisição de temperatura é indicada em preto, pois a leitura é feita diretamente pelo **INTERface**.

A unidade de controle e processamento de dados é um software (**INTERface**) responsável por adquirir os dados referentes à intensidade de luz transmitida pela amostra, processa-los, organiza-los, exibi-los e armazena-los em disco rígido. Além disso, ele ainda controla o sistema mecânico, fazendo a varredura com o feixe de luz, e monitora a temperatura da amostra por meio de dois sensores independentes. O **INTERface** permite ao usuário estabelecer alguns parâmetros relativos ao experimento a ser conduzido (intervalo de tempo entre varreduras, limites de profundidades, modo monitoramento temporal, entre outros) e, uma vez configurado, é capaz de conduzir todo o trabalho automaticamente.

O **INTERface** foi totalmente desenvolvido pelos autores em linguagem basic, usando-se o compilador Visual Basic 6.0 da Microsoft.

A unidade mecânica é constituída por um trilho, orientado verticalmente, sobre o qual se movimenta uma plataforma contendo a unidade óptica. Um motor de passos aciona um sistema de engrenagens que por sua vez transfere o movimento à plataforma. O motor é ativado segundo comandos do **INTERface**. O trilho possui comprimento de aproximadamente 50 cm, sendo que a extensão útil de varredura no tubo é de 36 cm. O tubo utilizado é feito com vidro de 3 mm de espessura e tem base com formato quadrado de dimensões internas 3,7 cm x 3,7 cm. A plataforma é equipada com um sistema corretivo de posições final e inicial (no caso de se usar toda a extensão útil do tubo), o que garante qualidade na repetição de varreduras no modo automático do **INTERface**. A figura 2.6, a seguir, mostra uma foto da unidade mecânica.

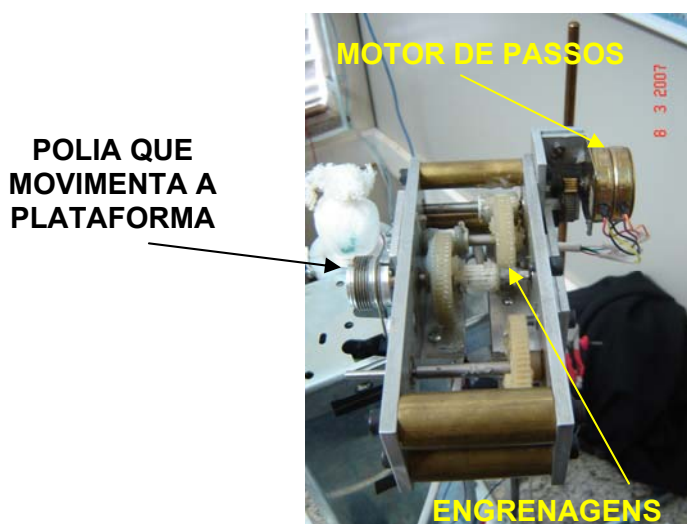


Figura 2.6. Unidade mecânica do equipamento de varredura.

A unidade óptica compreende um laser de semicondutor (comprimento de onda de 670 nm), um detector de luz, dois polaróides e um conjunto de lentes convergentes e divergentes. O uso de laser de 670 nm contribui para uma maior atenuação do feixe incidente pela amostra de organismos, uma vez que, por possuírem clorofila *a*, suas células, além de espalhar a luz, possuem uma maior absorção nessa faixa de comprimentos de ondas. Outro fato importante é que o laser possui um comprimento de onda bem definido. Isso é necessário, pois, como já visto, a atenuação do feixe de luz incidente depende também do comprimento de onda em questão. Os polaróides são posicionados logo após o laser para regular a intensidade do feixe luminoso, uma vez que o detector possui um limite máximo de saturação para leitura. As lentes divergentes são usadas logo após os polaróides para que o feixe luminoso possa cobrir uma maior área do tubo. Essa área, medida na região em que a luz incide no

tubo, é da ordem de $1,76 \text{ cm}^2$. Um feixe que ilumina apenas uma região muito pequena do tubo pode não gerar resultados corretos, uma vez que podem existir flutuações na densidade de organismos ao longo da seção reta do tubo. As lentes convergentes, por sua vez, são utilizadas para convergir a luz que foi transmitida pela amostra, de forma que o feixe fique concentrado na área útil do detector.

A figura 2.7 mostra uma foto da plataforma que contém a unidade óptica.

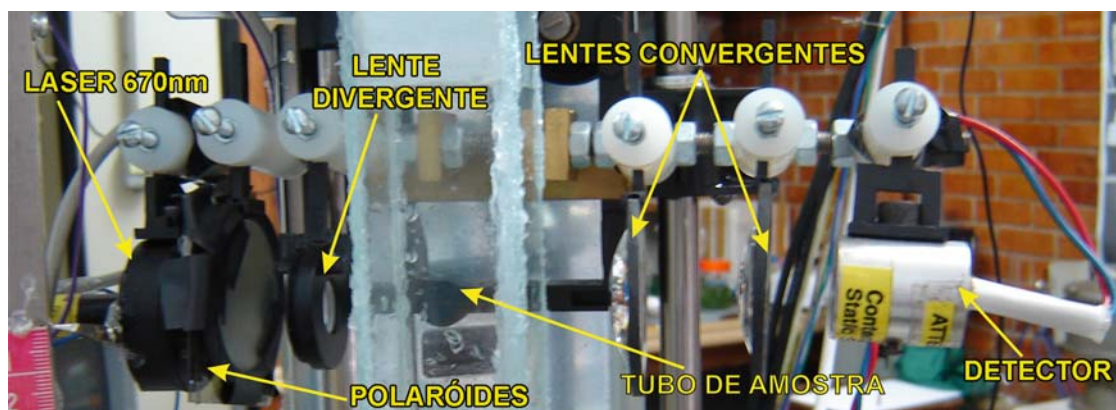


Figura 2.7. Unidade óptica do equipamento de varredura.

A unidade eletrônica, por sua vez, compreende um sistema de aquisição de dados referentes ao monitoramento da temperatura e à unidade óptica, além de um sistema de controle do motor de passos.

O sistema de monitoramento de temperatura foi construído utilizando-se tecnologia de microcontroladores. Dois sensores DS1621 da Dallas Semiconductor são usados para fazer a leitura da temperatura. Os valores são enviados via protocolo I2C para um microcontrolador PIC16F819. Este microcontrolador adquire e processa os dados e posteriormente os envia para o computador usando comunicação serial, intermediada por um driver MAX232N da Texas Instruments. No computador, o **INTERface** é responsável por adquirir os dados da porta paralela e exibi-los na tela principal do software, além de gravá-los em arquivo no início de cada varredura.

A figura 2.8, a seguir, mostra o esquema da montagem eletrônica do termômetro digital e uma foto do equipamento construído.

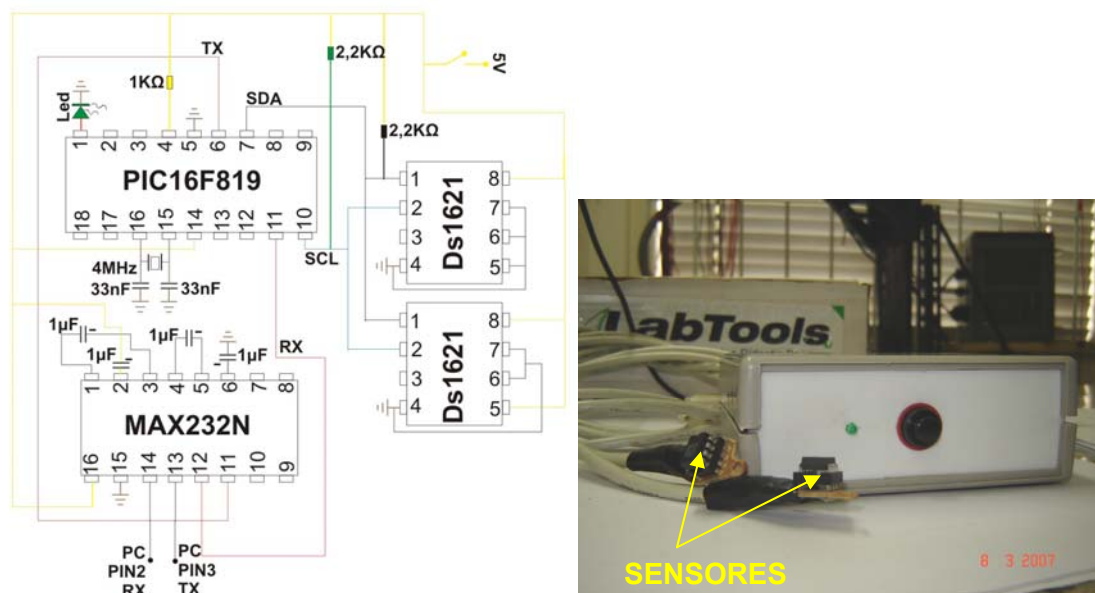


Figura 2.8. Esquema eletrônico do termômetro digital (esquerda) e foto do dispositivo construído (direita). Os CIs DS1621 são os sensores de temperatura.

O processo para adquirir os dados da unidade óptica é dividido em três etapas. A primeira é a fase de detecção do sinal de luz transmitido pela amostra. O detector utilizado foi o FDS100 da Thorlabs. Este detector possui a propriedade de converter a energia da luz que nele incide em uma corrente elétrica. A corrente gerada depende da intensidade da luz incidente, bem como do comprimento de onda incidente. Mais uma vez, tem-se uma razão para usar uma fonte de comprimento de onda bem definido. Sendo assim, pode-se ter a magnitude da intensidade do feixe de luz transmitido medindo-se a corrente gerada pelo detector. Na saída do detector, o que se tem, então, é um sinal de tensão analógico que corresponde à intensidade da luz que incide no detector. Esse sinal de tensão é medido sobre um resistor de carga, conforme mostra a figura 2.9.

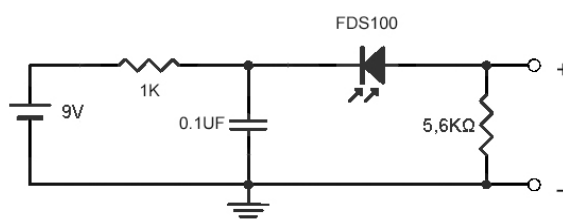


Figura 2.9. Esquema da montagem eletrônica do detector.

A curva de resposta espectral do FDS100 em função do comprimento de onda incidente é exibida na figura 2.10.

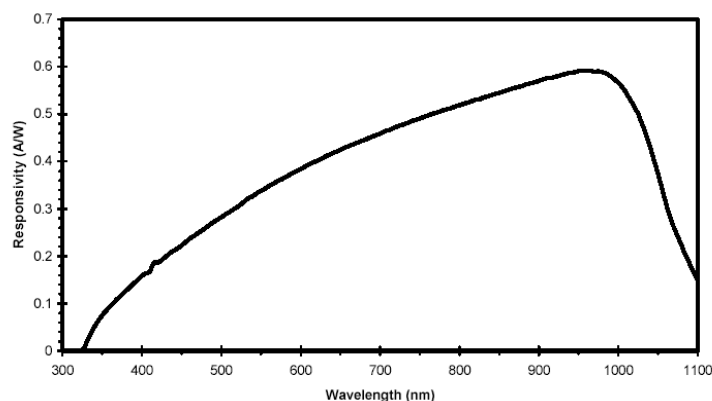


Figura 2.10. Resposta espectral do detector FDS100 em função do comprimento de onda incidente.

A segunda etapa corresponde ao processamento do sinal analógico gerado pelo detector, a fim de se melhorar a precisão da medida. Para tal, é utilizado um dispositivo chamado amplificador síncrono (lock-in). O funcionamento desse equipamento não será descrito aqui em detalhes, mas o seu papel é, basicamente, amplificar o sinal analógico em questão e reduzir o nível de ruídos do mesmo. Para isso, o sinal de saída do detector deve possuir uma frequência de oscilação bem definida (ω_s). Isso significa que a luz incidente deve ser pulsada, com a frequência ω_s . O lock-in, por sua vez, conhece a frequência com que o sinal do detector chega até sua porta de entrada e então ignora qualquer sinal que possua uma frequência diferente. Dessa forma, pode-se reduzir muito o nível de ruídos, os quais possuem frequências completamente aleatórias.

Inicialmente, tanto o sinal gerado pelo detector com frequência ω_s como os ruídos (que não possuem uma frequência bem definida) inerentes ao sinal são amplificados nos estágios de entrada, sem que haja qualquer alteração na relação sinal/ruído. Em seguida, o sinal passa por filtros que visam reduzir alguns tipos de ruídos. Internamente, existe um sistema eletrônico, conhecido por PSD (Phase Sensitive Detector) responsável por multiplicar eletronicamente o sinal com frequência ω_s , após passar pelo amplificador e filtros, com o sinal de referência na entrada ω_r , gerando um sinal na forma da equação 2.3, para sinais de entrada e referência senoidais.

$$V_m = [V_s \text{sen}(\omega_s t + \varphi_s)] \cdot [V_r \text{sen}(\omega_r t + \varphi_r)] \quad (\text{eq. 2.3})$$

onde V_s e V_r são as amplitudes dos sinais do detector e da referência e φ_s e φ_r são as respectivas fases.

O sinal resultante é dado pela equação 2.4.

$$V_m = \frac{1}{2}V_sV_r \cos[(\omega_s - \omega_r)t + \varphi_s - \varphi_r] - \frac{1}{2}V_sV_r \cos[(\omega_s + \omega_r)t + \varphi_s + \varphi_r] \quad (\text{eq. 2.4})$$

V_m é composto por dois sinais oscilantes, um com frequência $\omega_s + \omega_r$ e outro, com $\omega_s - \omega_r$. Em seguida, um filtro que elimina a componente de alta frequência é aplicado ao sinal e o sinal de saída passa a depender apenas da diferença das frequências de oscilação dos sinais de entrada e de referência. Para o caso em que essas frequências são iguais, o sinal de saída fica descrito pela equação 2.5.

$$V_m = \frac{1}{2}V_sV_r \cos(\varphi_s - \varphi_r) \quad (\text{eq. 2.5})$$

Vale destacar que o sinal de saída é contínuo, previamente amplificado e filtrado. Esta forma de processamento do sinal permite a detecção de sinais de pequena amplitude, mesmo quando estão presentes ruídos com intensidade de centenas ou até milhares de vezes maior (SCOFIELD, 1994).

O equipamento usado neste trabalho foi o amplificador lock-in SR510 da Stanford Research Systems, adquirido em projeto da FAPEMIG. A figura 2.11 mostra uma foto desse aparelho.



Figura 2.11. Amplificador lock-in SR510 usado neste trabalho.

Para se especificar a frequência do sinal, usa-se um oscilador, responsável por fazer com que o laser emita luz com uma frequência bem determinada e enviar ao lock-in a informação de qual é essa frequência. O oscilador utilizado foi construído no laboratório e usa tecnologia de microcontroladores. Um PIC 12F675 gera em um de

seus pinos um sinal pulsado de 110 Hz que aciona um transistor. Este é responsável por ligar e desligar a alimentação do laser, dependendo do estado do seu pino base. O sinal pulsado também é enviado diretamente para o lock-in. Para evitar interferência da rede elétrica convencional, a frequência de oscilação deve ser diferente de 60 Hz ou de múltiplos inteiros deste. Por isso, escolheu-se o valor 110 Hz. Essa frequência foi verificada com o uso do osciloscópio digital TDS2022 da Tektronix. Na figura 2.12 segue o esquema da montagem do oscilador e uma foto do dispositivo construído.

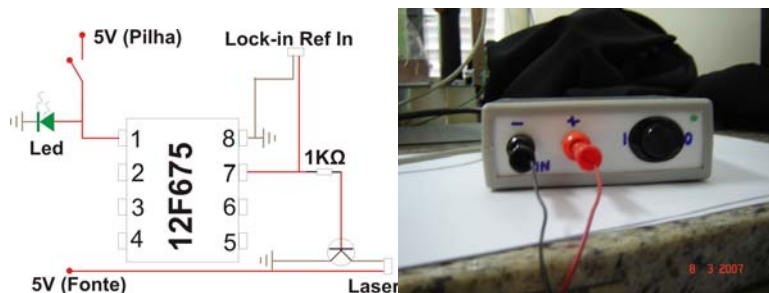


Figura 2.12. Montagem eletrônica do oscilador (esquerda) e foto do aparelho (direita).

A terceira etapa, por sua vez, compreende a aquisição dos dados pelo computador. O amplificador lock-in, além de deixar o sinal com um baixo nível de ruídos, ainda fornece uma saída analógica contínua e amplificada correspondente ao sinal de entrada (proveniente do detector). A comunicação entre o lock-in, que gera um sinal analógico, e o computador, que lê apenas sinais digitais (binários), é estabelecida através de um dispositivo eletrônico chamado conversor analógico/digital (ou conversor A/D). Sua função é ler a diferença de potencial na sua entrada, associar um número binário a esse sinal, isto é, criar uma escala binária para leitura do sinal analógico, e transmitir esse número associado ao computador via porta paralela, bit a bit. Neste trabalho, foi construído um conversor A/D utilizando-se o CI ADS7822 da Burr-Brown, que possui uma resolução de 12 bits.

No computador, o **INTERFACE** deve acessar a entrada paralela e adquirir o número enviado pelo conversor A/D. Deve, em seguida, converter esse número binário para um número decimal e ajustá-lo de forma a exibir um valor que corresponda à diferença de potencial real que chega ao conversor A/D. Finalmente, esse número deve, então, ser exibido e armazenado em arquivo, caso o experimento esteja em andamento, em associação com um instante de tempo e com a profundidade em questão. É este número que dá a medida arbitrária da concentração de organismos em uma determinada profundidade.

O controle do motor de passos é realizado através de um driver, dispositivo de interface entre o computador e o motor. Um motor de passos gira seu eixo de forma discreta, isto é, de ângulos definidos (passos), e por isso é conhecido como um motor de precisão. Ele possui seis fios de ligação, sendo dois de alimentação e os outros quatro correspondendo cada um a um passo do motor. Assim, esses quatro fios devem ser alimentados na ordem correta, um a um, para que o motor possa girar corretamente. A alimentação nesses fios é condicionada pelo computador. Em uma seqüência, o motor gira em um sentido e na seqüência contrária, ele gira no sentido oposto. Entre o computador e o motor, deve existir um dispositivo que, basicamente, associa cada pulso gerado pelo computador em diferentes saídas da porta paralela a um pulso de tensão apropriada, proveniente de uma fonte externa, em um dos fios do motor de passos, uma vez que a porta paralela gera pulsos de 5 V e o motor funciona com tensões de 12 V. No caso, foi usado o dispositivo ULN2003 da STMicroelectronics. Neste trabalho, o driver do motor de passos e o dispositivo de conversão analógico/digital, a ser descrito, foram montados em um mesmo equipamento. Na figura 2.13, a seguir, é mostrado o esquema eletrônico desse sistema.

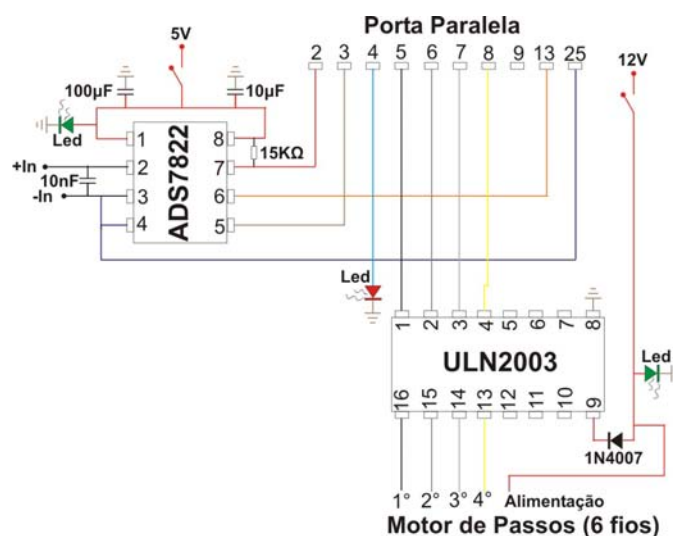


Figura 2.13. Esquema da montagem do conversor A/D e do driver para motor de passos. O CI ADS7822 da Burr-Brown é o responsável pela conversão do sinal analógico em um sinal digital. O CI ULN2003 da STMicroelectronics libera uma alimentação de 12 V em um dos quatro fios do motor sempre que um pulso for enviado pela porta paralela. (em uma das saídas 5, 6, 7 ou 8).

Nas figuras 2.14 e 2.15, são mostradas fotos do dispositivo fechado.



Figura 2.14. Vista frontal do dispositivo Conversor A/D e Driver de moto de passos.



Figura 2.15. Vista traseira do dispositivo Conversor A/D e Driver de moto de passos.

O **INTERface** é um software capaz de coletar os dados enviados pelo conversor A/D e relacioná-los com uma variável temporal ou com a posição do elevador. Com ele, é possível realizar experimentos em que o elevador se encontra fixo em uma posição e o que se quer medir é a variação da intensidade do sinal com o tempo ou experimentos em que o elevador deve se mover e o que se deseja observar é a variação da intensidade com a posição do elevador. Além disso, o **INTERface** possibilita a visualização da construção de um gráfico em tempo real da variável escolhida (tempo ou posição) versus a intensidade relativa (a uma referência pré-fixada pelo usuário) ou absoluta. Ele salva esses dados em um arquivo de dados organizado de forma que este possa ser usado por softwares específicos para análise gráfica. O **INTERface** é também capaz de salvar o arquivo de gráfico em um arquivo de imagem. Os arquivos de saída do software podem ser visualizados no próprio **INTERface**. Nas figuras 2.16, 2.17, 2.18, 2.19 e 2.20 são exibidas imagens do **INTERface**.

Clique para prosseguir.



Figura 2.16. Tela de entrada do **INTERface**.

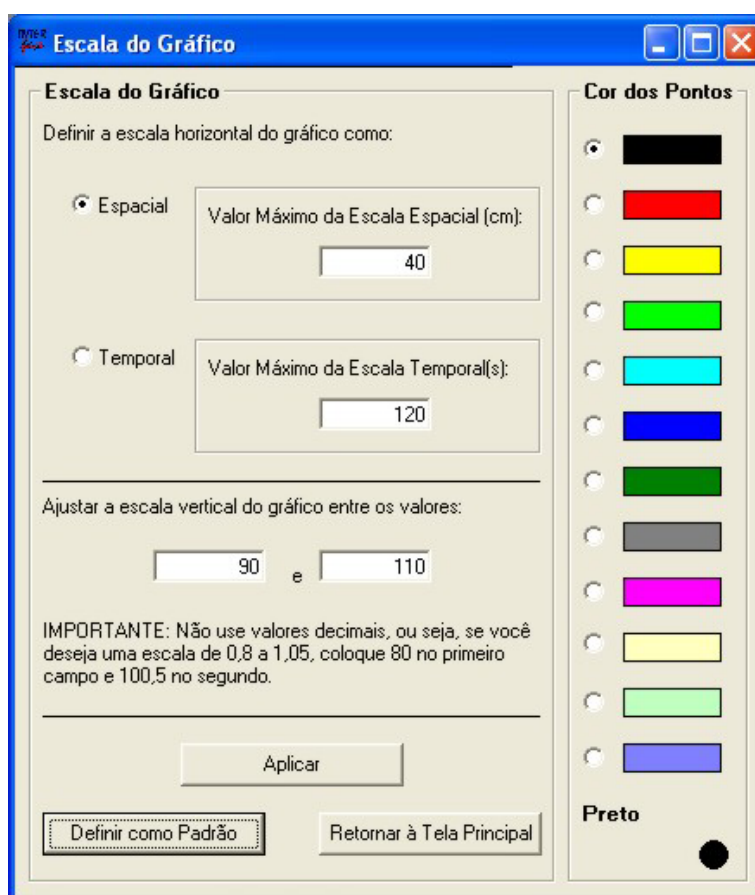


Figura 2.17. Tela de configuração do ambiente de gráfico.

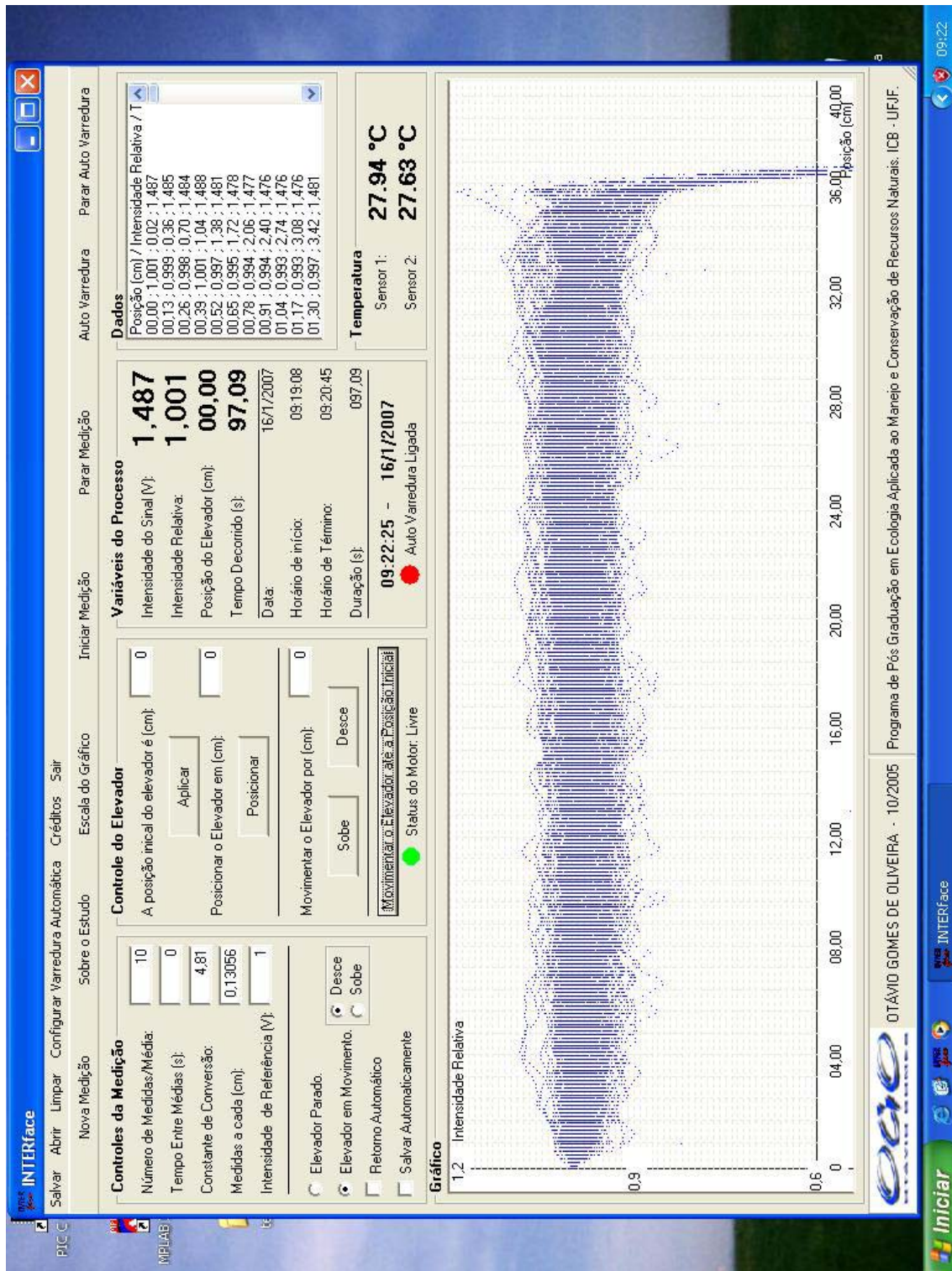


Figura 2.18. Tela principal do *INTERface*.

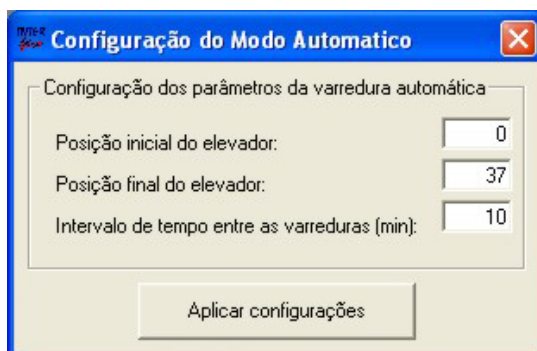


Figura 2.19. Tela de configuração do modo automático de experimentos.

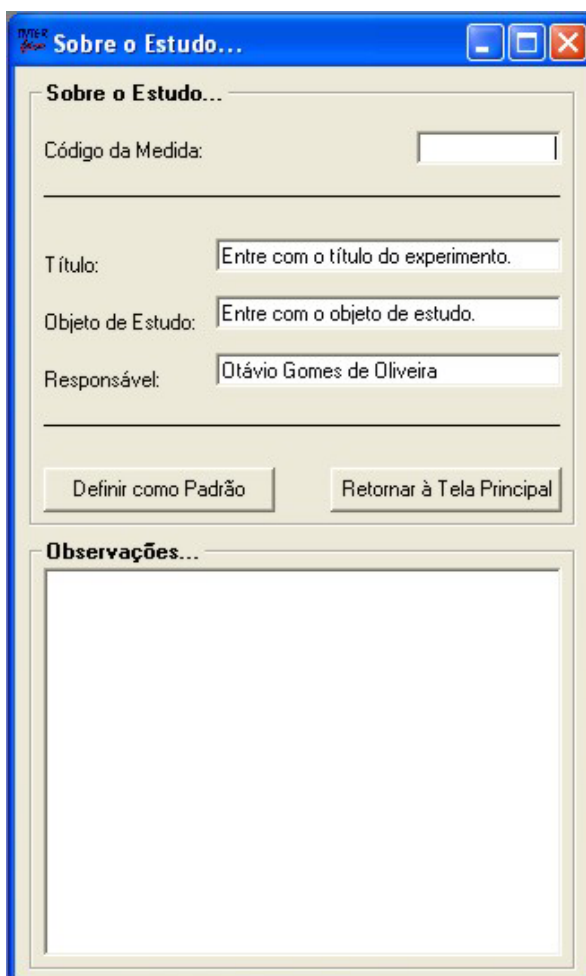


Figura 2.20. Tela de informações sobre o experimento a ser realizado.

A figura 2.21 mostra como o **INTERface** organiza e armazena os dados colhidos durante o experimento. O arquivo gerado pode ser aberto em qualquer programa editor de textos. Os dados são organizados de forma que podem ser facilmente importados por programas de edição de gráficos e de análise de dados como o OriginPro ou mesmo por editores de planilhas como o Microsoft Excel. No

arquivo são gravadas as informações que especificam o experimento em questão e também as observações criadas pelo usuário no ato de configuração do **INTERface**.

```

Auto varredura com cianobactérias 13.txt - Bloco de notas
Arquivo Editar Formatar Exibir Ajuda
VARREDURA AUTOMÁTICA!! MEDIDA 13
Intervalo de tempo entre as varreduras: 15 minutos
Código: Auto varredura com cianobactérias 13
Título: Entre com o título do experimento.
Objeto de estudo: Entre com o objeto de estudo.
Responsável: Otávio Gomes de Oliveira
Data: 12/1/2007
Horário de Início: 12:29:58
Temperatura em °C (Sensor 1 - Sensor 2): 25.25 - 27.38

-----
Posição (cm) | Intensidade Relativa | Tempo (s) | Intensidade (V)
-----
00,00 ; 0,997 ; 0,02 ; 1,328
00,13 ; 0,998 ; 0,35 ; 1,330
00,26 ; 0,996 ; 0,70 ; 1,327
00,39 ; 0,995 ; 1,02 ; 1,326
00,52 ; 0,994 ; 1,36 ; 1,324
00,65 ; 0,993 ; 1,70 ; 1,323
00,78 ; 0,996 ; 2,05 ; 1,326
00,91 ; 0,997 ; 2,39 ; 1,328
01,04 ; 0,997 ; 2,73 ; 1,328

36,55 ; 0,600 ; 93,08 ; 1,076
36,66 ; 0,743 ; 93,41 ; 0,990
36,79 ; 0,675 ; 93,74 ; 0,899
36,92 ; 0,604 ; 94,07 ; 0,805
37,02 ; 0,556 ; 94,32 ; 0,741
Horário de Término: 12:31:32
Duracao (s): 094,32
Intensidade de Referência: 1,331
Escala: Posição (cm)
Intervalo de escala vertical: de 0,6 a 1,3
Intervalo de escala horizontal: de 0 a 40,00
Experimento com elevador em movimento (descendo).
OBSERVAÇÕES: Coloquei Cyllindrospermopsis
raciborskii NPC51 às 8:50hs sem cobertura escura.

```

Figura 2.21. Imagem do arquivo de dados gerado após uma varredura.

A figura 2.22 a seguir mostra uma foto do equipamento construído, destacando-se a unidade óptica, o sistema mecânico e o tubo.

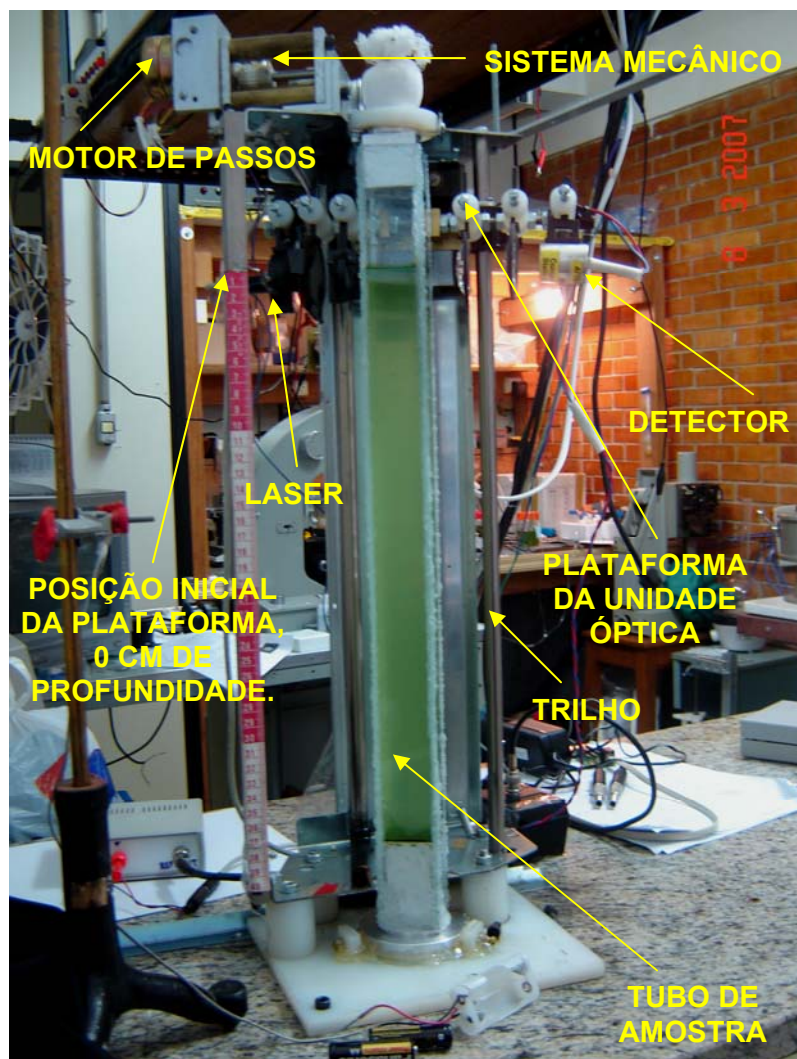


Figura 2.22. Equipamento de varredura.

2.2.3 – EXPERIMENTOS REALIZADOS COM O EQUIPAMENTO DE VARREDURA

Uma vez construído o equipamento, pôde-se passar para a etapa experimental. Foram realizados experimentos para certificar o correto funcionamento do equipamento e ilustrar o uso do aparelho para diversos procedimentos, além de sugerir estudos mais aprofundados em alguns deles. Nesta seção, serão descritos os procedimentos experimentais realizados com este aparelho, destacando a motivação para cada um deles. Os resultados serão apresentados no capítulo 3, seguidos de discussões. Os experimentos realizados foram os seguintes:

- 1 - Avaliação da estabilidade do sinal no tempo, usando-se água;
- 2 - Experimento ilustrativo da sedimentação de partículas de pó de café;
- 3 - Determinação da variação do sinal com a concentração de organismos e avaliação da sensibilidade do equipamento;
- 4 - Experimento ilustrativo da ação de água sanitária em amostras de *Cylindrospermopsis raciborskii*;
- 5 - Aplicação de leds de alta luminosidade e diferentes frequências em amostras de *Cylindrospermopsis raciborskii*;
- 6 - Aplicação de UV em amostras de *Cylindrospermopsis raciborskii* e
- 7 - Aplicação de pressão sobre amostras de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Alguns dados, quando envolviam apenas duas dimensões, foram tratados com o software OriginPro 7.5. Quando três dimensões eram necessárias, os dados foram manipulados com o MatLab Release 12.

Experimento 1 – Estabilidade do sinal no tempo

Para a realização de experimentos contendo organismos vivos, é fundamental que se conheça exatamente qual é a amplitude de variação do sinal ao longo de grandes intervalos de tempo. Isso é importante para que possíveis flutuações intrínsecas do sistema eletrônico não gerem interpretações errôneas dos dados. Determinando-se um limiar máximo de variação do sinal analógico, pode-se adotar este valor como um limite mínimo de sensibilidade do equipamento.

Para se determinar esses valores, foi conduzido um experimento com uma amostra de água destilada. Como não foram adicionadas partículas na água, espera-se que o resultado reflita exatamente as oscilações provenientes da própria construção eletrônica e mecânica. O equipamento foi configurado para realizar varreduras ao longo de todo o tubo em intervalos de 15 minutos entre o final de uma e o início da varredura seguinte. A altura da coluna de água ultrapassava a posição inicial da plataforma que contém a unidade óptica. É importante destacar que o equipamento de varredura leva aproximadamente 3 minutos e 10 segundos para

realizar uma varredura e posicionar a plataforma na posição inicial para a varredura seguinte. Então, o intervalo entre o início de duas varreduras foi configurado para 18 minutos e 10 segundos. O experimento teve duração de aproximadamente 2000 minutos, isto é, 1 dia e 9 horas. Depois, o mesmo procedimento foi realizado também para uma amostra de água de torneira. A duração deste foi de aproximadamente 1300 minutos, isto é, pouco mais de 21 horas e 30 minutos. Esses experimentos possibilitaram a determinação do limiar de variação do sinal, bem como a avaliação da estabilidade mecânica do equipamento.

Experimento 2 – Sedimentação de partículas de pó de café

Uma vez avaliada a confiabilidade do aparelho, é interessante que sejam conduzidos experimentos com partículas não vivas. Isso porque esse sistema é mais simples e permite a verificação de um determinado processo que seja previamente conhecido. Com isso, pode-se verificar a resposta do equipamento para o processo em questão, e verificar se a mesma corresponde ao esperado. Organismos vivos, por outro lado, podem introduzir diversos fatores complicadores na análise de algum fenômeno, não servindo, portanto, como ilustração e avaliação do funcionamento do equipamento.

Sabendo-se que, quando café em pó é adicionado a uma porção de água, as partículas sedimentam com o passar do tempo, foi conduzido um experimento para ilustrar o processo de sedimentação de partículas. Colocou-se água no tubo de amostra do aparelho até uma altura que ultrapassasse a posição inicial da plataforma. Então, adicionou-se um determinado volume de pó de café comercial na amostra e logo em seguida a amostra foi homogeneizada. O equipamento foi configurado para realizar varreduras em intervalos de tempo de 2 minutos entre o final de uma e o início da seguinte. Esse experimento é importante por permitir a visualização do processo de sedimentação a olho nu nos primeiros instantes. Com isso, pôde-se ter uma idéia exata da forma do gráfico, gerado pelos dados adquiridos, que caracteriza um processo de sedimentação. Dessa forma, pode-se usar a análise gráfica para caracterizar um processo desse tipo quando o mesmo não puder ser observado a olho nu.

Experimento 3 – Variação do sinal com a concentração de organismos

Uma vez que a confiabilidade do equipamento foi avaliada mediante a verificação da estabilidade do sinal analógico gerado pelo lock-in e a validação do

resultado gerado por um fenômeno conhecido, resta conhecer qual é a sensibilidade do equipamento para determinada espécie de organismos de interesse. Como este trabalho dá enfoque à espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, foi conduzido um experimento para se determinar um limite mínimo de variação na concentração desses organismos, passível de ser detectado pelo equipamento de varredura.

Neste experimento, colocou-se 70 ml de amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* NPCS-1 com concentração de $25,6 \times 10^6$ células/ml e comprimento médio de células de $4,45 \mu\text{m}$. Posicionou-se a plataforma imediatamente abaixo da superfície do líquido no tubo. A amostra foi sendo diluída com meio de cultura ASM-1. A cada 5 ml de meio adicionados, a amostra era homogeneizada e uma leitura do sinal era feita. Conhecendo-se a concentração inicial de células, pode-se determinar a concentração para cada novo volume através da equação 2.6 e então relacioná-la ao sinal lido no **INTERface**.

$$C = \frac{C_i \cdot V_i}{V_i + V_M}, \quad (\text{eq. 2.6})$$

onde C_i é a concentração inicial, V_i é o volume inicial, V_M é o volume de meio de cultura acrescentado ao volume inicial e C é a concentração corresponde ao sistema de novo volume $V_i + V_M$.

Com isso, tem-se um gráfico da variação do sinal com a concentração de organismos na amostra. A partir desse gráfico, pode-se determinar a sensibilidade de leitura do equipamento, isto é, o mínimo de variação de concentração passível de ser observado com o aparelho.

Experimento 4 – Experimento da adição de água sanitária em uma amostra de Cylindrospermopsis raciborskii

Avaliada a confiabilidade do equipamento e verificada a sensibilidade do mesmo, tem-se bases suficientes para a realização de experimentos com os organismos. O primeiro experimento realizado possui um caráter ilustrativo, motivado por curiosidade.

Quando a uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* é adicionada água sanitária (hipoclorito de sódio), essa amostra adquire uma coloração amarelada, indicando morte dos organismos. Quando os organismos morrem, o espalhamento de

luz é menor e a porção de luz transmitida aumenta. Assim, o sinal adquirido pelo computador é maior. Sendo assim, dois experimentos foram conduzidos à título de comparação. No primeiro, foram adicionadas 11 gotas de água sanitária a uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* que se encontrava no tubo de amostras. Mas essas gotas foram adicionadas no centro do tubo e a uma distância da superfície da amostra da ordem de 10 cm. O equipamento foi então configurado para realizar varreduras consecutivas, isto é, o intervalo de tempo entre elas é nulo. Já no segundo, as mesmas 11 gotas foram adicionadas, mas, dessa vez, espalhadas por toda a superfície do tubo e a uma distância cerca de dez vezes menor. Novamente, o aparelho foi ajustado para realizar varreduras consecutivas. Este experimento é uma ilustração da dispersão da água sanitária pela amostra em dois casos distintos. No primeiro, os volumes de água sanitária tinham uma velocidade inicial (velocidade com que estes começam a penetrar na amostra) maior e atingiam sempre um ponto específico da superfície do líquido. No segundo, a velocidade inicial era menor e as gotas eram dispersas por toda a superfície. Os resultados serão apresentados no capítulo 3 para comparação.

Experimento 5 – Aplicação de leds de alta luminosidade e diferentes frequências.

Como já mencionado, as cianobactérias podem usar sua capacidade de migração vertical para procurar por melhores condições físicas e químicas para seu crescimento. Entre as condições físicas, destaca-se a luz (CHORUS *et al.*, 1999). Por isso, conduziu-se um experimento de aplicação de luz em uma determinada profundidade, para que o comportamento dos organismos pudesse ser avaliado mediante a presença desse fator externo. Então, uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii*, cepa NPC5-1, foi colocada no tubo e o aparelho foi configurado para realizar varreduras em intervalos de 15 minutos. O equipamento foi colocado no escuro. Cerca de 23 horas depois, leds de alta luminosidade foram posicionados perpendicularmente ao tubo em uma profundidade específica. Esse tempo em que a amostra permaneceu no escuro é importante para que se tenha um padrão de distribuição de organismos para ser comparado com aquele gerado após a aplicação dos leds. Inicialmente, dois leds azuis foram posicionados na profundidade de 20 cm. 26 horas depois, esses mesmos leds foram posicionados em 29 cm e cerca de 23 horas depois, foram colocados em 3 cm de profundidade. Mais 29 horas e os leds azuis foram substituídos por outros dois leds brancos também de alta intensidade. Estes foram posicionados na profundidade de 20 cm. Vinte e seis horas depois, eles

foram substituídos por dois leds verdes que foram colocados em 15 cm. 17 horas mais tarde, eles foram posicionados em 29 cm e, por fim, 27 horas depois, os mesmos leds foram ligados na profundidade de 12 cm. Todas essas profundidades são medidas em relação à superfície da amostra.

Também foi conduzido um experimento com leds vermelhos de alta intensidade. O procedimento foi semelhante aos anteriores, isto é, dois leds foram ligados na profundidade de 16 cm em uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* diferente daquela usada nos experimentos anteriores.

O instante de troca das posições dos leds, bem como de suas cores foi aleatório e motivado pelos resultados parciais que eram obtidos. No capítulo 3, serão mostrados os resultados, destacando cada uma das situações descritas. Os leds eram alimentados por duas pilhas alcalinas. A tensão nas pilhas era monitorada periodicamente para garantir que a luminosidade gerada pelos leds não era significativamente alterada com o passar do tempo. Neste experimento, a amostra de cianobactérias foi colocada de forma que a altura da coluna do líquido coincidissem com a posição inicial da plataforma que contém a unidade óptica. As figuras 2.23 e 2.24, a seguir, exibem os espectros de emissão dos leds apresentados, destacando os picos de emissão em cada caso, segundo SILVA (2005).

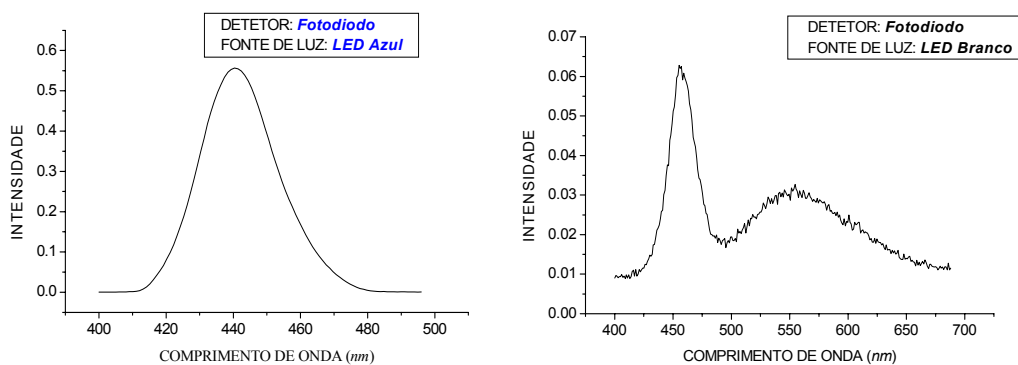


Figura 2.23. Espectro de emissão dos leds azul e branco. Pico de emissão do led azul: 440 nm. Picos de emissão do led branco: 457 nm e 554 nm (SILVA, 2005).

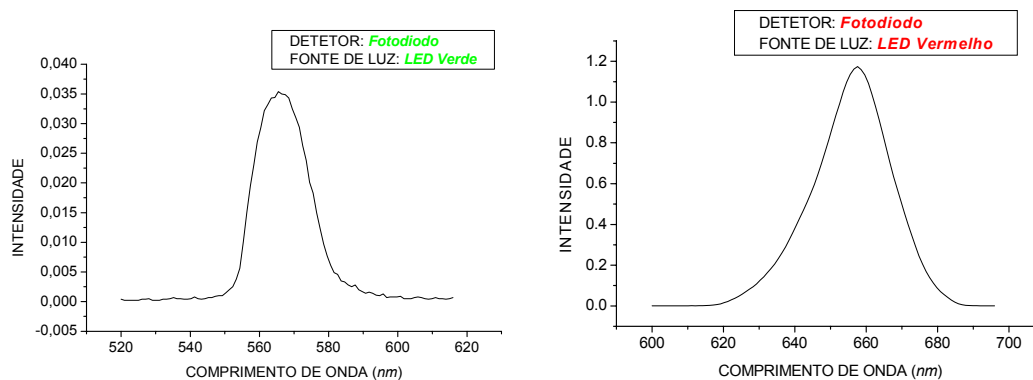


Figura 2.24. Espectro de emissão dos leds verde e vermelho. Pico de emissão do led verde: 565 nm. Pico de emissão do led vermelho: 657 nm (SILVA, 2005).

Experimento 6 – Aplicação de UV

Um outro fator externo a ser explorado é a luz ultravioleta. Nas seções anteriores, foi destacado que as proteínas constituem um dos principais alvos do UV-B na célula. Pelo fato de que os aerótopos são constituídos exclusivamente de proteínas, é de se esperar, então, que a incidência de luz ultravioleta cause algum dano a essas estruturas. Como os aerótopos possuem papel fundamental na regulação da fluvariabilidade dos organismos, espera-se que esta seja diretamente afetada pela luz UV.

Assim, foi conduzido um experimento em que luz ultravioleta era incidida sobre uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* durante um determinado período de tempo. A intensidade de UV-B incidindo sobre a amostra foi medida com o detector IL1400A da International Light, cedido pelo Laboratório de Ecologia Aquática. Acompanha esse equipamento, um sensor para a faixa de UV-B e outro para UV-A. Como neste trabalho, o foco é sobre a radiação UV-B, usou-se sempre o sensor apropriado. Assim como no experimento descrito anteriormente, a amostra foi colocada no tubo e o equipamento foi configurado para realizar varreduras em intervalos de 15 minutos. Neste caso, a altura da coluna de amostra ultrapassava a posição inicial da plataforma da unidade óptica. Somente cerca de 25 horas depois, a amostra foi tratada pela primeira vez com radiação UV. A densidade de potência medida na altura da superfície da amostra foi de $44 \mu\text{Wcm}^{-2}$ e o tempo de exposição, de 20 minutos. Cerca de 48 horas depois, a amostra foi novamente irradiada por uma densidade de potência de UV-B de $37 \mu\text{Wcm}^{-2}$ durante 60 minutos. Mais 49 horas e a mesma amostra foi irradiada por uma densidade de potência de UV-B de $140 \mu\text{Wcm}^{-2}$

por 60 minutos. Durante todo o tempo, a amostra permaneceu no escuro. A lâmpada de ultravioleta utilizada foi a HBO200 de mercúrio da PerkinElmer optoelectronics. Na figura 2.25, pode-se observar que ela possui picos de emissão em UV-B, UV-A e UV-C, sendo os mais intensos os de UV-A e UV-B.

A título de comparação, vale comentar que a densidade de potência medida em um dia de verão, com tempo aberto, usando o mesmo detector, no Departamento de Física da UFJF é da ordem de $100 \mu\text{Wcm}^{-2}$.

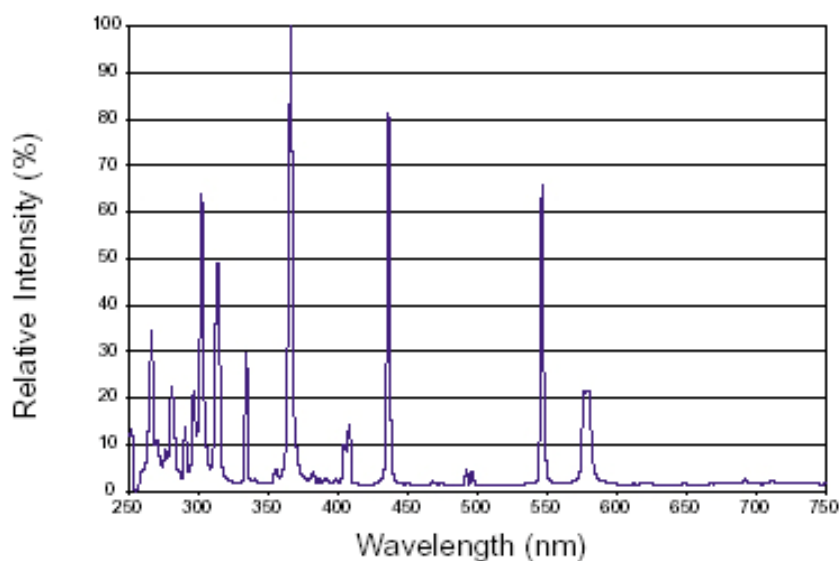


Figura 2.25. Espectro de emissão da lâmpada HBO200. O eixo das abscissas corresponde ao comprimento de onda em nanômetros e o eixo das ordenadas corresponde à intensidade de emissão.

Na figura 2.26, a seguir, é exibida uma foto da montagem experimental preparada para a aplicação de ultravioleta sobre uma amostra de organismos.

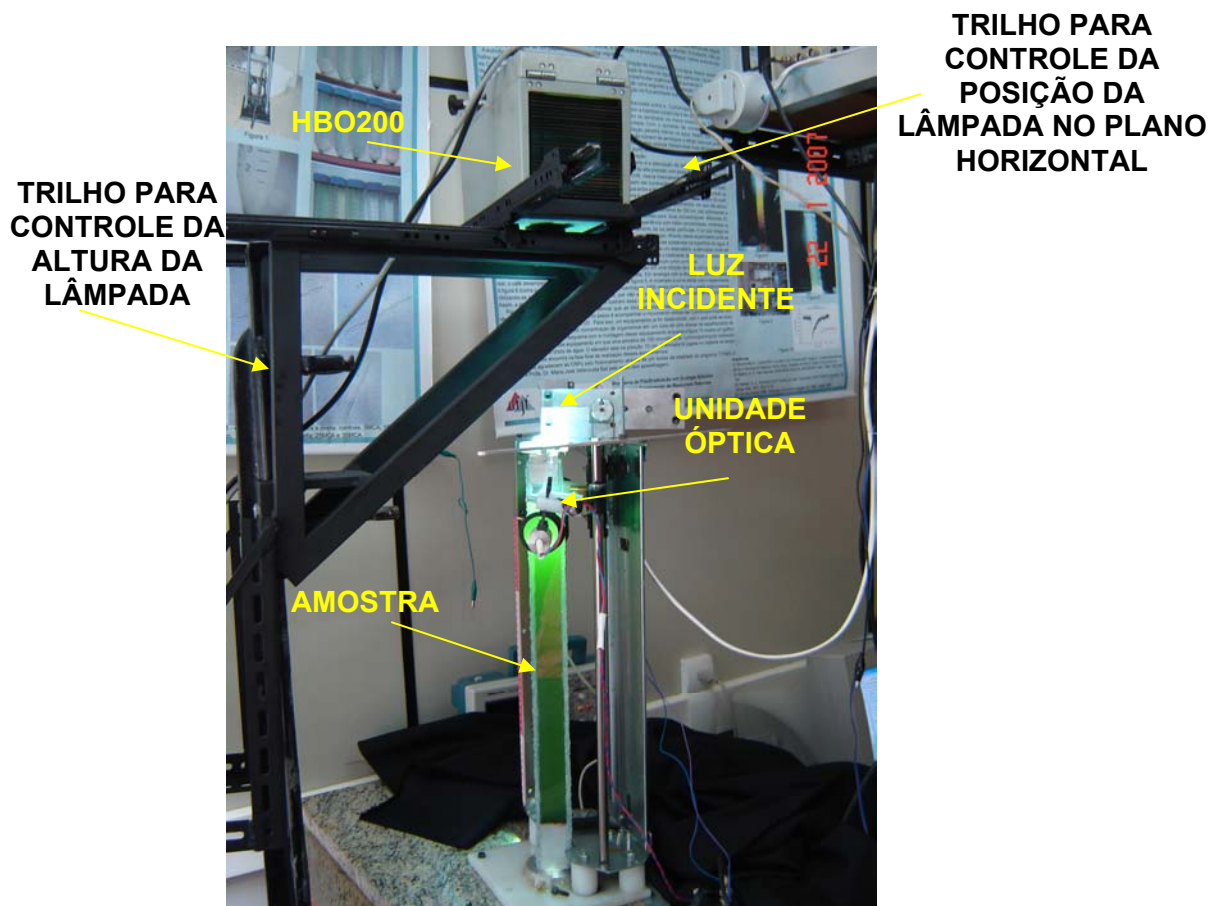


Figura 2.26. Aplicação de luz ultravioleta sobre uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Experimento 7 – Aplicação de Pressão

Na primeira parte do capítulo 2, foi descrito um equipamento para aplicação de pressão sobre uma amostra de organismos. Ele foi usado neste experimento, em que uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* foi submetida a 35 MCA de pressão e, logo em seguida, colocada no tubo do equipamento de varredura. A amostra ficou em ambiente escuro durante todo o experimento. O equipamento foi configurado para realizar varreduras em intervalos de 15 minutos. O experimento foi conduzido com duas amostras. Uma possuía uma concentração de $6,5 \times 10^6$ células/ml e a outra, $25,6 \times 10^6$ células/ml. Com um experimento desse tipo, pode-se calcular a velocidade de sedimentação desses organismos e, então, estimar a densidade dos organismos após a aplicação da pressão. Para isso, a seção 2.2.4 mostra um modelo matemático que estabelece uma relação entre a taxa de sedimentação e a diferença entre as densidades das partículas que sedimentam (os organismos, no caso) e do líquido.

2.2.4 – CÁLCULO DA TAXA DE SEDIMENTAÇÃO DE PARTÍCULAS

Para relacionar a velocidade de sedimentação dos organismos com a variação de densidade dos mesmos, convém introduzir o conceito de sedimentação a partir de uma análise mecânica simples. Seja dada uma determinada partícula de massa m_p , volume V_p e, conseqüentemente, densidade ρ_p em meio aquoso (fluido) de densidade ρ_l e viscosidade η . Ambos o fluido e a partícula estão sujeitos apenas à ação de um campo gravitacional com aceleração g , conforme a figura 2.27 a seguir.

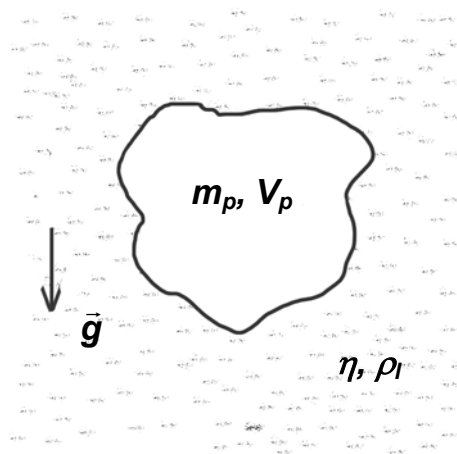


Figura 2.27. Partícula de massa m_p e volume V_p imersa em um meio aquoso de viscosidade η e densidade ρ_l .

A força líquida sobre a partícula é:

$$\vec{F} = m' \vec{g} . \quad (\text{eq. 2.7})$$

Na equação 2.7, m' é a massa efetiva da partícula, isto é, a massa da partícula descontada da massa do fluido deslocado, como mostra a equação 2.8.

$$m' = m - V_p \rho_l . \quad (\text{eq. 2.8})$$

Ocorre que, no vácuo, a força líquida que atua sobre a partícula é a própria força peso enquanto que, em um fluido, a força líquida é reduzida por uma quantidade $V_p g \rho_l$, que é a força devido à flutuabilidade. Assim, pode-se chegar às seguintes conclusões:

1. Se $m' > 0 \Rightarrow V_p \rho_l < m \Rightarrow$ a partícula afunda.
2. Se $m' < 0 \Rightarrow V_p \rho_l > m \Rightarrow$ a partícula flutua.
3. Se $m' = 0 \Rightarrow V_p \rho_l = m \Rightarrow$ a partícula permanece parada.

Para o caso de uma partícula esférica, de raio R , a massa efetiva pode ser escrita da seguinte forma:

$$m' = \rho_p V_p - V_p \rho_l = \frac{4}{3} \pi R^3 (\rho_p - \rho_l). \quad (\text{eq. 2.9})$$

A força de arrasto é dada pela equação 2.10:

$$\vec{F} = \gamma \vec{v}, \quad (\text{eq. 2.10})$$

onde γ é o coeficiente de arrasto, que é dado pela fórmula de Stokes (eq. 2.11) (LANDAU et al., 1987).

$$\gamma = 6\pi\eta R. \quad (\text{eq. 2.11})$$

Igualando as equações 2.7 e 2.10, tem-se:

$$\gamma v = m'g \Rightarrow v = \frac{m'g}{\gamma} = \frac{2}{9} \frac{R^2 (\rho_p - \rho_l) g}{\eta}. \quad (\text{eq. 2.12})$$

Para o caso em que as partículas são cilíndricas, como os tricomas de *Cylindrospermopsis raciborskii*, a fórmula de Stokes não é válida na forma apresentada. HOWARD (2001) e TIRALDO *et al.* (1980) apresentam os coeficientes de arrasto para cilindros. Para o caso em que o eixo do cilindro é paralelo ao movimento vertical da partícula, a força de arrasto é dita paralela ($F_{||}$). Por outro lado, quando o eixo do cilindro é perpendicular à direção de movimento da partícula, a força de arrasto é dita perpendicular (F_{\perp}). A cada um desses casos, está associado um coeficiente de arrasto. Então, para um caso de movimentos aleatórios, é razoável admitir um coeficiente de arrasto médio ($\bar{\gamma}$), dado pela equação 2.13, a seguir.

$$\bar{\gamma} = \frac{\gamma_{||} + \gamma_{\perp}}{2}, \quad (\text{eq. 2.13})$$

onde os coeficientes de arrasto paralelo ($\gamma_{||}$) e perpendicular (γ_{\perp}) são dados por:

$$\gamma_{||} = \frac{2\pi\eta L}{\ln(L/2r) - 0,20} \text{ e } \gamma_{\perp} = \frac{4\pi\eta L}{\ln(L/2r) + 0,84}. \quad (\text{eq. 2.14})$$

L é o comprimento do cilindro e r é o seu raio. As expressões na equação 2.14 são válidas para o limite $L \gg r$.

Assim, a velocidade de sedimentação para partículas cilíndricas pode ser escrita da forma:

$$v = \frac{m'g}{\bar{\gamma}} = \frac{V_{cil}(\rho_p - \rho_l)g}{\bar{\gamma}} = \frac{\pi.r^2 L(\rho_p - \rho_l)g}{\bar{\gamma}} \Rightarrow v = \frac{r^2 g \Delta\rho}{\eta\Omega}, \quad (\text{eq. 2.15})$$

onde V_{cil} é o volume do cilindro e $\Delta\rho$ é a diferença entre as densidades da partícula cilíndrica e do fluido e Ω é uma grandeza adimensional, dada pela equação 2.16.

$$\Omega = \frac{1}{\ln(L/2r) - 0,2} + \frac{2}{\ln(L/2r) + 0,84}. \quad (\text{eq. 2.16})$$

2.3 – EXPERIMENTOS COM A ATENUAÇÃO DE RADIAÇÃO UV

Como discutido na seção 1.1.3, a radiação ultravioleta é um fator importante que pode determinar a sobrevivência e manutenção de uma determinada população de cianobactérias. Foi comentado, por exemplo, que a atenuação do ultravioleta na água depende das propriedades ópticas da água, isto é, da composição de partículas do meio. Assim, as partículas presentes em um determinado ambiente aquático são fundamentais na atenuação de radiação ultravioleta. Em lagos turvos, com maior concentração de nutrientes, o UV penetra pouco na água, ao passo que em águas limpas, a radiação UV penetra até maiores profundidades. Para ilustrar o papel que as partículas suspensas na água desempenham na filtragem de radiação UV, foi montado um sistema para determinação do coeficiente de atenuação de amostras de água contendo diferentes partículas. Nestes experimentos, o detector UV-B, já citado, foi instalado no fundo de um tubo de vidro que armazenava as amostras. Luz UV,

proveniente de uma lâmpada de mercúrio HBO200, era incidida pela parte superior do tubo. Com a adição de um determinado volume de amostra, o sinal no detector era lido. Com a variação do volume de amostra, a altura da coluna de amostra entre o detector e a lâmpada era medida, bem como o valor do sinal correspondente lido no detector. Com isso, pôde-se construir um gráfico da altura da coluna de amostra versus intensidade do sinal. Tratando esses dados em OriginPro 7.5, pôde-se obter o coeficiente de atenuação para cada situação.

A primeira parte de experimentos consistiu na obtenção de dados para a atenuação de UV-B para água de torneira. Logo após, o mesmo procedimento foi usado para a determinação do coeficiente de atenuação para amostras de microesferas de poliestireno de duas concentrações diferentes. Uma amostra com $5,5 \times 10^8$ microesferas/ml e outra com $9,1 \times 10^9$ microesferas/ml. A atenuação observada no caso das microesferas é devido a efeitos de espalhamento.

O segundo experimento consistiu em utilizar partículas que atenuassem a radiação UV-B incidente predominantemente via efeitos de absorção. Para isso, foi usado café solúvel comercial dissolvido em água. Isso porque o café absorve o ultravioleta. O fato de estar em solução, elimina efeitos de espalhamento. Então, o mesmo procedimento foi realizado para obtenção do coeficiente de atenuação para este caso. Logo após, o experimento foi repetido para café em pó. Neste caso, estão presentes os dois efeitos: o de absorção, pela natureza do café e o de espalhamento, pelo caráter de partícula dos grânulos. Este último remete à situação real em um corpo de água, por mesclar os dois efeitos na atenuação da radiação incidente.

E na terceira parte, foram conduzidos experimentos para determinação do coeficiente de atenuação de amostras de *Cylindrospermopsis raciborskii* para UV-B. O procedimento é o mesmo usado nos experimentos anteriores e foi conduzido para três diferentes concentrações de organismos. A primeira de $25,6 \times 10^6$ células/ml, a segunda de $12,8 \times 10^6$ células/ml e a última de $8,53 \times 10^6$ células/ml.

2.4 – ELETROFORESE

A fim de se verificar o potencial da radiação ultravioleta em quebrar ligações peptídicas em proteínas e, portanto, reduzir o conteúdo protéico total nas células

expostas, foi realizada uma eletroforese de proteínas isoladas de uma amostra de organismos expostos a diferentes dosagens de radiação ultravioleta.

Então, inicialmente uma população de *Cylindrospermopsis raciborskii* foi exposta à radiação ultravioleta da lâmpada de UV HBO200 com uma densidade de potência inicial de UV-B de $18 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Amostras foram coletadas com 10, 20, 30, 40 e 60 minutos de exposição. Após os primeiros 60 minutos, a população passou a ser irradiada por $180 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ e amostras foram coletadas com 10 e 20 minutos de exposição à alta intensidade. A temperatura foi monitorada para garantir que o experimento não seria afetado por variações na mesma. Sendo assim, as amostras coletadas para a eletroforese, receberam doses de UV-B de $180 \mu\text{W}\cdot\text{min.}/\text{cm}^2$, $360 \mu\text{W}\cdot\text{min.}/\text{cm}^2$, $540 \mu\text{W}\cdot\text{min.}/\text{cm}^2$, $720 \mu\text{W}\cdot\text{min.}/\text{cm}^2$, $1080 \mu\text{W}\cdot\text{min.}/\text{cm}^2$, $2880 \mu\text{W}\cdot\text{min.}/\text{cm}^2$ e $4680 \mu\text{W}\cdot\text{min.}/\text{cm}^2$. Foi também separada uma amostra de controle, não irradiada pelo ultravioleta.

Para a eletroforese, a dosagem de proteínas foi realizada segundo o método de Lowry. Em seguida, foi realizado o SDS page. Trinta e cinco microgramas de proteínas foram colocados em cada poço do gel de acrilamida utilizado. Após este processo, o gel foi corado por prata.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, serão apresentados os resultados de cada um dos experimentos descritos anteriormente, seguidos de comentários e esclarecimentos.

3.1 – TESTES COM APLICAÇÃO DE PRESSÃO

A figura 3.1 mostra os tubos que sofreram pressão e o tubo controle 4 e 24 horas após a realização dos experimentos. A figura 3.2 mostra os tubos após 48 horas. Nas três figuras tem-se, da esquerda para a direita, o tubo controle, o tubo que sofreu 5 MCA de pressão, o de 15 MCA, 25 MCA e o último na direita é o de 35 MCA.

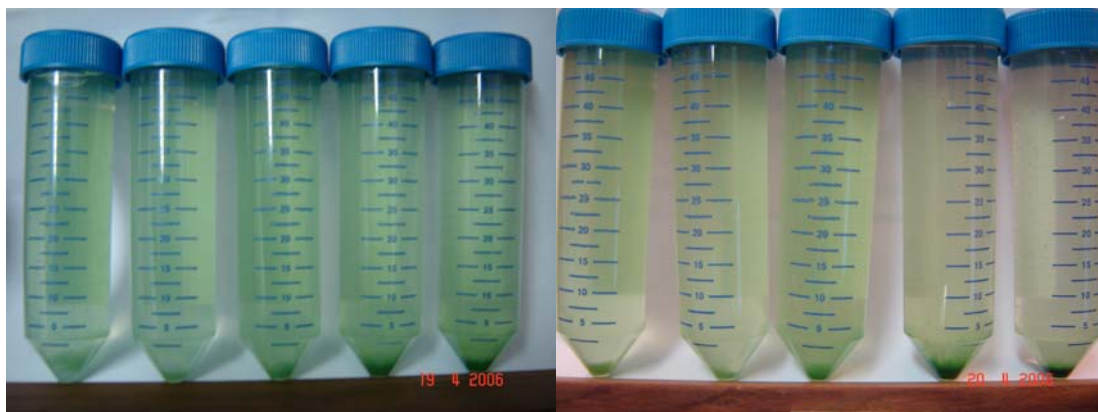


Figura 3.1. Amostras submetidas a diferentes pressões, 4 horas após a aplicação (esquerda) e 24 horas após a aplicação (direita). Da esquerda para a direita nas duas figuras: tubo controle, 5 MCA, 15 MCA, 25 MCA e 35 MCA.



Figura 3.2. Amostras submetidas a diferentes pressões 48 horas após a aplicação. Da esquerda para a direita: tubo controle, 5 MCA, 15 MCA, 25 MCA e 35 MCA.

O que se pode concluir desses experimentos é que os valores de pressão de 5 MCA e de 15 MCA não foram suficientes para colapsar um número mínimo de aerótopos para que a sedimentação dos organismos pudesse ser vista a olho nu. Por isso não se observa diferenças nítidas de coloração do meio entre os tubos que sofreram a pressão e o controle. Entretanto, as pressões de 25 e 35 MCA foram suficientes para colapsar a maioria dos aerótopos da maior parte dos organismos. A nítida diferença de coloração entre os tubos de controle e os que receberam a pressão é resultado das diferenças na concentração de organismos em cada caso. Nas amostras que sofreram a pressão, o meio possui um aspecto transparente porque a concentração de organismos é muito baixa.

Fotos de microscópio mostram filamentos de *Cylindrospermopsis raciborskii* retirados do fundo de cada um dos tubos. Essas fotos são mostradas nas figuras 3.3, 3.4 e 3.5 e foram obtidas logo após a aplicação da pressão.

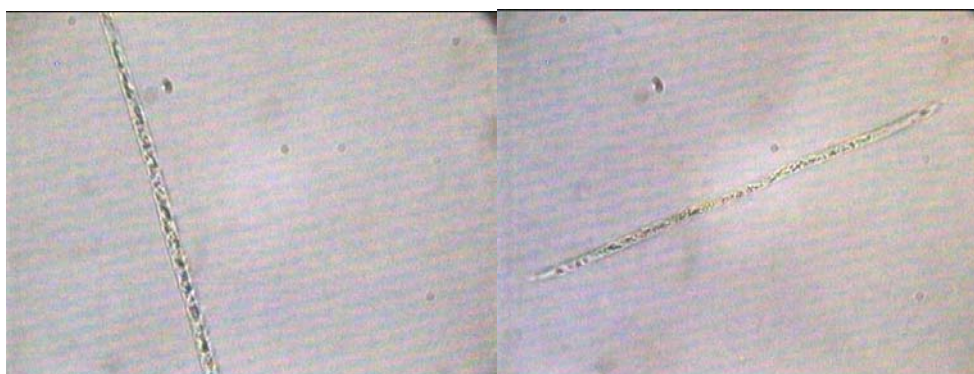


Figura 3.3. Filamento dos tubos de controle (esquerda) e do que sofreu 5 MCA de pressão (direita).

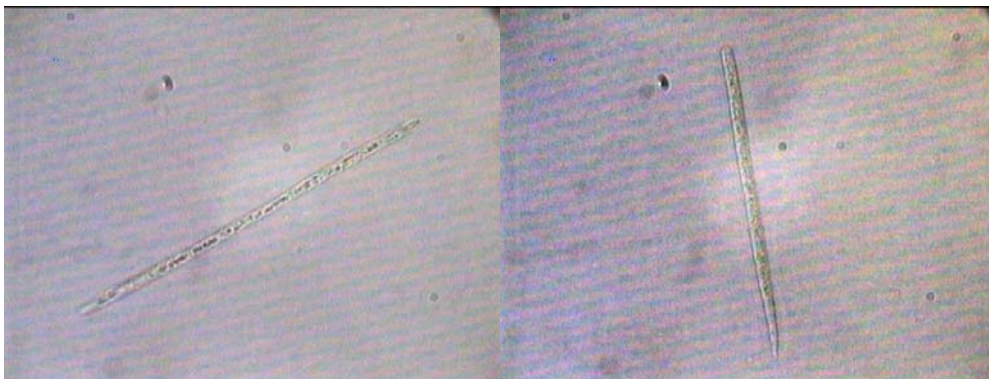


Figura 3.4. Filamentos dos tubos que sofreu 15 MCA de pressão (esquerda) e que sofreu 25 MCA de pressão (direita).



Figura 3.5. Filamento do tubo que sofreu 35 MCA de pressão.

Nas fotos, as manchas pretas no interior das células são os aerótopos. Por possuírem gases no seu interior, o índice de refração deles é significativamente diferente do índice do meio. Então os aerótopos acabam por atuar como partículas espalhadoras (WAALAND *et al.*, 1971). Como o microscópio utilizado funciona por transmissão de luz, as regiões onde existem os aerótopos aparecem como manchas pretas na foto.

Pode-se observar nas figuras 3.3 a 3.5 uma redução gradual da quantidade de aerótopos, conseqüência da pressão aplicada, que foi cada vez maior. Isso sugere que esta técnica pode ser usada para isolar amostras de *Cylindrospermopsis raciborskii* de um dado meio, uma vez que, quando aplicada uma pressão suficientemente grande, os organismos se sedimentam no fundo.

3.2 – EXPERIMENTOS COM O EQUIPAMENTO DE VARREDURA

Nessa seção, serão apresentados os resultados dos experimentos com o equipamento de varredura, que foram descritos na seção 2.2.3 do capítulo 2.

Experimento 1 – Estabilidade do Sinal no Tempo

Os dados gerados para o experimento de varredura de uma amostra de água destilada são exibidos nas figuras 3.6 e 3.7. Na figura 3.6, as dimensões no plano são a profundidade no tubo de amostra e o tempo decorrido desde o início do experimento. A dimensão representada por cores é a intensidade do sinal referente à porção de luz transmitida pela amostra. Deve-se salientar que essa intensidade do sinal é expressa em Volts, mas essa é uma escala arbitrária que depende do sistema eletrônico utilizado e dos ajustes do software de aquisição. Essa observação vale para todos os demais gráficos exibidos a frente.

Em ambos os gráficos, nota-se uma rápida queda na intensidade do sinal a partir da profundidade de 36 cm. Essa diminuição é devido ao fato de a plataforma da unidade óptica chegar ao fim do seu curso. Essa região indica o final da área útil de varredura do tubo.

A partir desses gráficos, nota-se que a intensidade do sinal varia de cerca de 70 mV entre os picos de maior e menor intensidade, considerando-se todo o tempo de experimento. Variações bruscas ao longo de toda a profundidade do tubo na faixa de 200 minutos e de 1800 minutos podem ser atribuídas à oscilações da rede de alimentação dos equipamentos.

O mesmo procedimento foi repetido para uma amostra de água de torneira. A análise feita anteriormente é válida também para este caso. A variação de sinal entre os picos de máximo e mínimo de intensidade também foi da ordem de 70 mV. O gráfico deste caso é exibido na figura 3.8 e 3.9.

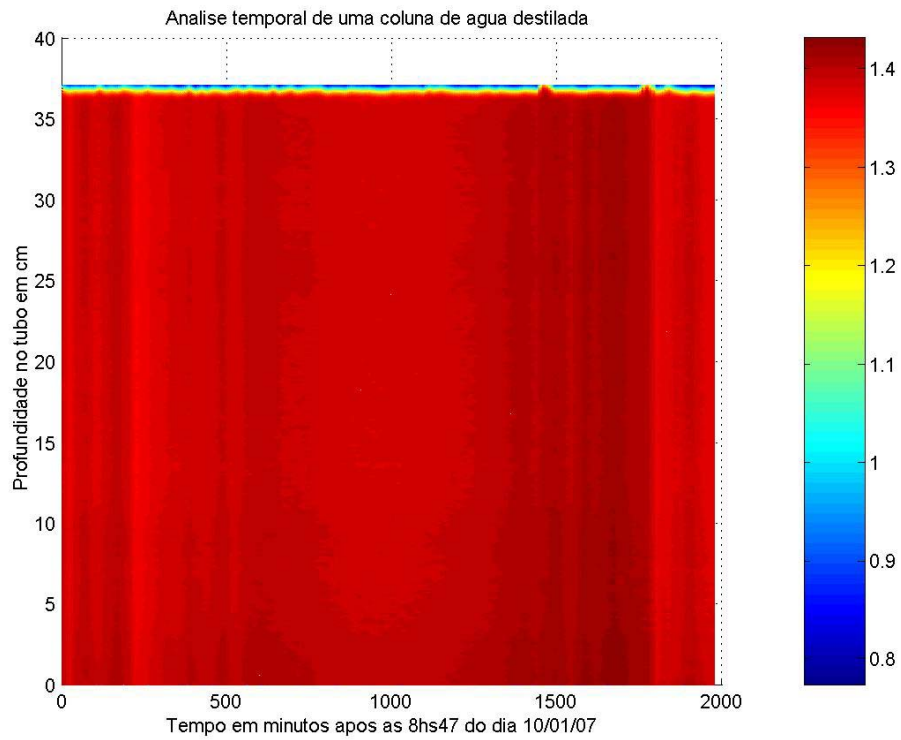


Figura 3.6. Análise temporal de uma coluna de água destilada – vista superior.

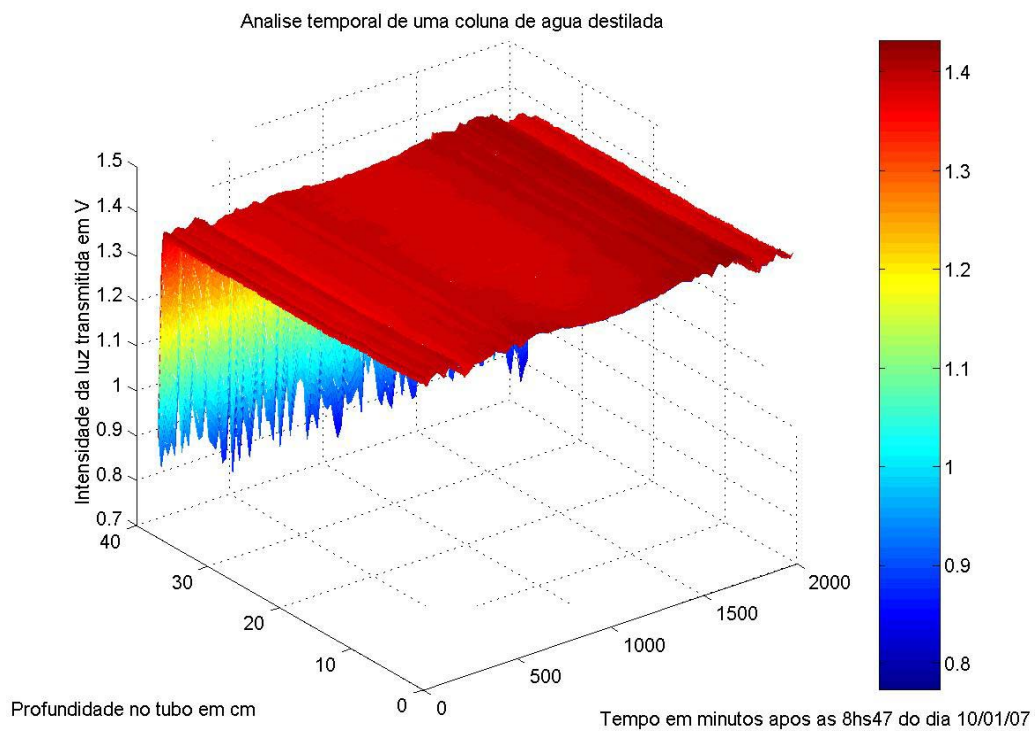


Figura 3.7 Análise temporal de uma coluna de água destilada.

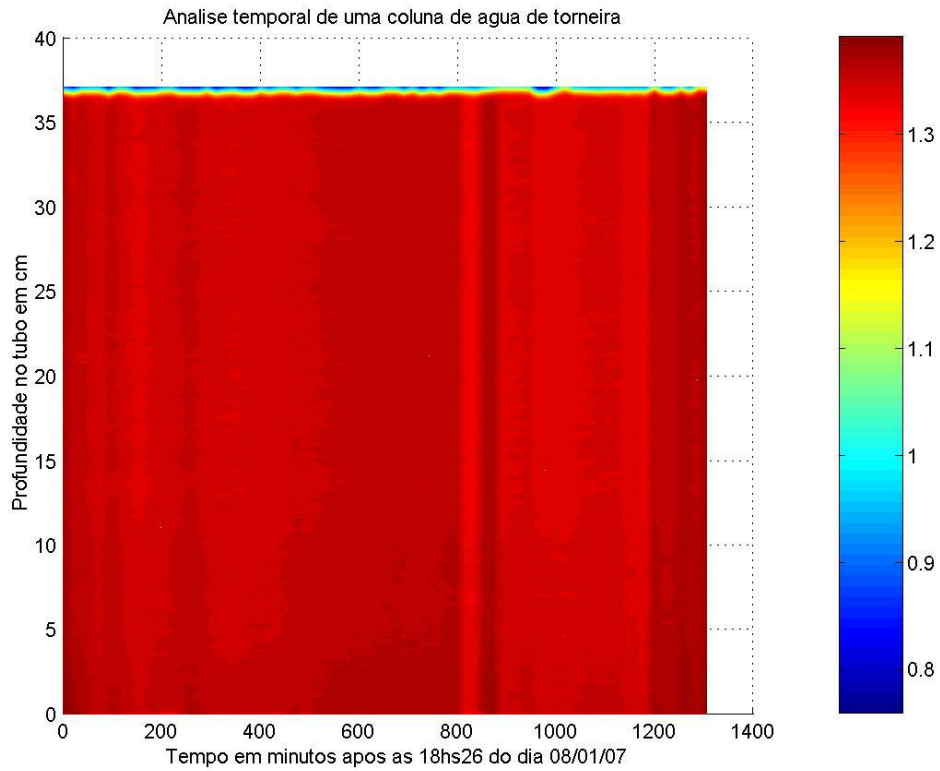


Figura 3.8. Análise temporal de uma coluna de água de torneira. Vista superior.

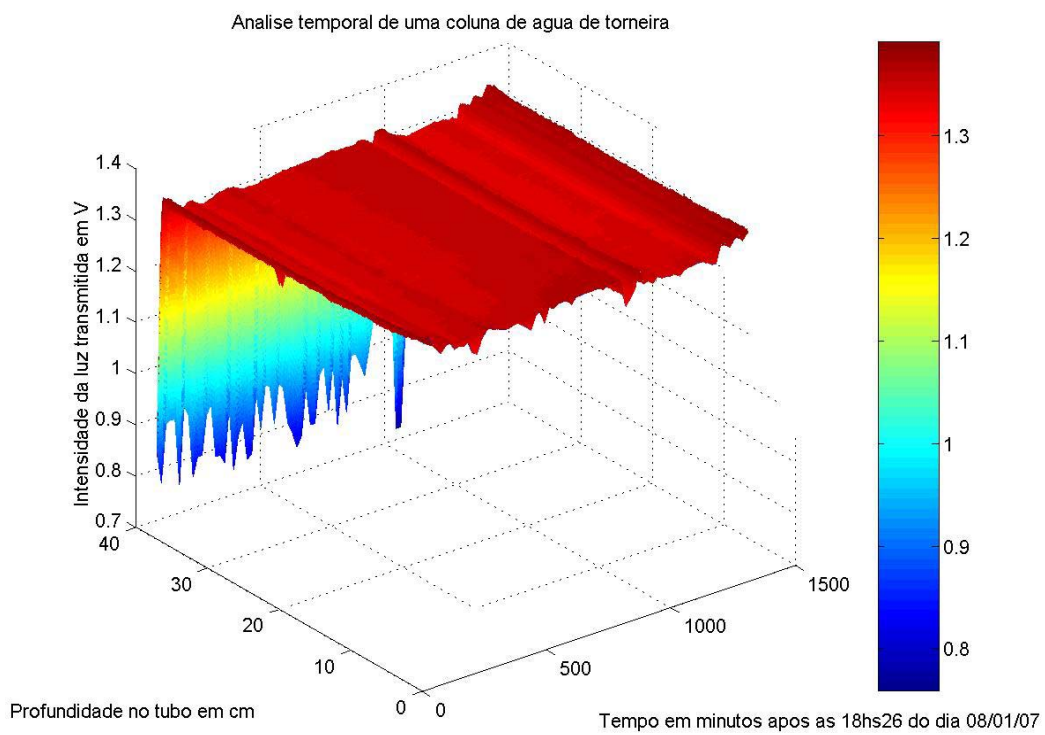


Figura 3.9. Análise temporal de uma coluna de água de torneira.

Com isso, conclui-se que 70 mV é o limiar de sensibilidade do equipamento, isto é, variações de sinal até esse limite em experimentos de longos períodos de tempo podem não corresponder à mudanças de concentração de partículas no tubo de amostra, mas sim à oscilações características do sistema eletrônico utilizado.

Além da determinação de um nível típico de oscilação do sinal, esses experimentos foram importantes para a avaliação da estabilidade do sinal como um todo ao longo do tempo e ainda para uma verificação do comportamento do sistema mecânico durante o procedimento. Quanto ao primeiro, o equipamento se mostrou estável, mantendo sempre a mesma intensidade de sinal a menos das oscilações já comentadas. Quanto ao sistema mecânico, o aparelho não apresentou nenhum tipo de falhas. O movimento da plataforma foi repetitivo e os dispositivos corretivos de posição se mostraram úteis e eficientes quando foram de fato necessários. Isso garantiu ao equipamento confiabilidade na realização de varreduras de forma totalmente automatizada.

Experimento 2 – Sedimentação de partículas de pó de café

Neste experimento, pôde-se observar o processo de sedimentação de partículas de pó de café. As figuras 3.10 e 3.11 mostram o resultado obtido. Com esses gráficos, nota-se uma velocidade de sedimentação da ordem de $200 \mu\text{ms}^{-1}$ nos primeiros 60 minutos. Deve-se destacar que o que se mede é a porção de luz transmitida pela amostra. Isso significa que quanto maior a intensidade do sinal, menor é a concentração de partículas espalhadoras de luz. Então, a escala de cores é invertida em relação à escala de concentração de partículas, isto é, as regiões com coloração mais voltada ao azul correspondem a uma maior concentração de partículas, enquanto aquelas com coloração mais avermelhada são caracterizadas por uma menor concentração dessas partículas. Essa observação é válida para todos os demais gráficos apresentados neste trabalho.

A importância desse experimento consiste em ilustrar um típico processo de sedimentação de partículas. Como são usadas partículas não vivas e o processo é passível de observação a olho nu, o gráfico obtido pode ser claramente caracterizado. Assim, criam-se bases para se perceber um processo semelhante em casos em que não se pode observar a olho nu.

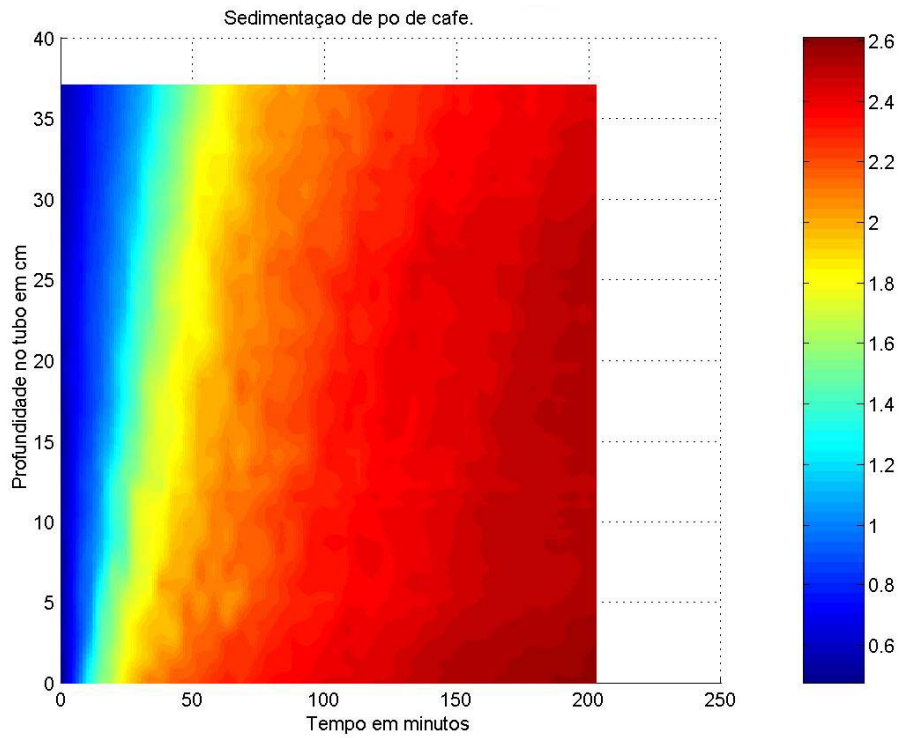


Figura 3.10. Processo de sedimentação de partículas de pó de café. Vista superior.

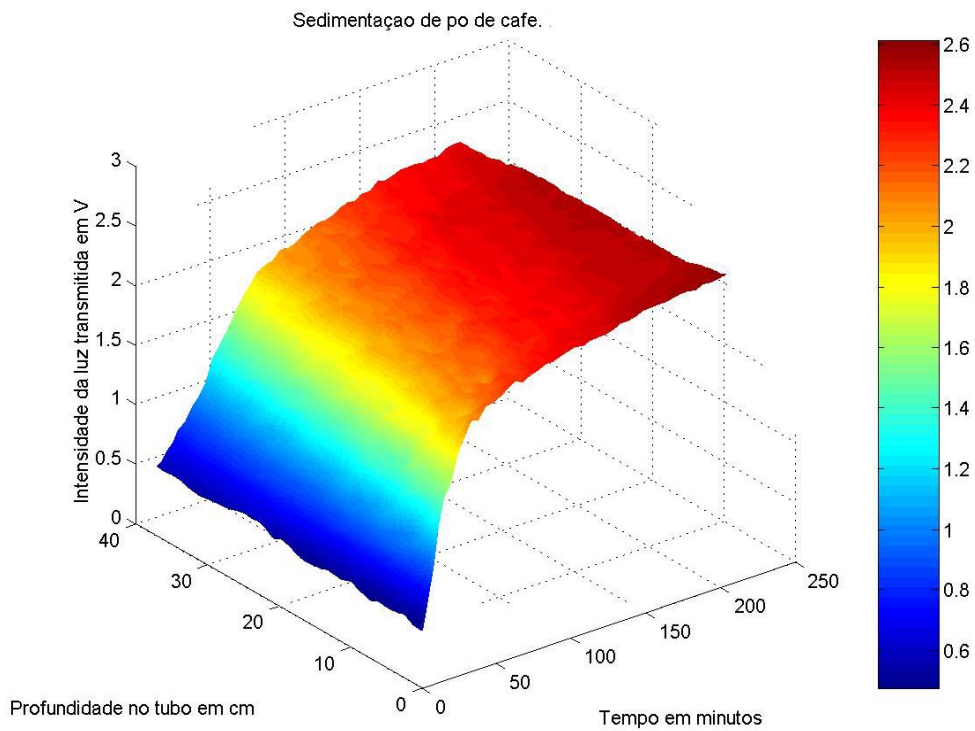


Figura 3.11. Processo de sedimentação de partículas de pó de café.

Experimento 3 – Variação do sinal com concentração de organismos

A curva de concentração de organismos pela variação do sinal correspondente à porção de luz transmitida pela amostra é exibida na figura 3.12. Essa curva descreve a forma com que o coeficiente de atenuação da amostra depende da concentração de organismos, uma vez que a variável posição, na lei de Lambert-Beer (equação 2.1), é constante e igual a 3,7 cm.

A faixa de valores lidos pelo conversor A/D é limitada ao valor da alimentação do próprio CI ADS7822 e então, quando o sinal que chega ao conversor extrapola esse limite máximo, deve-se alterar a escala de sensibilidade do amplificador lock-in. Ao final do experimento, os valores obtidos são todos convertidos para a mesma escala de amplificação e por isso diz-se que a intensidade do sinal é normalizada.

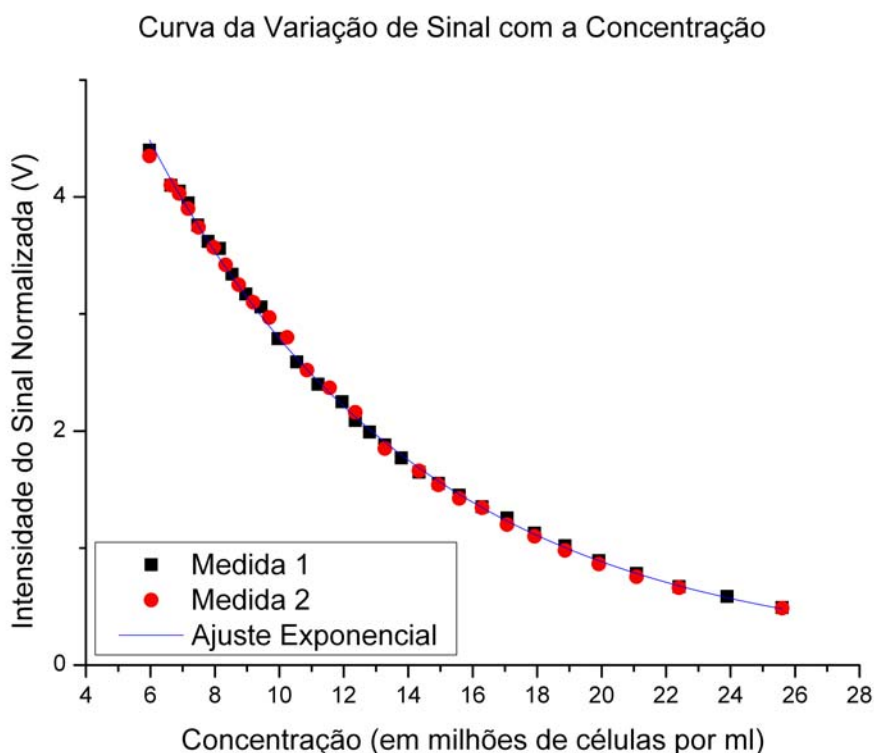


Figura 3.12. Curva da concentração de organismos pela variação do sinal correspondente à intensidade luminosa transmitida pela amostra. Medida 1 e Medida 2 referem-se a duas repetições do experimento.

Quanto à sensibilidade do equipamento, na faixa de maiores concentrações (acima de 18 milhões de células por ml), cada variação de 1×10^6 células/ml na concentração corresponde a uma mudança de sinal da ordem de 89 mV. Lembrando

que, para experimentos de longo prazo, o limiar de sensibilidade do equipamento é de 70 mV, essa seria a variação mínima de concentração passível de detecção pelo equipamento neste caso. Por outro lado, na faixa de menores concentrações (abaixo de 8 milhões de células por ml), cada variação de 1×10^6 células/ml corresponde a uma variação de sinal da ordem de 400 mV. Então, neste caso, a variação mínima de concentração passível de detecção seria de 200 mil células/ml, para experimentos de longo prazo. Para se ter uma idéia, se a amostra possuir tamanhos médios de células da ordem de 5 μm , e os filamentos possuírem comprimentos típicos de 60 μm , 200 mil células/ml correspondem a aproximadamente 16 mil filamentos/ml.

Deve-se salientar que a sensibilidade do equipamento depende das partículas em questão e do tempo de duração do experimento, como já ressaltado. Assim, esses valores serão diferentes conforme as características das células tais como tamanho, forma e número de aerótopos. Além disso, para experimentos de curta duração, nos quais se pode excluir grande parte das oscilações já comentadas, a sensibilidade pode melhorar em até 4 ou 5 vezes, dependendo do tempo considerado.

Por fim, vale ressaltar que a curva mostrada na figura 3.12 é da forma da equação 2.1, do capítulo 2. Usando os dados gerados pela curva e as equações 2.1 e 2.2, tem-se que o coeficiente de extinção C_{ext} para essa amostra vale $3,2 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$.

*Experimento 4 – Experimento da adição de água sanitária em uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii**

As figuras 3.13 e 3.14 mostram o resultado obtido para o caso em que gotas de água sanitária foram adicionadas à amostra pelo centro do tubo. Nota-se que, por possuírem uma determinada velocidade inicial (ao tocarem a superfície do líquido), as gotas penetram na amostra mais rapidamente do que se dispersam nas demais direções. Com isso, o efeito é mais intenso inicialmente para maiores profundidades e se expande gradualmente por toda a extensão do tubo. A variação de sinal durante o experimento extrapolou o limite máximo do conversor A/D (tensão de alimentação do CI ADS7822). Por isso, a tendência de a coloração vermelha ficar uniforme ao longo do tubo, pois para qualquer valor acima do limite máximo, o conversor gera um sinal constante correspondente à sua tensão de alimentação.

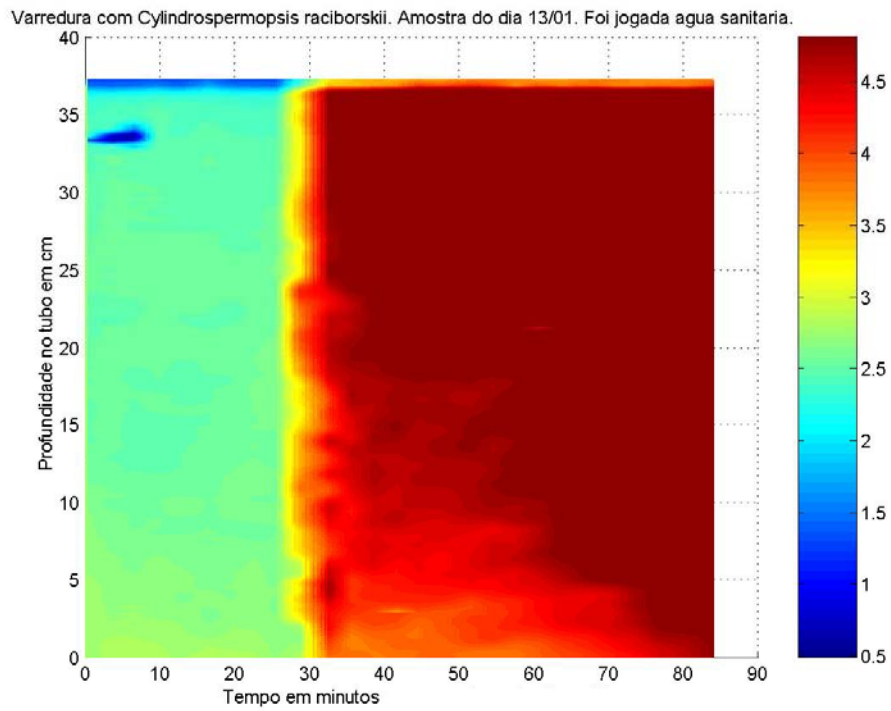


Figura 3.13. Experimento da adição de gotas de água sanitária no centro do tubo.
Vista superior.

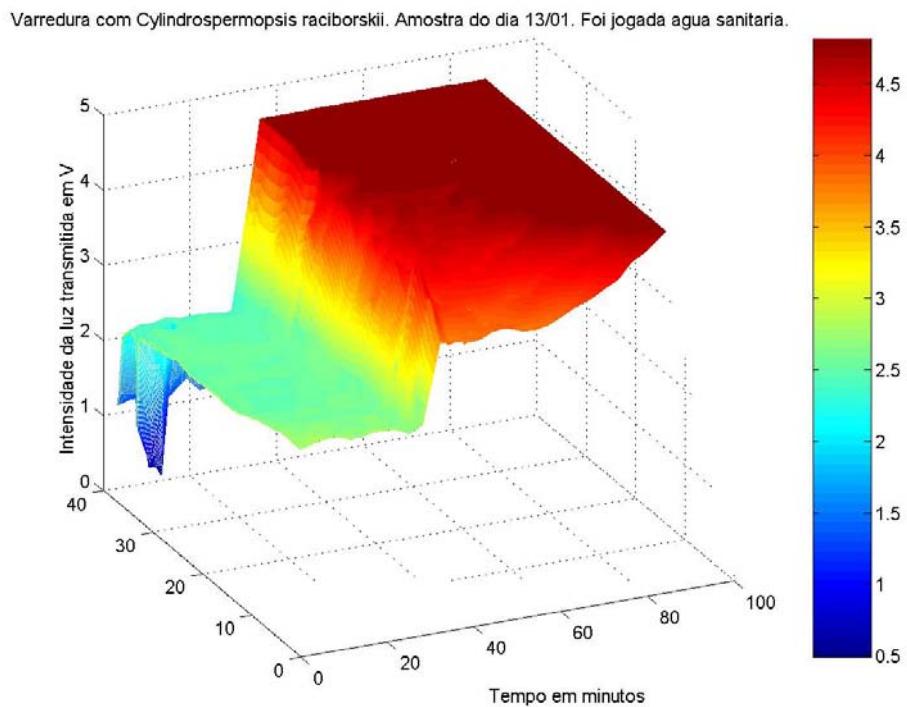


Figura 3.14. Experimento da adição de gotas de água sanitária no centro do tubo.

O resultado é bem diferente quando as gotas são adicionadas por toda a extensão da superfície do tubo e a uma distância muito pequena da mesma. Neste caso, o efeito é uniformemente distribuído por todo o tubo. Isso pode ser observado nos gráficos das figuras 3.15 e 3.16.

Novamente, vale ressaltar que cores mais avermelhadas, isto é, maiores valores de intensidade do sinal, correspondem a uma menor concentração de organismos.

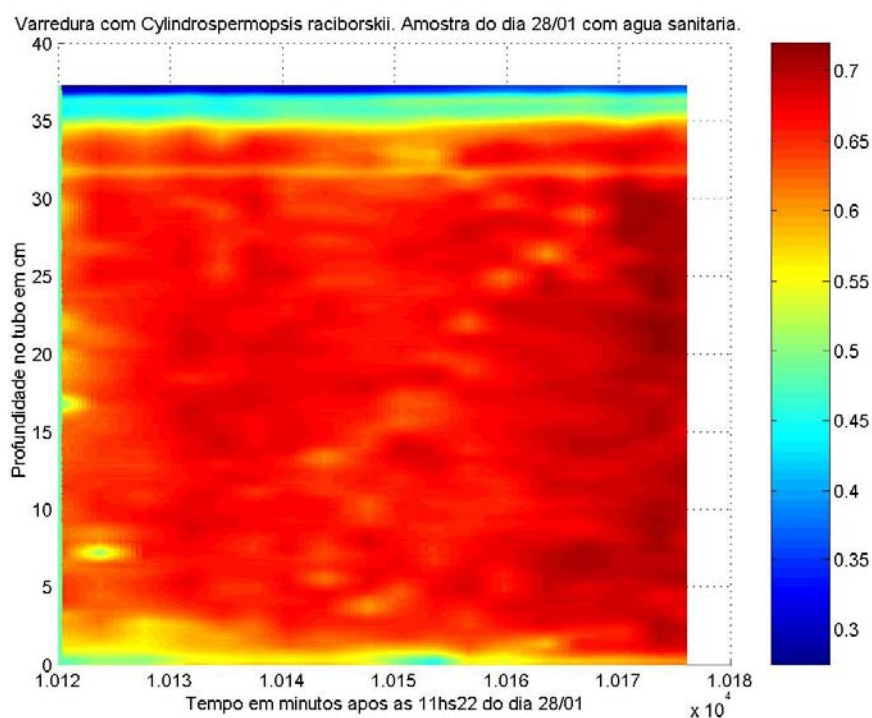


Figura 3.15. Experimento de adição de gotas de água sanitária por toda a área superficial do tubo. Vista superior.

Como já destacado, a queda de sinal após os 36 cm é devido à chegada da plataforma ao final do seu curso. Na figura 3.15, pode-se notar claramente que essa queda ocorre a partir de 35 cm, aproximadamente. Isso ocorreu porque nessa faixa de profundidade, havia um aglomerado de organismos que não se desfez imediatamente com a adição de água sanitária. Esse aglomerado adquiriu uma coloração amarelada, mas permaneceu fixo nessa região e por isso verifica-se essa queda pronunciada do sinal. Só foi possível a visualização do aglomerado porque a amostra como um todo adquiriu uma coloração esbranquiçada, quase transparente.

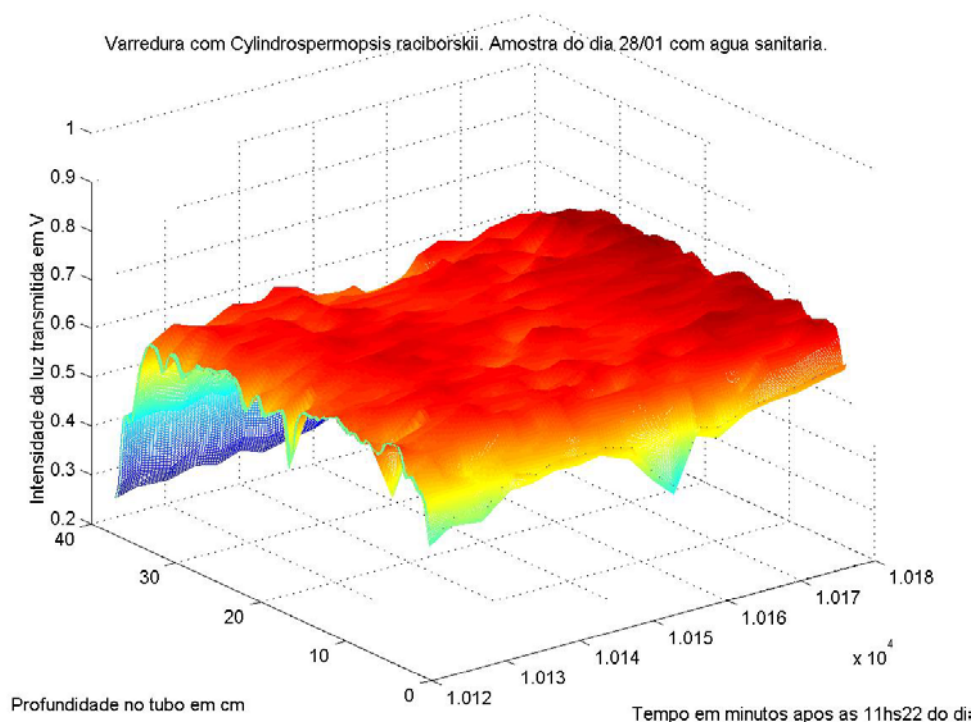


Figura 3.16. Experimento de adição de gotas de água sanitária por toda a área superficial do tubo.

Experimento 5 – Aplicação de leds de alta luminosidade e diferentes cores

Esse experimento foi particularmente interessante por mostrar que há um aumento da concentração de organismos nas regiões iluminadas pelos leds. Isso significa que as regiões iluminadas atraem os organismos de alguma forma. Por questões técnicas, devido ao fato de a escala de tempo ser muito longa, os dados tiveram de ser representados em dois gráficos. O segundo é continuação do primeiro no tempo, mas deve-se notar que as cores correspondem a uma escala diferente. Os gráficos que mostram o resultado dos experimentos são mostrados nas figuras 3.17 e 3.18.

Os números indicados nas figuras correspondem aos experimentos realizados. Na figura 3.17, o número 1 corresponde à aplicação dos leds azuis na profundidade de 20 cm, o número 2, leds azuis na profundidade de 29 cm e o número 3, leds também azuis na profundidade de 3 cm. O número 4 corresponde aos leds brancos posicionados em 20 cm. O número 5 refere-se à aplicação dos leds verdes em 15 cm de profundidade. Na figura 3.18, o número 6 corresponde à aplicação dos leds verdes na profundidade de 29 cm e o número 7, leds verdes na profundidade de 12 cm.

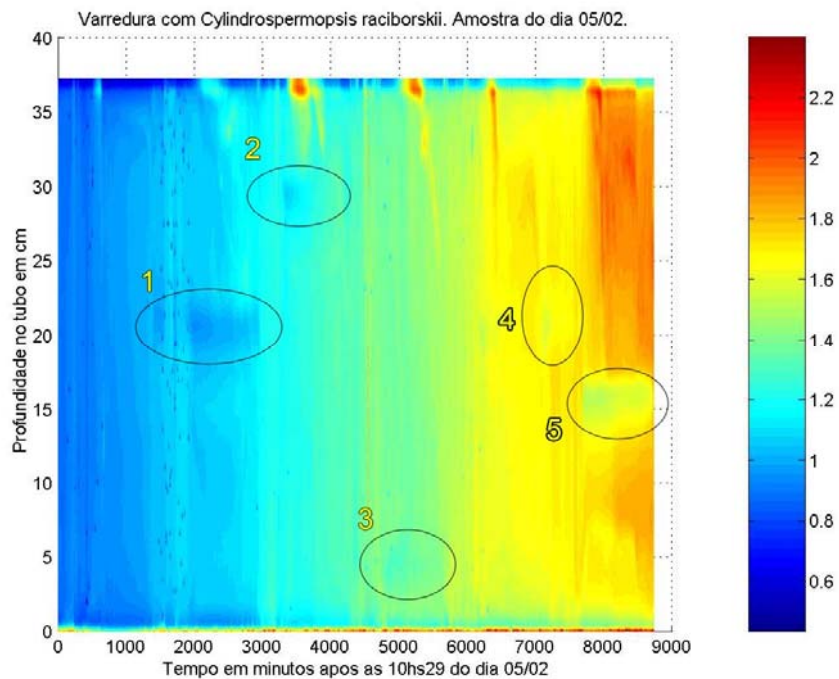


Figura 3.17. Experimento da aplicação de leds de alta luminosidade. 1ª parte. Número 1: leds azuis em 20 cm. Número 2: leds azuis em 29 cm. Número 3, leds azuis em 3 cm. Número 4: leds brancos em 20 cm. Número 5: leds verdes em 15 cm.

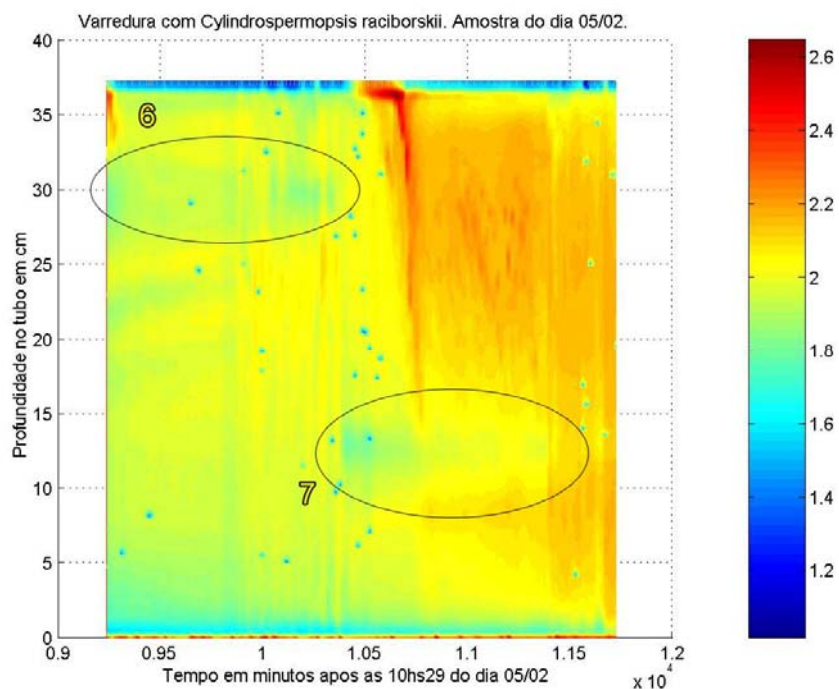


Figura 3.18. Experimento da aplicação de leds de alta luminosidade. 2ª parte. Número 6: leds verdes em 29 cm. Número 7: leds verdes em 12 cm.

Os círculos correspondentes aos números nas figuras 3.17 e 3.18, destacam as regiões correspondentes aos experimentos realizados. Em todas elas, verifica-se uma queda do sinal, isto é, uma coloração mais voltada para o azul. Isso significa que a concentração de organismos é maior naquela região. Por isso, pode-se concluir que em todos os casos de aplicação de leds, houve uma concentração de organismos nas regiões iluminadas. Entretanto, nota-se que nos experimentos 2, 3, 4 e 6 o acúmulo de organismos foi menor do que nos de número 1, 5 e 7. Em particular, o de número 5 foi aquele gerou o maior acúmulo de organismos na região em torno dos leds. Destes, o 5 e 7 correspondem à aplicação do led verde, enquanto o 1 corresponde ao led azul. O led branco não gerou efeito significativo.

É interessante notar que a faixa azul do espectro visível é absorvida pela clorofila *a*, presente nas células desses organismos. O verde, por outro lado, não é absorvido por esse pigmento. O led branco, como destacado na figura 2.21 do capítulo 2, possui um pico de emissão na região do azul. Neste experimento, observou-se o efeito do acúmulo de organismos para o led azul, mas não para o branco, ainda que o branco possuísse um pico de emissão no azul. Isso ocorreu possivelmente porque a emissão no azul do led branco é da ordem de 10 vezes menos intensa do que no led azul, como pode ser comparado na figura 2.23 do capítulo 2. Novamente, é interessante notar que o efeito mais pronunciado foi com o uso do led verde, mesmo sendo este o menos intenso dos três, como pode ser observado na figura 2.24 do capítulo 2.

As figuras 3.19 e 3.20 destacam a ampliação de uma faixa de profundidades e tempo em torno da região de aplicação do led verde na profundidade de 15 cm (número 5 da figura 3.17). Com esse recurso, uma nova escala de cores é atribuída aos gráficos, aumentando a resolução dos dados e permitindo uma análise mais precisa. Assim, deve-se ressaltar que a diminuição do sinal na região de 15 cm é acompanhada de um aumento de sinal nas regiões vizinhas, imediatamente inferior e superior. Isso significa que, enquanto há um acúmulo de organismos na região de 15 cm, há uma diminuição da concentração destes nas regiões vizinhas àquela da aplicação dos leds.

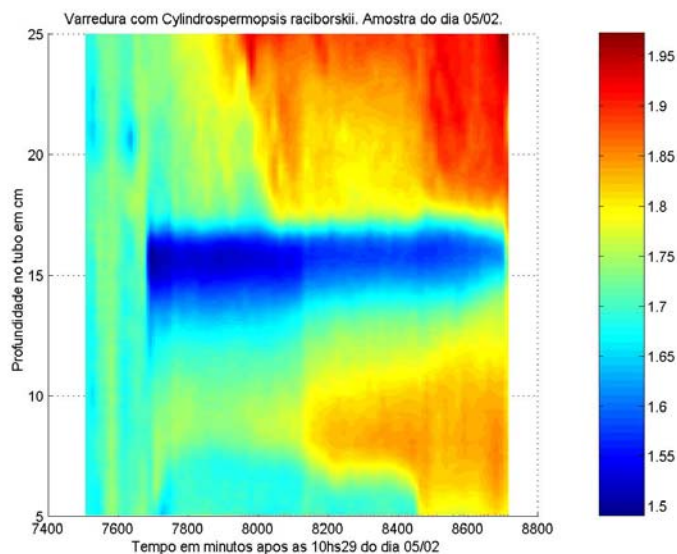


Figura 3.19. Ampliação da região de aplicação de leds verdes na profundidade de 15 cm. Vista superior.

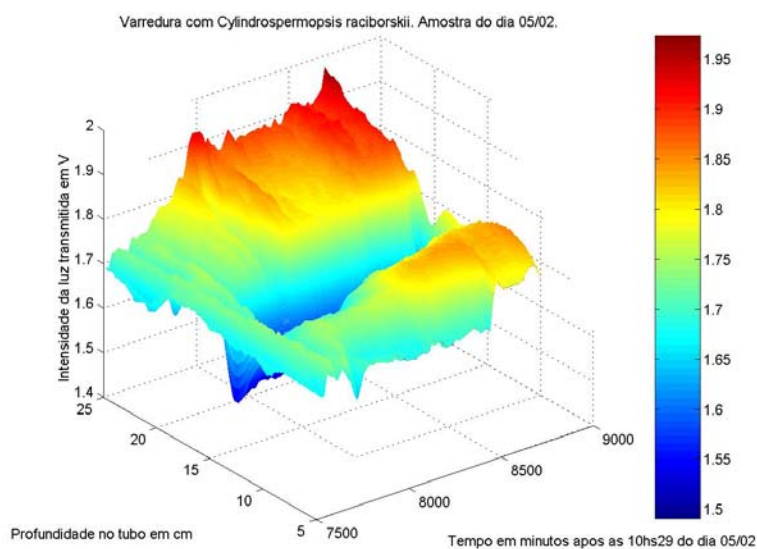


Figura 3.20. Ampliação da região de aplicação de leds verdes na profundidade de 15 cm.

Vale ressaltar que o fato de os organismos serem mais sensíveis (em termos de movimento) à luz verde do que às demais é interessante e, então, pode-se construir uma hipótese para explicar esse fato. Em uma situação real, de um lago, o vermelho e o azul podem penetrar menos na água do que o verde. Isto porque estas cores são mais absorvidas pelos organismos, devido à presença de clorofila *a*. Sendo assim, organismos em maiores profundidades são capazes de perceber a presença de

luz e se orientar em busca de nichos que contenham as faixas de freqüências de radiação eletromagnética que são fotossinteticamente ativas (azul e vermelho). Isso explicaria porque elas possuem essa maior sensibilidade na região do verde, isto é, para se orientarem em busca de locais em que existam as cores necessárias para a realização de fotossíntese.

Essa hipótese pode contribuir para o entendimento de uma curiosidade observada no laboratório. Um tubo contendo amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* foi colocado sob luz incandescente, de lâmpadas comerciais de 60 W de potência. Com aproximadamente 48 horas de exposição ininterrupta, é possível observar a formação de acúmulos de organismos em duas regiões do tubo: a superfície da amostra e o fundo do tubo. É interessante notar ainda que a maior concentração no fundo do tubo se deu na lateral voltada para a posição da luz, como pode ser observado na figura 3.21, a seguir. Pode ser que essa movimentação dos organismos seja consequência da sensibilidade destes à luz verde proveniente da lâmpada.

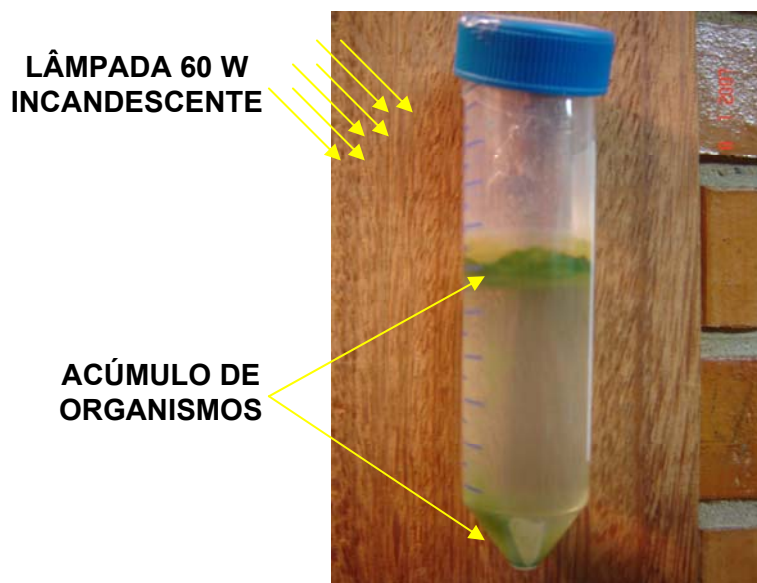


Figura 3.21. Tubo com cianobactérias exposto à luz de uma lâmpada incandescente de 60 W de potência.

Por fim, vale destacar que foram feitos também experimentos com leds vermelhos de alta intensidade. Mas estes não geraram o acúmulo de organismos como os demais casos. Por isso, não foram exibidas maiores informações sobre este procedimento.

Experimento 6 – Aplicação de UV

Na figura 3.22, é exibido o gráfico gerado pelo experimento de aplicação de radiação ultravioleta em uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Como já descrito, a radiação UV foi aplicada em três instantes (1483, 4374 e 7334 minutos após o início do experimento) e as figuras 3.23, 3.24 e 3.25 mostram cada uma das aplicações separadamente.

Na figura 3.22, nota-se que o sinal, como um todo, aumenta com o passar do tempo. Isso pode ser notado principalmente a partir dos 6000 minutos. Esse aumento do sinal indica que há uma redução na concentração de organismos ao longo de todo o tubo. Por outro lado, deve-se observar que a faixa de profundidades a partir de 36 cm se mostra com um azul mais intenso com o passar do tempo, principalmente a partir dos 6000 minutos. Já foi destacado que essa faixa de profundidades corresponde ao final do curso da plataforma que contém a unidade óptica. Sendo assim, pode-se atribuir a diminuição da concentração de organismos ao longo do tubo a um processo de sedimentação dos mesmos, que acabam por se acumular no fundo do tubo, aumentando a concentração nessa região e, conseqüentemente, atenuando mais o feixe de luz incidente. Entretanto, esse pode não ser o único efeito presente. Uma outra possibilidade é a morte de organismos, o que também geraria uma diminuição da concentração ao longo do tubo. Esses dois possíveis efeitos podem ter ocorrido simultaneamente. Mais experimentos seriam necessários para que se pudesse avaliar com maior clareza o problema em questão. Especificamente, seriam necessários experimentos capazes de caracterizar a morte de organismos. Neste trabalho, tentou-se implementar algumas técnicas para este fim, a saber, coloração por Trypan-Blue e fluorescência, usando o corante ethidium bromide. Nenhuma delas se mostrou aplicável a essas cianobactérias, tendo-se em vista os recursos disponíveis para este projeto. Em trabalhos futuros, é imprescindível que se possa avaliar a viabilidade dos organismos.

A partir de pouco mais de 6000 minutos, nota-se, no gráfico da figura 3.22, uma faixa azul na profundidade de 32 cm, aproximadamente. Essa faixa de sinal menos intenso, indica um acúmulo de organismos. O ocorrido neste caso foi a formação de um aglomerado de organismos, que acabou por se fixar na superfície interna do tubo, na profundidade já mencionada. Esse aglomerado atenua o feixe de luz incidente e gera a queda de sinal observada. O mesmo era passível de observação a olho nu, ainda que dificilmente.

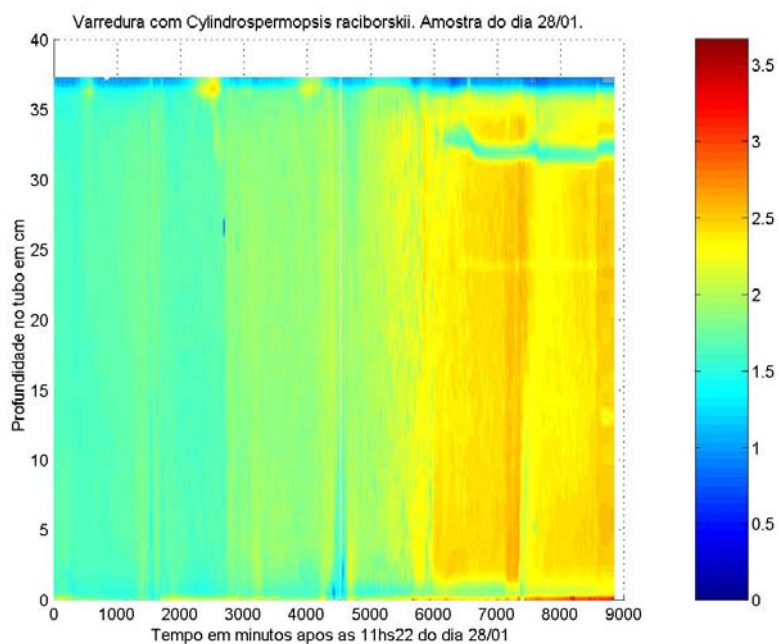


Figura 3.22. Experimento da aplicação de ultravioleta.

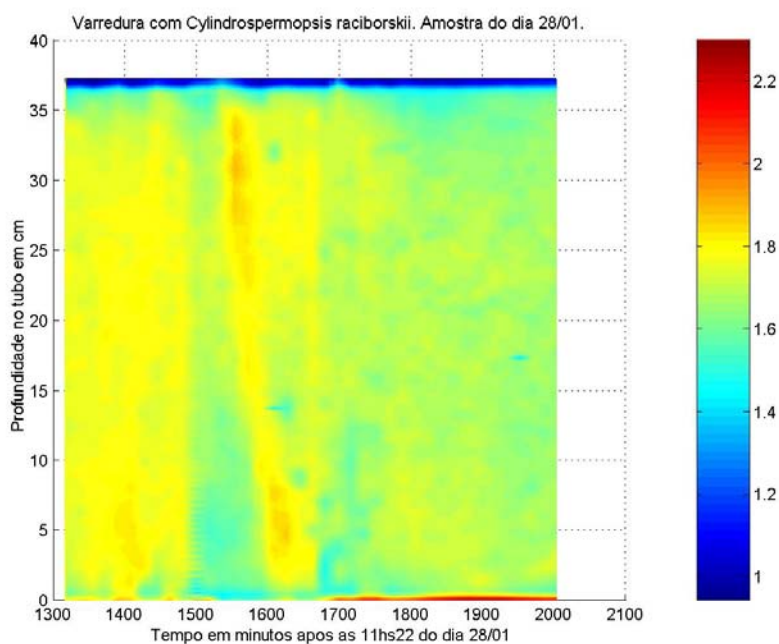


Figura 3.23. Experimento da aplicação de ultravioleta. O UV foi aplicado no instante 1483 minutos, aproximadamente. A densidade de potência foi de $44 \mu\text{Wcm}^{-2}$ por 20 minutos.

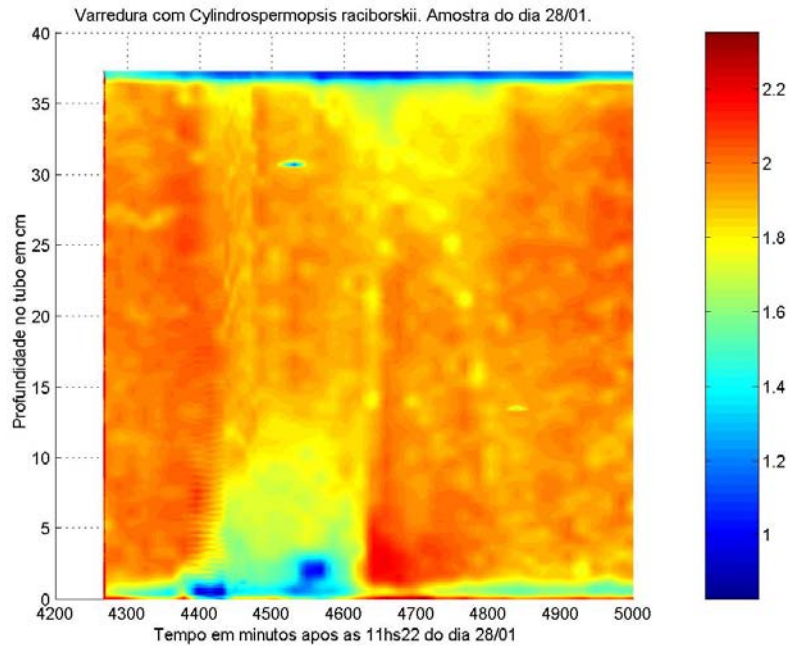


Figura 3.24. Experimento da aplicação de ultravioleta. O UV foi aplicado no instante 4374 minutos, aproximadamente. A densidade de potência foi de $37 \mu\text{Wcm}^{-2}$ por 60 minutos.

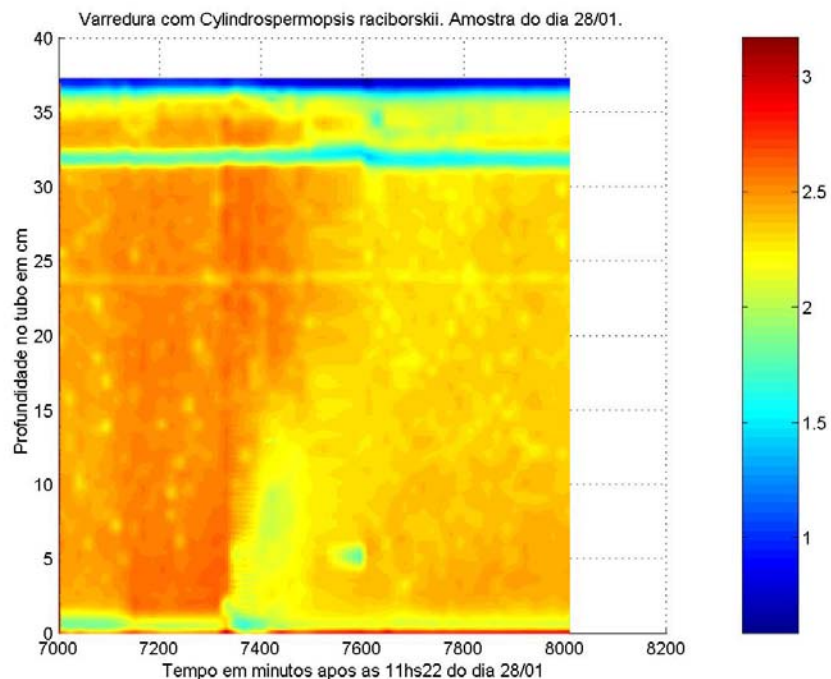


Figura 3.25. Experimento da aplicação de ultravioleta. O UV foi aplicado no instante 7334 minutos, aproximadamente. A densidade de potência foi de $140 \mu\text{Wcm}^{-2}$ por 60 minutos.

A partir dos gráficos das figuras 3.23, 3.24 e 3.25, é interessante notar que ocorre uma diminuição do sinal imediatamente após o início da aplicação de ultravioleta. Essa diminuição implica em uma maior concentração de organismos na região em questão. Para justificar esse efeito, deve-se lembrar que a altura da coluna de amostra ultrapassava a posição inicial da plataforma que contém a unidade óptica. É interessante notar que, sempre que amostras de organismos foram colocadas no tubo, observou-se a formação de um acúmulo de organismos na superfície do líquido, como pode ser visto na figura 3.26, a seguir.

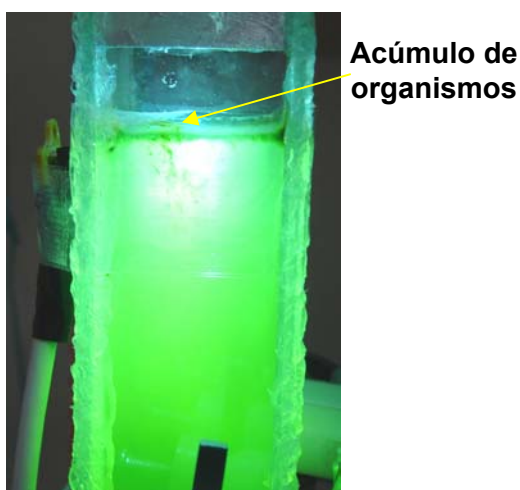


Figura 3.26. Concentração de organismos na superfície da amostra.

Com isso, pode-se explicar a diminuição da intensidade do sinal logo após a aplicação do ultravioleta. Com a aplicação da radiação UV, os organismos acumulados na superfície, ou parte deles, iniciaram um processo de sedimentação. Pouco tempo depois, eles atingiram a posição inicial da plataforma, causando a diminuição do sinal.

É interessante destacar que, aproximadamente 200 minutos após o início da diminuição do sinal na posição inicial da plataforma, nota-se uma diminuição do sinal no final do tubo, tipicamente a partir dos 30 cm de profundidade. Isso pode ser notado nas três situações das figuras 3.23, 3.24 e 3.25. Isso significa que aqueles organismos que sedimentaram e passaram em determinado instante pela posição inicial da plataforma, começaram a atingir o fundo do tubo aproximadamente 200 minutos mais tarde. Tomando então que a extensão do tubo é de 37 cm e que o tempo de sedimentação foi de 200 minutos, pode-se concluir que a taxa de sedimentação desses organismos foi de $3,08 \times 10^{-5} \text{ ms}^{-1}$, ou $30,8 \text{ } \mu\text{ms}^{-1}$. Usando a equação 2.15, para a velocidade de sedimentação de partículas cilíndricas, pode-se calcular a diferença entre as densidades dos organismos e do líquido, o que resulta em $\Delta\rho$ da

ordem de 1200 Kg.m^{-3} . Esse valor foi obtido considerando-se que o comprimento médio dos organismos seja de $60 \mu\text{m}$ e o seu raio é de $1,5 \mu\text{m}$. Foram usados esses valores típicos, apenas para se ter um idéia da ordem de grandeza dessa mudança de densidade. Isso significa que a aplicação da radiação ultravioleta aumentou a densidade dos organismos em torno de 1200 Kg.m^{-3} . Esse aumento de densidade pode estar relacionado à perda de alguns aerótopos no interior das células, mas vale ressaltar que não constatamos visualmente, com o uso do microscópio, nenhuma diminuição significativa do número de vesículas de gás. Uma discussão mais apurada será feita mais adiante.

Vale lembrar aqui que o objetivo desses experimentos é ilustrar a utilidade e o funcionamento do equipamento desenvolvido e ao mesmo tempo motivar alguns trabalhos interessantes a partir de seu uso.

Por fim, é importante destacar que essas cianobactérias atenuam fortemente a radiação UV-B. Na seção 3.3 a seguir, esse tópico será abordado com mais detalhes, mas vale adiantar que uma coluna de poucos centímetros de organismos é suficiente para atenuar fortemente a radiação UV-B.

Experimento 7 – Aplicação de Pressão

A figura 3.27 mostra o gráfico obtido a partir do experimento de aplicação de 35 MCA de pressão sobre uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* com concentração de $6,5 \times 10^6$ células/ml. Conforme já discutido na seção 3.1 deste capítulo, ao sofrerem uma pressão superior à pressão crítica, os aerótopos colapsam, aumentando a densidade das células, o que faz com que os organismos afundem na coluna de água. Na figura 3.27, nota-se claramente um processo de sedimentação dos organismos. A forma do gráfico é semelhante àquele da figura 3.10 para a sedimentação de partículas de pó de café. Na medida em que os organismos se sedimentam, a intensidade da luz transmitida aumenta nas regiões anteriormente ocupadas por eles. Na figura 3.26, pode-se observar que a diferença de sinal entre as regiões que os organismos ocupam e aquelas anteriormente ocupadas é significativa. Isso se deve ao relativamente alto valor de pressão utilizado, conforme comparação da figura 3.2 da seção 3.1. Vale ressaltar que esse gradiente de concentração de organismos tão nítido na figura 3.26, não é visível à olho nu no tubo de amostra.

A partir desse gráfico, pode-se obter a taxa de sedimentação para esses organismos, a saber, $1,33 \times 10^{-6} \text{ ms}^{-1}$ ou $1,33 \mu\text{ms}^{-1}$. Usando a equação 2.15, pode-se

realizar alguns cálculos para se obter o ganho de densidade dos organismos gerado pela aplicação da pressão sobre a amostra, o que resulta em um $\Delta\rho$ da ordem de 52 kg.m^{-3} .

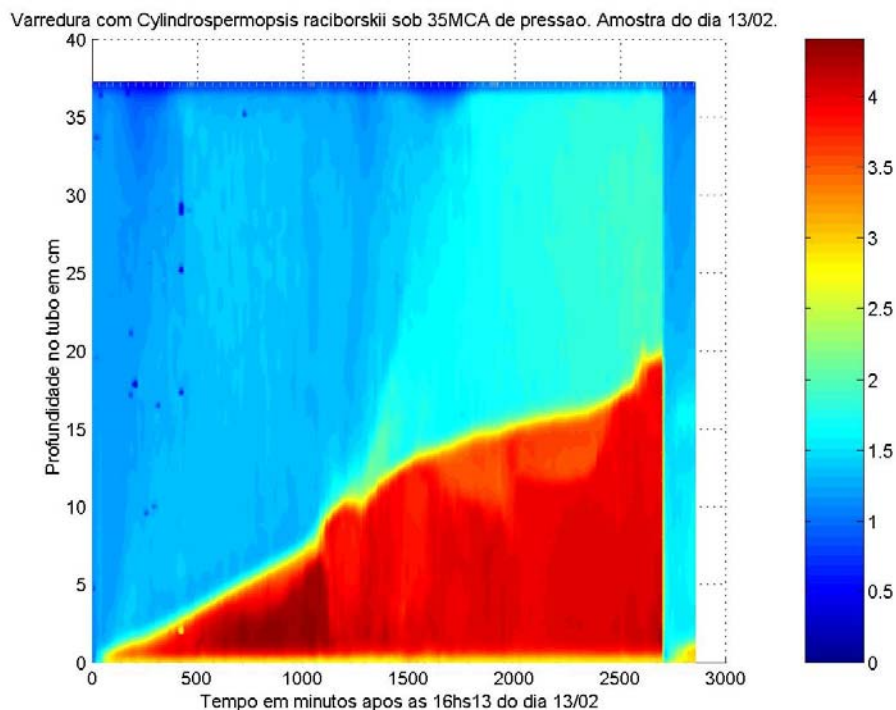


Figura 3.27. Experimento de aplicação de pressão sobre uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* de $6,5 \times 10^6$ células/ml.

Na figura 3.27, o instante próximo a 2700 minutos, caracterizado pela queda abrupta do sinal, quando a coloração deixa de ser avermelhada e passa a ser azulada, marca o momento em que a amostra foi homogeneizada, com o objetivo de verificar a intensidade do sinal se os organismos que sedimentaram voltassem a flutuar. Como pode ser visto, o sinal retorna a níveis próximos àqueles do início do processo.

O acúmulo de organismos no fundo do tubo, devido ao processo de sedimentação, é destacado na figura 3.28, que mostra uma foto do fundo do tubo de amostra.

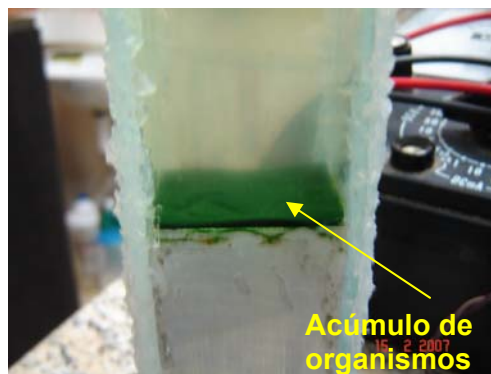


Figura 3.28. Acúmulo de organismos no fundo do tubo.

Na figura 3.29, pode-se observar o resultado do mesmo procedimento experimental para uma amostra de $25,6 \times 10^6$ células/ml. A partir do gráfico, pode-se obter a taxa de sedimentação dos organismos: $1,5 \times 10^{-6} \text{ ms}^{-1}$, ou $1,5 \mu\text{ms}^{-1}$. É um valor semelhante ao caso anterior. Pequenas diferenças, como essa, podem ser provenientes de possíveis imprecisões na aplicação de valores específicos de pressão. Neste caso, o ganho de densidade dos organismos foi em torno de 59 kg.m^{-3} .

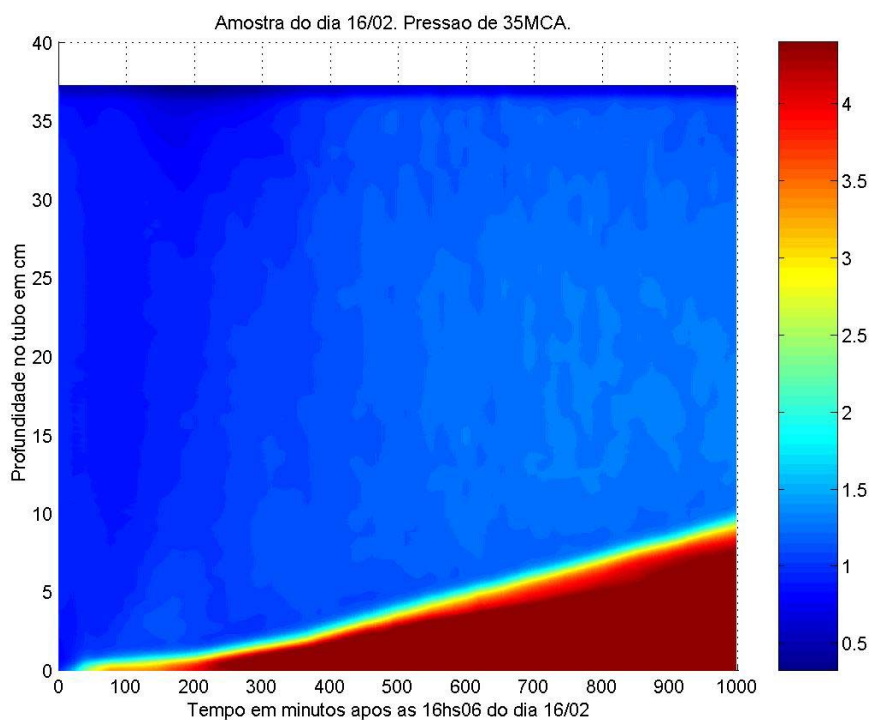


Figura 3.29. Experimento de aplicação de pressão sobre uma amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* $25,6 \times 10^6$ células/ml.

É interessante notar como o ganho de densidade para os experimentos de aplicação de pressão (59 kg. m⁻³) foi diferente daquele dos experimentos de ultravioleta (1200 Kg.m⁻³). Essa diferença indica que os efeitos decorridos das aplicações de ultravioleta e pressão podem ter sido significativamente diferentes. Uma análise simples permite algumas conclusões e hipóteses razoáveis, como segue.

Para o caso do experimento de aplicação de pressão, os organismos possuíam inicialmente uma densidade ρ^{sp} dada por:

$$\rho^{sp} = \frac{\sum m^{sp}}{V^{sp}}, \quad (\text{eq. C1})$$

onde m^{sp} e V^{sp} são a massa e o volume dos organismos, respectivamente, sem aplicação de pressão.

O mesmo pode ser escrito para uma amostra que recebeu a aplicação de pressão externa, isto é,

$$\rho^{cp} = \frac{\sum m^{cp}}{V^{cp}}, \quad (\text{eq. C2})$$

onde ρ^{cp} , m^{cp} e V^{cp} são a densidade, a massa e o volume, respectivamente, dos organismos que sofreram a aplicação de pressão.

Como os organismos que sofreram pressão afundam, pode-se escrever que

$$\rho^{cp} > \rho^{sp} \Rightarrow \frac{\sum m^{cp}}{V^{cp}} > \frac{\sum m^{sp}}{V^{sp}} \quad (\text{eq. C3})$$

Como o único efeito, a princípio, da aplicação de pressão sobre as células é o colapso dos aerótopos, pode-se admitir que a mudança de massa de um organismo após receber pressão é desprezível em relação à massa dos demais constituintes da célula, isto é,

$$\sum m^{cp} = \sum m^{sp}. \quad (\text{eq. C4})$$

E então, conclui-se que

$$V^{cp} < V^{sp}, \quad (\text{eq. C5})$$

isto é, a aplicação de pressão causa uma diminuição do volume dos organismos, o que gera um aumento da densidade de suas células. Com isso, esses organismos acabam por sedimentar no tubo de amostra. Como a variação de densidade foi da ordem de 60 kg.m^{-3} , conclui-se que a diminuição do volume é da ordem de 6% do volume inicial, o que é difícil de ser observado em microscópio.

Então, a diminuição do volume dos organismos, devido ao colapso dos aerótopos, é responsável por uma variação da ordem de 6% no valor da densidade. Como no caso do experimento do ultravioleta, essa mesma variação foi da ordem de 80%, pode-se admitir que a diminuição do volume dos organismos, neste caso, é desprezível e que outros efeitos são responsáveis pela maior parte do aumento de densidade dos organismos. Assim como feito para a pressão, pode-se escrever para o ultravioleta:

$$\rho^{su} = \frac{\sum m^{su}}{V^{su}} \text{ e} \quad (\text{eq. C6})$$

$$\rho^{cu} = \frac{\sum m^{cu}}{V^{cu}}, \quad (\text{eq. C7})$$

onde ρ^{su} , m^{su} e V^{su} são a densidade, a massa e o volume dos organismos, respectivamente, sem aplicação de ultravioleta e ρ^{cu} , m^{cu} e V^{cu} são a densidade, a massa e o volume, respectivamente, dos organismos que sofreram a aplicação de ultravioleta.

Como os organismos que sofreram aplicação do UV afundam, pode-se escrever que

$$\rho^{cu} > \rho^{su} \Rightarrow \frac{\sum m^{cu}}{V^{cu}} > \frac{\sum m^{su}}{V^{su}} \quad (\text{eq. C8})$$

Se a variação de volume é desprezível, conclui-se que:

$$\sum m^{cu} > \sum m^{su}, \quad (\text{eq. C9})$$

isto é, a aplicação de ultravioleta causa um aumento de massa de no mínimo 75% da massa inicial. Assim, a variação da quantidade de massa dos organismos é, neste caso, responsável por pelo menos 95% da variação de densidade observada.

Com isso, lembrando que a lâmpada de UV utilizada também possui picos de emissão no visível, três hipóteses podem ser levantadas:

1. O ultravioleta age acelerando a taxa de fotossíntese dos organismos, a qual utiliza a parte visível do espectro da HBO200. Isso geraria a produção acelerada de moléculas mais densas do que a água e, conseqüentemente, aumentaria a massa dos organismos;
2. o ultravioleta é utilizado no processo de fotossíntese, em conjunto com as demais freqüências do visível, o que também aceleraria a taxa de produção de moléculas mais densas do que a água e aumentaria a massa das células e
3. o ultravioleta não possui qualquer função e os organismos sedimentam apenas devido à alta incidência de luz visível, a qual, por si só, gera um aumento da massa dos organismos.

A terceira hipótese pode ser refutada pela foto exibida na figura 3.21, em que um tubo de amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* foi exposto à luz visível (praticamente sem ultravioleta, pois a fonte é incandescente) e o que foi observado após algum tempo foi a formação de acúmulos de organismos, inclusive na superfície do líquido. Se a terceira hipótese estivesse correta, o acúmulo de organismos na superfície não deveria ser observado no tubo mostrado na figura 3.21.

3.3 – EXPERIMENTOS DE ATENUAÇÃO DE UV-B

Nessa seção, serão apresentados os resultados de teste com atenuação de UV-B por vários sistemas de partículas, conforme descrito anteriormente na seção 2.3 do capítulo 2.

Inicialmente, mediu-se a atenuação do ultravioleta pela água de torneira. A figura 3.30 (a) mostra o gráfico obtido, indicando-se o coeficiente de atenuação encontrado.

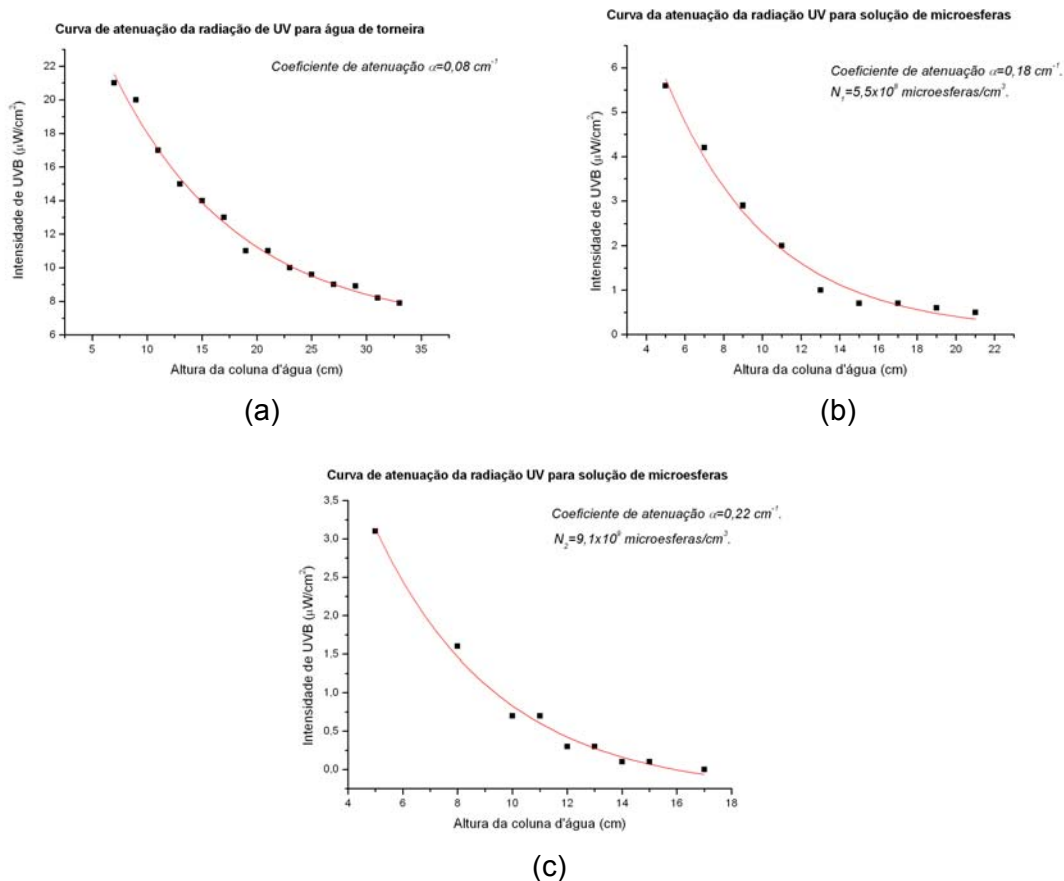


Figura 3.30. Gráficos de atenuação de UV por água e por microesferas. (a) Curva de atenuação da radiação de UV para água de torneira. Coeficiente de atenuação: $0,08 \text{ cm}^{-1}$. (b) Curva de atenuação de UV para solução de microesferas – menor concentração. Coeficiente de atenuação: $0,18 \text{ cm}^{-1}$. Concentração: $5,5 \times 10^8 \text{ microesferas}/\text{cm}^3$. (c) Curva de atenuação de UV para solução de microesferas – maior concentração. Coeficiente de atenuação: $0,22 \text{ cm}^{-1}$. Concentração: $9,1 \times 10^9 \text{ microesferas}/\text{cm}^3$.

Em seguida, em um tubo com água, foram adicionadas microesferas de polietireno com diâmetro de 400 nm. Mediu-se a atenuação do ultravioleta pelo líquido. As figuras 3.30 (b) e 3.30 (c) mostram gráficos obtidos para essa situação em experimentos com duas concentrações de microesferas diferentes. A figura 3.31 mostra uma foto do tubo no momento da realização do segundo experimento. Essa foto mostra a luz espalhada na região do visível. Como as microesferas não absorvem o ultravioleta, a atenuação da radiação aqui é devida apenas a efeitos de espalhamento.

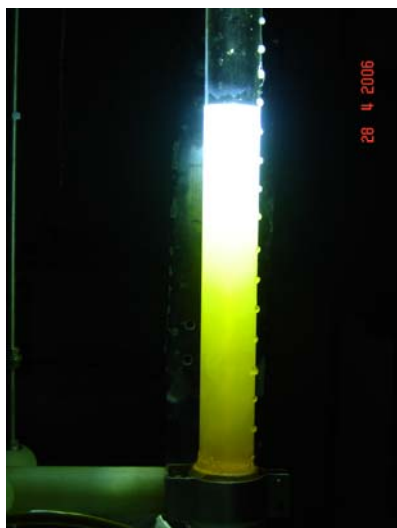


Figura 3.31. Foto do experimento de atenuação de UV para uma solução de microesferas – maior concentração.

Para se avaliar o efeito de substâncias que são capazes de absorver a radiação ultravioleta, adicionou-se café solúvel a um tubo com água e mediu-se a atenuação da radiação com a altura da coluna de líquido. A figura 3.32 (a) mostra o gráfico obtido para este caso.

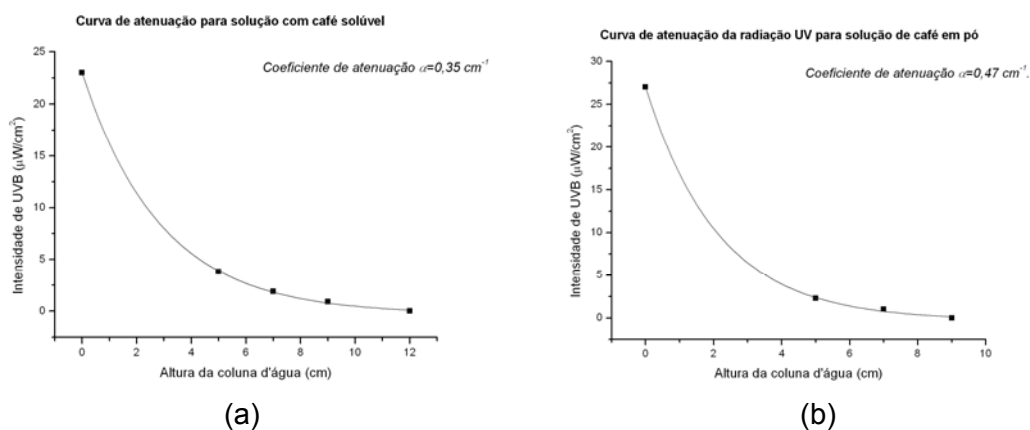


Figura 3.32. Gráficos de atenuação de UV por solução de café. (a) Curva de atenuação de UV para solução com café solúvel. Coeficiente de atenuação: $0,35 \text{ cm}^{-1}$. (b) Curva de atenuação de UV para solução com pó de café. Coeficiente de atenuação: $0,47 \text{ cm}^{-1}$.

Para remeter à situação real de um lago, onde há partículas que não só espalham a radiação ultravioleta, mas também absorvem parte dessa radiação, utilizou-se pó de café. Além da absorção, pela natureza do café, o efeito de espalhamento também é presente, pois os grânulos que formam o pó atuam como

partículas espalhadoras dessa radiação. Mediu-se novamente a atenuação do UV. A figura 3.32 (b) mostra o gráfico obtido e a figura 3.33 mostra a foto do tubo no momento da realização do experimento.

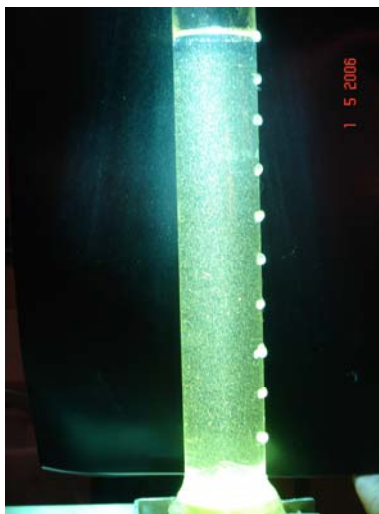


Figura 3.33. Foto do experimento de atenuação de UV para solução com pó de café.

Os experimentos de atenuação de UV-B por amostras de *Cylindrospermopsis raciborskii* de diferentes concentrações são exibidos nas figuras 3.34, 3.35 e 3.36, a seguir.

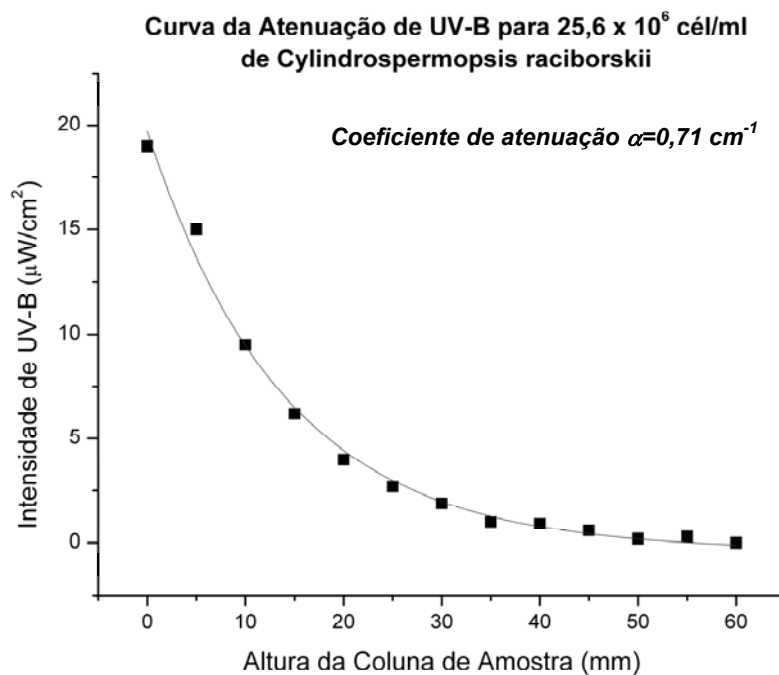


Figura 3.34. Atenuação de UV-B por uma amostra de $25,6 \times 10^6$ células/ml.

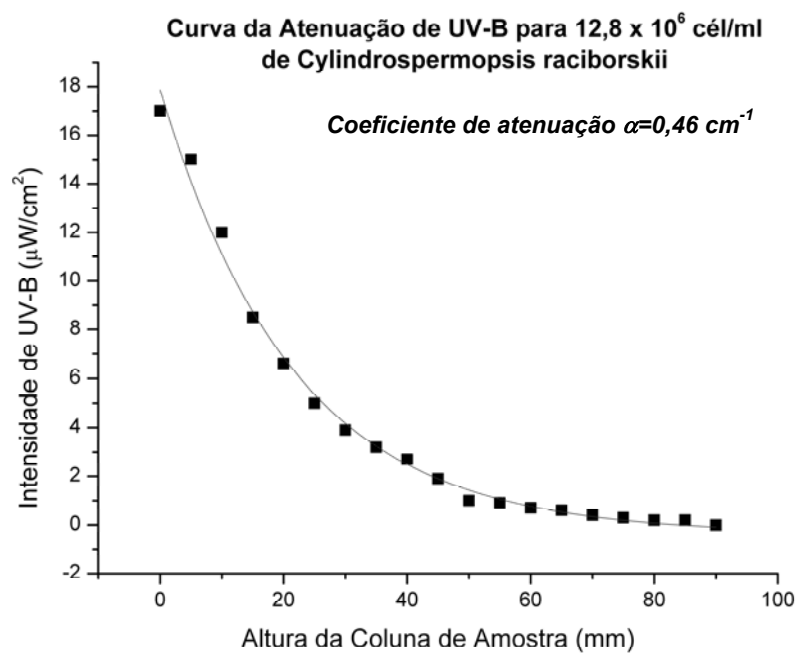


Figura 3.35. Atenuação de UV-B por uma amostra de $12,8 \times 10^6$ células/ml.

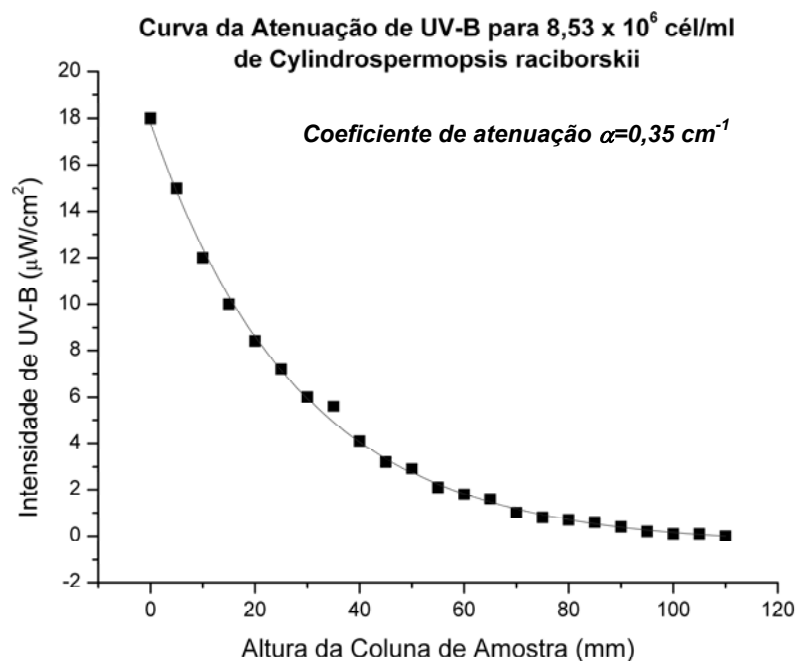


Figura 3.36. Atenuação de UV-B por uma amostra de $8,53 \times 10^6$ células/ml.

Tomando os valores para concentração e coeficiente de atenuação para essa amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii*, pode-se construir um gráfico da

concentração de organismos versus o coeficiente de atenuação, conforme mostra a figura 3.37, a seguir.

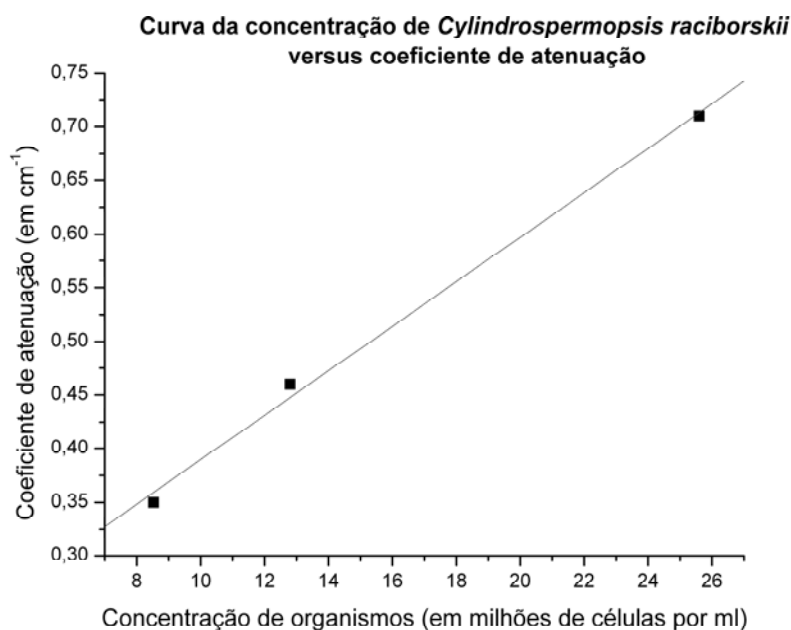


Figura 3.37. Curva da concentração versus coeficiente de atenuação.

A análise desse gráfico gera a equação 3.1 como resultado da dependência do coeficiente de atenuação com a concentração de organismos.

$$\alpha = 2,7 \times 10^{-8} N + 0,0632 \quad (\text{eq. 3.1})$$

O que está de acordo com a equação 2.2, que previa uma dependência linear entre α e N . Sendo assim, conclui-se que C_{ext} para essa amostra de *Cylindrospermopsis raciborskii* vale $2,7 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$. A título de comparação, deve-se lembrar que, na seção 3.2, na descrição dos resultados do experimento de variação do sinal com concentração de organismos, foi encontrado um coeficiente de extinção igual a $3,2 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$, para atenuação de luz 670 nm, proveniente do laser. Para se entender a diferença entre os dois valores, deve-se ressaltar que o coeficiente de extinção varia com o comprimento de onda em questão e que o ultravioleta pode gerar algum tipo de efeito nas células dos organismos que pode alterar a porção de luz atenuada pela amostra. Assim, o valor mais correto deve ser o C_{ext} obtido no espalhamento da luz do laser pela amostra. Modelos teóricos de espalhamento, utilizando a teoria de Mie, mostram que para um laser de He-Ne ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) e cilindros dielétricos longos, embebidos em água, com diâmetro em torno de $3 \mu\text{m}$,

índice de refração real e com índice de refração relativo igual a 1,16 possuem seção de choque de espalhamento da ordem de 10^{-7}cm^2 (BOHREN, 1983). A comparação deste valor teórico com resultado experimental mostra que a falta do uso do cilindro integrador contribuiu para uma menor seção de choque quando comparado com o valor teórico. Mas para uma primeira análise, os resultados são satisfatórios, tendo em vista que o objetivo neste trabalho não foi determinar com precisão o valor da seção de choque de extinção.

Nota-se na figura 3.37 que o coeficiente de atenuação aumenta com a concentração de organismos e, conseqüentemente, a atenuação da radiação UV-B também aumenta. É interessante destacar que, em uma floração de *Cylindrospermopsis raciborskii*, o UV-B não penetra significativamente. Nesses gráficos percebe-se que poucos centímetros de amostra são suficientes para extinguir o ultravioleta. Assim, aqueles organismos que estiverem na superfície da floração serão os mais afetados pela radiação, mas, ao mesmo tempo, servirão de proteção para aqueles que estiverem em maiores profundidades. Outra questão interessante, que vale a pena ser destacada, é que a cilindrospermopsina possui um pico de absorção na região de UV-B, conforme mostra a figura 1.3 do capítulo 1, o que contribui para a forte atenuação de UV-B por esses organismos.

3.4 – ELETROFORESE

Na figura 3.38 a seguir, é exibida uma foto do gel de acrilamida após a coração por prata. Os valores acima de cada poço indicam o intervalo de tempo, em minutos, pelo qual a amostra ficou submetida à radiação UV de $18\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Os Valores 10' H e 20' H se referem às amostras expostas por 10 e 20 minutos, respectivamente, a uma densidade de potência de $180\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$, após os 60 primeiros minutos de exposição. O espaço vazio entre as amostras de 40' e 60' serve para marcação de orientação do gel e se refere a um poço ao qual não foram adicionadas proteínas.

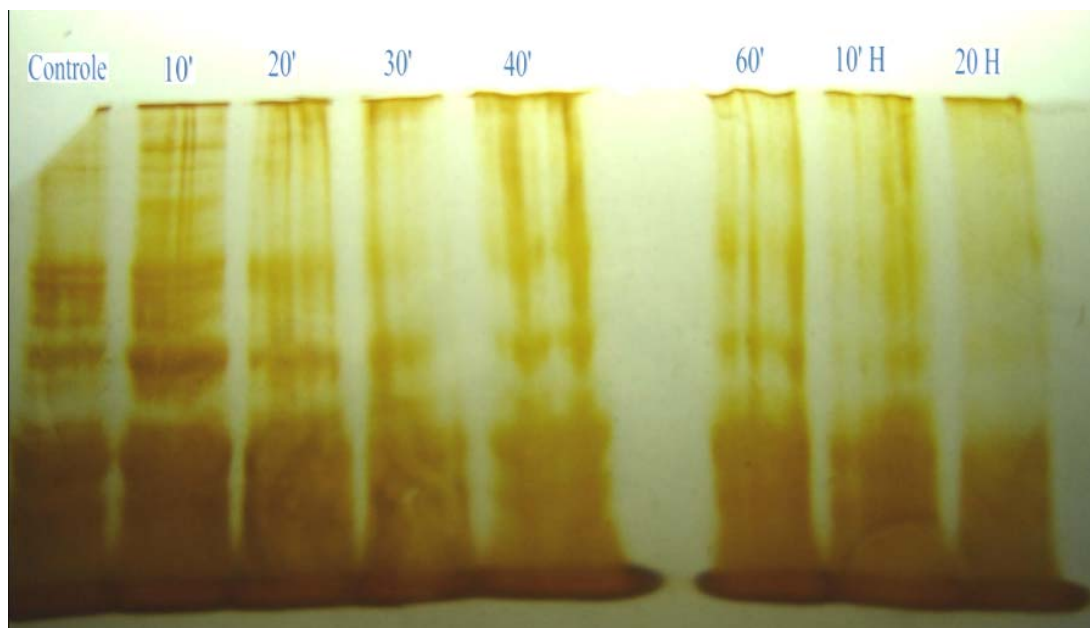


Figura 3.38. SDS page de amostras irradiadas por ultravioleta.

É interessante notar que, nos primeiros minutos de exposição, ocorre um espessamento de varias bandas medianas, que posteriormente desaparecem gradualmente com o aumento do tempo de exposição ao ultravioleta. Isso indica que o conteúdo protéico referente àquelas bandas diminui com o aumento da dosagem de UV.

Verifica-se também que, em todas as amostras, ocorre uma grande mancha na parte inferior do poço (região de concentração de proteínas de menor massa), indicando que muitas proteínas diferentes não foram separadas.

Vale ressaltar que este trabalho não dispôs de anticorpos para as proteínas GVPa e GVPc (que formam os aerótopos) e, por isso, não se pode concluir acerca dos efeitos do ultravioleta sobre as vesículas de gás, especificamente. Mas, pode-se concluir que o ultravioleta afeta algumas proteínas da *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Mais experimentos são necessários para maiores esclarecimentos sobre, por exemplo, quais proteínas são diretamente afetadas pelo UV ou qual é a dosagem mínima capaz de afetar o conteúdo protéico das células.

CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho, deve-se novamente ressaltar a importância do estudo do movimento vertical das cianobactérias, tendo em vista não apenas o foco científico, mas também o desenvolvimento de tecnologias que possam auxiliar no tratamento de águas, contaminadas por cianobactérias, que são usadas para consumo humano. Nesse sentido, este trabalho contribui com o desenvolvimento e a construção de um equipamento que é capaz de auxiliar, por exemplo, nos estudos acerca da influência de fatores externos sobre a regulação da flutuabilidade dos organismos. O foco dos testes realizados com o equipamento foi a cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, entretanto, o mesmo pode ser utilizado com outras espécies.

Os experimentos realizados mostraram que o equipamento é confiável e estável, o que viabiliza estudos futuros, mais extensos e aprofundados. Além disso, esses experimentos despertaram a atenção para alguns fenômenos interessantes que serão abordados em trabalhos futuros. Dentre eles, destaca-se a influência de luz visível sobre o posicionamento dos organismos na coluna vertical de amostra e o efeito do ultravioleta sobre a regulação de flutuabilidade das cianobactérias. Os resultados obtidos por este trabalho são preliminares, pois tiveram por objetivo a realização de testes com o equipamento de varredura, mas constituem uma grande motivação para um maior aprofundamento nessas questões.

Os dados obtidos pelo equipamento de varredura utilizado neste trabalho permitem a construção de duas hipóteses sobre fototaxia para a *Cylindrospermopsis raciborskii*. São elas:

1. Os resultados apresentados no Experimento 5 – Aplicação de leds de alta luminosidade e diferentes cores –, descrito no capítulo 3, mostram que fótons na região de frequências próxima à cor verde sensibilizam o movimento vertical da *Cylindrospermopsis raciborskii* muito mais que fótons com frequências próximas às regiões de azul e vermelho. Uma hipótese para explicar esta sensibilidade considera uma situação real, onde os organismos localizados nas regiões mais profundas de um corpo de água teriam menos luz azul e vermelha disponível, pois grande parte desta luz pode ser absorvida por aqueles

localizados em profundidades menores, para a realização da fotossíntese. Assim, a sensibilidade ao verde permitiria detectar a presença de luz e disparar mecanismos para a regulação de sua flutuabilidade como, por exemplo, a produção de aerótopos.

2. A velocidade de sedimentação quando se aplicou UV foi 10 vezes maior do que aquela obtida quando se aplicou pressão (os aerótopos foram colapsados). Com a observação de que quando se aplica UV não há diminuição, pelo menos aparente, do número de aerótopos, conclui-se que não há variação do volume da cianobactéria. Assim, é razoável pensar que um aumento excessivo de massa, através da fotossíntese na presença de UV, foi o responsável por essa maior taxa de sedimentação. Este aumento excessivo da densidade provoca um movimento vertical em sentido oposto à localização da fonte de luz. Esse rápido movimento poderia ser pensado como uma tentativa de fuga do UV, já que esta radiação degrada as proteínas das células e pode causar a morte dos organismos.

Para uma melhor compressão desses processos, e para verificação das hipóteses restantes, mais experimentos são necessários. Estes fazem parte dos trabalhos a serem realizados, os quais incluem também a implementação de técnicas para verificação do estado de vida ou morte das células de cianobactérias. Uma possível proposta seria o uso da técnica de patch-clamp.

Deve-se ressaltar que durante todo o período de testes, o equipamento se mostrou eficiente não tendo ocorrido nenhum tipo de falha em seu funcionamento que não houvesse sido prevista. Neste trabalho, foram sugeridos apenas alguns procedimentos experimentais que utilizam o aparelho, o que não exclui a possibilidade de este ser usado para outras finalidades.

Por fim, deve-se destacar que um pedido de registro de patente pelos autores do presente equipamento se encontra em andamento.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. G., 2000, "Heterocyst formation in cyanobacteria", *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, n. 6 (Dez), pp. 618-624.
- ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2002, *Fundamentos da Biologia Celular: Uma Introdução à Biologia Molecular da Célula*, Edição Universitária, São Paulo, Artmed Editora S.A.
- AZEVEDO, S. M. F. O., 1998, "Toxinas de Cianobactérias: Causas e conseqüências para a Saúde Pública", *Medicina On line*, v. 1, n. 3, pp. 1-22.
- AZEVEDO, S. M. F. O., CARMICHAEL, W. W., JOCHIMSENC, E. M., RINEHARTD, K. L., LAUD, S., SHAW, G. R., EAGLESHAMF G. K., 2002., "Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru — Brazil", *Toxicology*, v. 181 e 182, pp. 441-446.
- AZEVEDO, S. M. F. O., BRANDAO, C. C. S., 2003, *Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano: Impactos na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano*, Ministério da Saúde – Ascom, Brasília.
- BERMAN-FRANK, I., LUNDGREN, P., FALKOWSKI, P., 2003, "Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria", *Research in Microbiology*, v. 154, pp. 157-164.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C., MOLICA, R., 2003, "Cianobactéria Invasora", *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 30 (Jan/Jun), pp. 82-90.
- BOHREN, C. F., HUFFMAN, D. R., 1983, *Absorption and scattering of light by small particles*, Nova Iorque, Wiley-Interscience.
- CHORUS, I., BARTRAM, J., 1999, *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, Londres, F & FN Spon.
- CRAYTON, M. A., 1993, *Toxic Cyanobacteria Blooms. A Field/Laboratory Guide*, Office of Environmental Health Assessments, Washington.

HAIDER, S., NAITHANI, V., VISWANATHAN, P.N., KAKKAR, P., 2003, "Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern", *Chemosphere*, v. 52, pp. 1-21.

HOWARD, J., 2001, *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*, Massachusetts, Sinauer Associates.

HUNTER, P.R., 1998, "Cyanobacterial toxins and human health", *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, v. 84 pp. 35S-40S.

ISVÁNOVICS, V., SHAFIK, H. M., PRÉSING, M., JUHOS, S. V., 2000., "Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures", *Freshwater Biology*, v. 43, pp. 257-275.

JONES, W. W., SAUTER, S., 2005, "Distribution and Abundance of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Indiana Lakes and Reservoirs", School of Public and Environmental Affairs - Indiana University.

KAEBERNICK, M., NEILAN, B. A., 2001, "Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production". *Microbiology Ecology*, v. 35, pp. 1-9.

LANDAU, L. D., LIFSHITZ, E. M., 1987, *Fluid Mechanics*, 2ª edição, Nova Iorque, Pergamon Press.

MOORE, D., MCGREGOR, G. B., GLEN SHAW, G., 2004, "Morphological Changes During Akinete Germination In *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria)", *J. Phycol.*, v. 40, pp. 1098–1105.

MOORE, D., O'DONOHUE, M., GARNETT, C., CRITCHLEY, C., SHAW, G., 2005, "Factors affecting akinete differentiation in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria)", *Freshwater Biology*, v. 50, pp. 345–352.

OKUNO, E., Vilela, M. A. C., 2005, *Radiação Ultravioleta: Características E Efeitos*, 1ª edição, São Paulo, Editora Livraria da Física.

PADISÁK, J., 1997, "*Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology", *Arch. Hydrobiol./Suppl.*, v. 107, n. 4, pp. 563-593.

PADISÁK, J., 2003, "Estimation of minimum sedimentary inoculum (akinetete) pool of *Cilindrospermopsis Raciborskii*: a morphology and life-cycle based method", *Hydrobiologia*, v. 502, pp. 389-394.

PORAT, R., TELTSCH, B., MOSSE, R. A., DUBINSKY, Z., WALSBY, A. E., 1999, "Turbidity changes caused by collapse of cyanobacterial gas vesicles in water pumped from Lake Kinneret into the Israeli national water carrier", *Wat. Res.*, v. 33, n. 7, pp. 1634-1644.

ROSET, J., AGUAYO, S., MUÑOZ, MJ., 2001, "Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión", *Rev. Toxicol*, v. 18, pp. 65-71.

SCOFIELD, J., H., 1994, "A frequency-domain description of a lock-in amplifier", *Am. J. Phy.* V.62, pp. 129-133.

SILVA, A., P., 2005, *Desenvolvimento de instrumentação óptica no visível e infravermelho para o estudo de materiais dopados com γB^{3+} e tM^{3+}* . Tese de M. Sc., Departamento de Física/UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil.

SINHA, R. P., KLISCH, M., GRÖNIGER, A., HÄDER, D., 2001, "Responses of aquatic algae and cyanobacteria to solar UV-B", *Plant Ecology*, v. 154, pp. 221–236.

TIRALDO, M. M., GARCIA DE LA TORRE, J., 1980, "Rotational dynamics of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders", *J. Chem. Phys.*, v. 73, n. 4, pp. 1986 – 1993.

TOBIN, A. J., DUSHECK, J., 1998., *Asking about life*, Florida, Saunders College Publishing.

VAN DE HULST, H. C., 1981, *Light Scattering by Small Particles.*, edição Dover, New York. Dover Publications.

VASAS, G., GÁSPÁR, A., PÁGER, C., SURÁNYI, G., MÁTHÉ, C., HAMVAS, M. M., BORBELY, G., 2004, "Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, v. 25, pp. 108-115.

WAALAND, J. R., WAALAND, S. D., BRANTON, D., 1971, "Gas Vacuoles, Light Shielding in Blue-Green Algae", *The Journal of Cell Biology*, v. 48, n. 1, pp. 212-215.

WALSBY, A. E., 1971, "The Pressure Relationships of Gas Vacuoles", *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, v. 178, pp. 301-326.

WALSBY, A. E., 1972, "Structure and Function of Gas Vacuoles", *Bacteriological Reviews*, v. 36, n. 1, pp. 1-32.

WALSBY, A. E., 1984, "Lower limit of the gas permeability coefficient of gas vesicles", *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, v. 223, pp. 177-196.

WALSBY, A. E., HAYES, P. K., 1989., "Gas vesicle proteins", *Biochem. J.*, v. 264, pp. 313-322.

WALSBY, A. E., 1994, "Gas Vesicles", *Microbiological Reviews*, v. 58, n.1, pp. 94-144.

WILLIAMSON, C. E., NEALE, P. J., GRAD, G., DE LANGE, H. J., HARGREAVES, B. R., 2001, "Beneficial and Detrimental Effects of UV on Aquatic Organisms: Implications of Spectral Variation", *Ecological Applications*, v. 11, n. 6, pp. 1843-1857.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION)., 2003, *Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1: coastal and fresh waters*, Geneva, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

A figura 1.1 foi retirada do seguinte endereço de internet:

<http://io.uwinnipeg.ca/~simmons/16labman05/lb1content.htm>. EVOLUTION ECOLOGY AND BIODIVERSITY WINTER 2005 LAB MANUAL ONLINE. (For University of Winnipeg Students). 16.04.2005.

A figura 1.2 foi retirada do seguinte endereço de internet:

<http://hypnea.botany.uwc.ac.za/phylogeny/classif/cyan2.htm>. 28/05/2006.