

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

ACÚMULO, DEPURAÇÃO E EFEITOS DE MICROCISTINAS
(HEPATOTOXINAS DE CIANOACTÉRIA) EM *Tilapia rendalli*
(CICHLIDAE)

Raquel Moraes Soares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia do Departamento de Ecologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ecologia.

Rio de Janeiro-RJ
1999

ACÚMULO, DEPURAÇÃO E EFEITOS DE MICROCISTINAS
(HEPATOTOXINAS) DE CIANOBACTERIA EM *Tilapia rendalli*
(CICHLIDAE)

Moraes Soares, Raquel

ACÚMULO, DEPURAÇÃO E EFEITOS DE MICROCISTINAS (HEPATOTOXINAS DE
CIANOBACTERIA) EM *TILAPIA RENDALLI* (CICHLIDAE).

Dissertação de Mestrado, Departamento de Ecologia, UFRJ, 1999.
76p.; 8 figuras, 15 tabelas.

Palavras-chave: 1. *Microcystis aeruginosa*. 2. *Tilapia rendalli*.
3. Cianobactéria. 4. Microcistinas. 5. Bioacumulação

Raquel Moraes Soares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia do Departamento de Ecologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ecologia.

Rio de Janeiro-RJ
1999

FICHA CATALOGRÁFICA

Moraes-Soares, Raquel

ACÚMULO, DEPURAÇÃO E EFEITOS DE MICROCISTINAS (HEPATOXINAS DE CIANOBACTÉRIA) EM *TILAPIA RENDALLI* (CICHLIDAE).

Dissertação de Mestrado, Departamento de Ecologia, UFRJ, 1999.
76p.: 8 figuras, 15 tabelas.

Palavras-chave: 1. *Microcystis aeruginosa*. 2. *Tilapia rendalli*.
3. Cianobactéria. 4. Microcistinas. 5. Bioacumulação

ORIENTADORA:


Prof. Dr. Sandra M.F.O. Azevedo

DEDICATÓRIA

ORIENTADORA:

Sandra e. P. O. Azevedo

Prof^a. Dr^a. Sandra M.F.O e Azevedo

A minha mãe Libânia, pelo exemplo de
humanidade e por tamanha dedicação à uma
filha que dá tanto trabalho.

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora, Prof^a. Dra. Sandra Azevedo, por minha formação profissional, pela oportunidade e pelo carinho tão importantes nestes anos de trabalho.
- À Capes pelo financiamento e bolsa de estudos concedida. Ao CNPq/Pronex e à CEE pelo suporte financeiro.
- Ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais pela utilização dos equipamentos da Central Analítica.
- Ao Prof. Dr. Alfredo Oliveira e todo o querido pessoal do Lab. de Biologia-NPPN: Marly, Celso, Joaquim, Bete, Elza, Cosma, Sheila e Ricardo pela tantas de vezes que ajudaram e pela amizade.
- Ao Prof. Dr. Jean Valentinim e ao Depto. de Biologia Marinha-UFRJ pelo empréstimo dos aquírios.
- A Prof^a. Dra. Érica Caramanchi, Berney e João pelo empréstimo de materiais, pela atenção e valiosas dicas na manutenção dos peixes.
- Ao pessoal do Lab. de Físico-Química Biológica – IBCCF-UFRJ, em especial aos amigos: Gustavo, Jennifer, Nilson, Adriana e Rafael pelas pescarias em conjunto e ajuda nas horas de sufoco.
- Aos Profs. Dr. Julio Scharfstein (IBCCF-UFRJ), Dr. Pedro Persechini (IBCCF-UFRJ) e Dr. Vivaldo Moura Neto (Anatomia-UFRJ) pelas facilidades laboratoriais concedidas.
- Ao meu querido amigo Marcelo Einicker Lamas pelo intercâmbio fundamental entre vários laboratórios da Universidade, atualmente pelas ótimas ideias, pelas milhares de caronas, pela amizade incrível e pela força em todos os momentos.
- À Marcinha da Secretária do PPGE, pela paciência, carinho e grande ajuda em vários momentos deste mestrado.
- Aos Profs. Dr. Allen Hagler e Dr. Francisco Esteves pela revisão da tese.
- Ao Prof. Dr. Vítor Vasconcelos pela elaboração do plano de tese.
- Ao Prof. Dr. Luiz Otávio pela ajuda na estatística e pela amizade (hoje implicância!)

À minha mãe Libânia, pelo exemplo de humanidade e por tamanha dedicação à uma filha que dá tanto trabalho.

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora, Profª. Dra. Sandra Azevedo, por minha formação profissional, pela oportunidade e pelo carinho tão importantes nestes anos de trabalho.
- À Capes pelo financiamento e bolsa de estudos concedida. Ao CNPq/Pronex e à CEE pelo suporte financeiro.
- Ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais pela utilização dos equipamentos da Central Analítica.
- Ao Prof. Dr. Alfredo Oliveira e todo o querido pessoal do Lab. de Biologia-NPPN: Marly, Celso, Joaquim, Bete, Elza, Cosme, Sheila e Ricardo pela tantas de vezes que ajudaram e pela amizade.
- Ao Prof. Dr. Jean Valentim e ao Depto. de Biologia Marinha-UFRJ pelo empréstimo dos aquários.
- À Profª. Dra. Érica Caramaschi, Barney e João pelo empréstimo de materiais, pela atenção e valiosas dicas na manutenção dos peixes.
- Ao pessoal do Lab. de Físico-Química Biológica – IBCCF-UFRJ, em especial aos amigos: Gustavo, Jennifer, Nilson, Adriana e Rafael pelas pescarias em conjunto e ajuda nas horas de sufoco.
- Aos Profs. Dr. Julio Scharfstein (IBCCF-UFRJ), Dr. Pedro Persechini (IBCCF-UFRJ) e Dr. Vivaldo Moura Neto (Anatomia-UFRJ) pelas facilidades laboratoriais concedidas.
- Ao meu querido amigo Marcelo Einicker Lamas pelo intercâmbio fundamental entre vários laboratórios da Universidade, atualmente pelas ótimas idéias, pelas milhares de caronas, pela amizade incrível e pela força em todos os momentos.
- À Marcinha da Secretaria do PPGE, pela paciência, carinho e grande ajuda em vários momentos deste mestrado.
- Aos Profs. Dr. Allen Hagler e Dr. Francisco Esteves pela revisão da tese.
- Ao Prof. Dr. Vítor Vasconcelos pela amizade e pela orientação tão valiosa na elaboração do plano de tese.
- Ao Prof. Dr. Luiz Otávio pela ajuda na estatística e pela amizade (haja implicância!)

- Aos meus queridos amigos e companheiros de trabalho no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias-NPPN-UFRJ: Ana Cláudia, Andréia, Elisângela, Iury, João, Karine, Marcelo, Patrícia, Simone, Valéria, Vinícius e Sr. Natal, pela ajuda de todos, orientação, amizade e pelo carinho de sempre. À minha amiga Ana faço um agradecimento muito especial pela enorme ajuda nas pescarias!
- Aos amigos Renato, Silvia e Aloysio que agora estão longe, mas que também ajudaram muito.
- Às minhas amigas Andréia, Cristiana, Alessandra, Patrícia, Mai, Adriana e Meg pela lições compartilhadas, pelo carinho e pelo apoio sempre.
- À galera mais do que especial: Ana Lúcia, Adriana, Adriana Pugli, Alfredo, André, André(Lhana), Andréia, Bel, Carlos, Cláudio, Calvin, Daniele, Fabian, Flávio, Jennifer, Marcelo, Marcos, Meg, Nilson, Patricia, Renato, Ricardo e Zannoti pelos momentos mais hilariantes da minha vida, pela amizade e alegria fundamental nas horas mais tensas.
- À minha mãe maravilhosa, Libânia, ao meu querido pai, Hélio e ao meus irmãos Eliana e Marcelino pelo amor e por ajudarem sempre .
- Ao meu tão amado Ricardo, por sua presença, companherismo, ajuda em tantos momentos e por encher minha vida de alegria.
- E finalmente a todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente nestes anos de trabalho.

RESUMO

O intenso crescimento da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* formando florações em vários ambientes aquáticos, tem sido freqüentemente relatado. Esta espécie pode produzir de hepatotoxinas (microcistinas) que podem causar danos severos à biota aquática e mamíferos. Os efeitos desta cianobactéria tóxica na ictiofauna são de grande importância devido ao papel ecológico, econômico e social desses organismos tanto na rede trófica quanto na economia e saúde de populações humanas que se alimentam desses peixes. O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de acúmulo e depuração de microcistinas em *Tilapia rendalli* e o efeito dessas toxinas no crescimento deste peixe. Foram realizados três experimentos com peixes jovens em condições de laboratório. No primeiro, os peixes foram expostos, durante 15 dias, a um alimento contendo ração e células tóxicas de *Microcystis aeruginosa* (20,4µg de microcistina/dia/peixe). Nos 15 dias seguintes, os peixes receberam alimento não contaminado. A cada 3 dias, 4 peixes foram retirados e as fezes foram coletadas para análises de microcistinas. No segundo experimento, os peixes foram alimentados, por 28 dias, apenas com células tóxicas de *M. aeruginosa* (14,6µg de microcistina/dia/peixe). No terceiro experimento, os peixes receberam alimento com ração e células tóxicas, previamente rompidas, durante 6 semanas, com 29,2µg de microcistina/dia/peixe. Nestes dois experimentos os peixes foram amostrados a cada 7 dias, sendo também realizada a biometria destes organismos. As análises de microcistinas no fígado, músculo e fezes foram feitas por imunoenensaio tipo ELISA. Os resultados do primeiro experimento indicaram que com seis dias de ingestão os peixes apresentaram o nível mais elevado de microcistinas no fígado (0,6µg.g⁻¹), sendo que no músculo esta maior dose aconteceu já na fase de depuração (24º dia -0,05µg.g⁻¹), indicando possivelmente, uma transferência de microcistinas do fígado para o músculo. Ao interromper a ingestão de células tóxicas, os peixes excretam aproximadamente 50% das toxinas acumuladas através das fezes. No segundo experimento, observou-se que o alimento contendo apenas células tóxicas favoreceu um maior acúmulo de microcistinas nos tecidos em relação aos outros experimentos. No terceiro experimento, o rompimento das células tóxicas fez com que as toxinas livres fossem absorvidas de maneira diferente, sendo o maior concentração no fígado encontrada no 42º dia (1,7µg.g⁻¹). Uma redução no ganho de peso de peixe

intoxicados com microcistinas também foi observado neste experimento. Este trabalho permitiu verificar que *Tilapia rendalli* ao ingerir células de *M. aeruginosa* e microcistinas em concentrações normalmente encontradas em florações pode acumular estas toxinas em concentrações acima do limite aceitável para o consumo humano, o que representa um sério risco para o ecossistema aquático e para saúde pública.

ABSTRACT

ACCUMULATION, DEPURATION AND EFFECTS OF MICROCYTINS (CYANOBACTERIA HEPATOTOXINS) IN *TILAPIA RENDALLI* (CICHLIDAE)

The occurrence of blooms of *Microcystis aeruginosa* in several water bodies has been frequently reported. This cyanobacteria species is able to produce microcystins (hepatotoxic heptapeptide), which can cause serious damage on the aquatic biota and mammalian. The effects of the toxic cyanobacteria *M. aeruginosa* in fish are relevant due to the ecological, economic and social importance of these organisms usually consumed as human food. This work studied the process of accumulation and depuration of microcystins in *Tilapia rendalli* and the effects of these toxins on the growth of this fish. Three experiments with juveniles maintained in lab conditions were done. In the first one each fish received, during 15 days, fish food plus toxic cells of *M. aeruginosa* (20,4µg of microcystins per day). In the following 15 days, the organisms were feed without toxic cells. Four fishes were harvested every 3 days and faeces were collected for microcystins analyses. In the second experiment, fishes were feed, only with toxic cells of *M. aeruginosa* (14,6µg of microcystins/day/fish) during 28 days. In the third experiment, fishes were feed with fish food plus toxic cells previously lised (29,2µg of microcystins/day/fish), during 6 weeks. In these two last experiments, fishes were harvested every 7 days, and the biomethric parameters were annoted. The microcystin concentration in the liver, muscle and faeces were determined by ELISA imunoassays. In the first experiment the highest concentration of microcystins in the liver tissue was observed on the 6th day (0,6µg.g⁻¹), while in the muscle it occurred during depuration period (24th day 0,05µg.g⁻¹). It suggested a possible transference of microcystins from the liver to the muscle. Almost 50% of the toxins were released through the faeces during the depuration period. In the second experiment, the nourishment only with toxic cells could have caused the accumulation of higher microcystin concentrations than in the other experiments. In the third experiment, the toxins were released by cellular lise and the uptake of these toxins seemed to be different. In the liver, the highest concentration was observed on the last day (1,7µg.g⁻¹). During this experiment a decrease in body weight was verified in the intoxicated individuals. This study showed us that *Tilapia rendalli* when consuming *M. aeruginosa*

cells and microcystins in concentrations usually found during blooms occurrence can accumulate these toxins above the tolerable limit for human consumption. This fact can be a serious risk for aquatic ecosystem and public health.

Ficha catalográfica	ii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
1- Introdução	1
1.1- Cianobactérias	1
1.1.2- Produção de toxinas por cianobactérias	3
1.2- Cianobactérias e Peixes	7
2- Objetivos	16
3- Material e Métodos	17
3.1- Cultivo das cepas de <i>Microcystis aeruginosa</i>	17
3.2- Quantificação de microcistinas produzidas pela cepa NPLJ-4	18
3.3- Manutenção de <i>Tilapia rendalli</i> em laboratório	20
3.3.1- Coleta dos peixes	20
3.3.2- montagem e monitoramento dos aquários	21
3.4- Teste inicial: Estabelecimento do método de fornecimento de cianobactérias tóxicas à <i>Tilapia rendalli</i>	22
3.5- Primeiro experimento: Acúmulo e depuração de microcistinas em tecidos de <i>Tilapia rendalli</i>	24
3.6- Segundo experimento: Acúmulo de microcistinas em tecidos de <i>Tilapia rendalli</i> alimentadas sem ração	25
3.7- Terceiro experimento: Acúmulo de microcistinas em tecidos de <i>Tilapia rendalli</i> alimentadas com células rompidas e efeitos no crescimento	27

SUMÁRIO

Ficha catalográfica	ii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
1-Introdução	1
1.1-Cianobactérias	1
1.1.2- Produção de toxinas por cianobactérias	3
1.2-Cianobactérias e Peixes	7
2- Objetivos	16
3- Material e Métodos	17
3.1- Cultivo das cepas de <i>Microcystis aeruginosa</i>	17
3.2- Quantificação de microcistinas produzidas pela cepa NPLJ-4	18
3.3- Manutenção de <i>Tilapia rendalli</i> em laboratório	20
3.3.1- Coleta dos peixes	20
3.3.2- montagem e monitoramento dos aquários	21
3.4- Teste inicial: Estabelecimento do método de fornecimento de cianobactérias tóxicas à <i>Tilapia rendalli</i>	22
3.5- Primeiro experimento: Acúmulo e depuração de microcistinas em tecidos de <i>Tilapia rendalli</i>	24
3.6- Segundo experimento: Acúmulo de microcistinas em tecidos de <i>Tilapia rendalli</i> alimentadas sem ração	25
3.7- Terceiro experimento: Acúmulo de microcistinas em tecidos de <i>Tilapia rendalli</i> alimentadas com células rompidas e efeitos no crescimento	27

3.8- Extração e análise de microcistinas em amostras de tecidos de <i>Tilapia rendalli</i>	30
3.8.1- Extração	30
3.8.2- Análise das amostras por imunoenensaio tipo ELISA	32
3.9- Análise estatística dos dados morfométricos de <i>Tilapia rendalli</i>	33
4- Resultados e Discussão	34
4.1- Teste inicial: Estabelecimento do método de fornecimento de cianobactérias tóxicas à <i>Tilapia rendalli</i>	34
4.2- Primeiro experimento: Acúmulo e depuração de microcistinas em tecidos de <i>Tilapia rendalli</i>	35
4.3- Segundo experimento: Acúmulo de microcistinas em tecidos de <i>Tilapia rendalli</i> alimentadas sem ração	41
4.4- Terceiro experimento: Acúmulo de microcistinas em tecidos de <i>Tilapia rendalli</i> alimentadas com células rompidas e efeitos no crescimento	48
4.5- Discussão geral	53
4.6- Avaliação do potencial de risco do acúmulo de microcistinas em músculo de <i>Tilapia rendalli</i> para a população humana	57
5- Conclusões	63
6 – Bibliografia	66
7- Anexos	73
7.1- Primeiro experimento	73
7.2- Segundo experimento	74
7.3- Terceiro experimento	76

1- INTRODUÇÃO:

1.1) Cianobactérias:

As cianobactérias, também chamadas de cianofíceas (algas-azuis) e, mais recentemente, cianoprocaríotos, surgiram em nosso planeta há aproximadamente 3,5 bilhões de anos. A elas é atribuído o surgimento do oxigênio livre na Terra. São organismos fotossintetizantes porém, diferem de todos os vegetais inferiores e superiores por serem procariontes e apresentarem uma organização bioquímica e celular bastante semelhante às outras bactérias.

As cianobactérias apresentam uma distribuição geográfica bastante ampla, ocorrendo em locais tão extremos quanto fontes termais abissais e fissuras de rochas do Ártico. Este fato reflete a diversidade genotípica e fenotípica do grupo, sendo assim encontramos cianobactérias planctônicas, bentônicas, terrestres e até simbiotes com plantas e animais (Whitton, 1992, citado em Chorus & Bartram 1999).

Sua morfologia básica inclui formas unicelulares, coloniais, filamentosas e várias espécies apresentam características de grande vantagem adaptativa como fixação de nitrogênio atmosférico e presença de aerótopos (ou vacúolos gasosos), que facilitam a flutuação na coluna d'água.

Os habitats com maior ocorrência de cianobactérias são os ambientes de água doce (naturais ou artificiais), mares e águas salobras (Carmichael, 1994). Nestes ambientes, quando surgem as condições mais favoráveis para o crescimento destes organismos, tais

como: abundância de luz, temperatura entre 25 e 30°C e abundância de nitrogênio e fósforo, verifica-se um intenso crescimento de cianobactérias.

Regiões temperadas e regiões tropicais diferem quanto a ocorrência destas condições. Em regiões temperadas a sazonalidade é bem marcada, temperaturas altas e abundância de luz geralmente só ocorrem no verão. Sendo assim, a dominância de cianobactérias fica freqüentemente limitada à esta estação. Já nos trópicos não existe uma grande diferença sazonal nas condições de luz e temperatura, que são em geral, altas o ano inteiro, portanto, de acordo com as características do corpo d'água, pode ocorrer dominância de cianobactérias durante todo o ano (Chorus & Bartram 1999).

Segundo estes autores, a eutrofização crescente dos corpos d'água continentais e costeiros tem se manifestado como um fenômeno mundial, que vem se intensificando a partir dos anos 50, sendo suas causas principais o desenvolvimento urbano, industrial e agrícola. Corpos d'água eutróficos favorecem o intenso crescimento de cianobactérias que podem se apresentar sob a forma de "blooms", definidos como espessas camadas de células na superfície do corpo d'água. Estes têm sido registrados com grande frequência em vários países como: Canadá, E.U.A , Portugal, Inglaterra, África do Sul, China, Brasil, entre outros (Yoo *et al.*, 1995).

Um "bloom" em um corpo d'água pode criar problemas como diminuição da biodiversidade aquática do local, liberação de odores desagradáveis, além de substâncias que podem deixar a água com gosto ruim (muito incômodo caso esta seja usada para abastecimento). Freqüentemente também pode ocorrer a diminuição do oxigênio dissolvido no momento em que o "bloom" entra em colapso e as células mortas começam a ser decompostas ou no período noturno, devido a respiração desses organismos (Watanabe & Park.,1996).

Mas existe uma preocupação ainda maior e mais séria quanto ao surgimento de um “bloom”. Cianobactérias são potencialmente produtoras de toxinas que podem causar sérios danos a mamíferos e prejudicar também a biota aquática (Carmichael *et al.*, 1985 citado em Yoo *et al.*, 1995). Portanto, a ocorrência de “blooms” em corpos d’água utilizados para abastecimento, torna este fenômeno um problema de saúde pública.

No Brasil, a intensa eutrofização de águas de reservatórios, lagoas e lagos tem favorecido um maior crescimento de cianobactérias (Tundisi & Tundisi.,1992). Além disso, grande parte das cepas de cianobactérias isoladas de corpos d’água brasileiros mostraram-se tóxicas. Sabendo-se que muitos destes corpos d’água são reservatórios de grandes cidades utilizados para o abastecimento da população, a liberação destas toxinas na água torna-se um risco para a saúde pública. (Azevedo *et al.*, 1994; Costa & Azevedo, 1994).

1.1.2) Produção de toxinas por cianobactérias:

As toxinas de cianobactérias são definidas como endotoxinas e geralmente só são liberadas quando acontece o rompimento da célula. Estão divididas em várias classes: dermatotoxinas, citotoxinas, neurotoxinas e hepatotoxinas, sendo estas duas últimas classes as mais frequentes e de maior preocupação. Uma espécie de cianobactéria pode produzir mais de um tipo de toxina e dentro de uma mesma espécie podem existir cepas produtoras de toxinas e cepas não produtoras de toxinas.

Espécies produtoras de neurotoxinas têm sido verificadas com frequência na América do Norte, Europa e Austrália. No Brasil tem sido registrada a ocorrência do gênero *Cylindrospermopsis*, produzindo neurotoxinas conhecidas como “veneno paralizante de moluscos” ou PSPs (Paralytic Shellfish Poisoning) (Lagos *et al.*, 1997.).

Em bioensaios com camundongos, quando injetados intraperitonealmente, estes alcalóides neurotóxicos causam a morte rapidamente por parada respiratória (entre 2 e 30 minutos). Estas neurotoxinas são classificadas em três tipos: a anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas. As primeiras agem nas ligações sinápticas sendo que a anatoxina-a se liga ao receptor da acetilcolina irreversivelmente e a anatoxina-a(s) inibe a ação da acetilcolinesterase. Assim, ambas provocam o mesmo efeito, que é a super estimulação neuromuscular. As saxitoxinas (PSPs) agem bloqueando os canais de sódio do neurônio e, conseqüentemente, impedindo a transmissão do impulso nervoso.

Todas essas neurotoxinas são muito potentes. A DL₅₀ para a anatoxina-a, dose letal que resulta em 50% de morte dos camundongos injetados, varia entre 200 e 250 µg.Kg⁻¹ de peso corpóreo, e para a anatoxina -a(s) é 20 µg.Kg⁻¹ de peso corpóreo. Já as saxitoxinas (PSPs) apresentam, em média, uma DL₅₀ de 10 µg.Kg⁻¹ (Chorus & Bartram 1999). As PSPs também são produzidas por dinoflagelados marinhos, que são o alimento de diversas espécies de moluscos. Conseqüentemente estes organismos podem acumular estas toxinas em seus tecidos. Seres humanos já morreram por se alimentarem de mariscos intoxicados (Anderson, 1994, citado em Chorus & Bartram, 1999) e por isso atualmente, o monitoramento da ocorrência dessas toxinas nos mares é extremamente rigoroso, em vários países do mundo.

Os gêneros relacionados a produção de neurotoxinas são: anatoxina-a, produzida por *Anabaena* e *Oscillatoria*, anatoxina-a(s) por *Anabaena* e saxitoxinas por *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis* (Yoo *et al.*, 1995).

As hepatotoxinas peptídicas, as chamadas microcistinas e nodularinas, foram assim nomeadas por terem sido primeiramente isoladas dos gêneros *Microcystis* e *Nodularia*, respectivamente. Os gêneros já identificados como potencialmente produtores de

microcistinas são *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc*, e *Anabaenopsis*. Já a nodularina só foi encontrada até o momento em *Nodularia spumigena*. Estas toxinas são compostos hidrofílicos, com pouca capacidade de ultrapassar membranas lipídicas de células animais. Sendo assim, para que ocorra seu efeito tóxico é necessário que sejam carregadas. Em animais essas toxinas são transportadas pela via dos ácidos biliares sendo portanto, o fígado, o órgão alvo.

A ação dessas toxinas se constitui basicamente na inibição de proteínas fosfatases 1 e 2A nas células hepáticas. Esta inibição permite a atuação desordenada das proteínas quinases que vão agir em várias organelas e principalmente no citoesqueleto, provocando o seu desarranjo. As células perdem sua estrutura parenquimal criando uma pressão negativa no tecido que faz romper os capilares sanguíneos. Isto, em último grau, provoca uma hemorragia intra-hepática e o animal morre por choque hipovolêmico. Além disso, essa inibição também pode levar a formação de tumores hepáticos, devido à intensa fosforilação do material genético da célula (Carmichael, 1994). A DL₅₀ das hepatotoxinas varia de 50 a 300 µg.Kg⁻¹ de peso corpóreo (por injeção intraperitoneal em camundongos).

As microcistinas são as toxinas de cianobactérias mais frequentemente encontradas em "blooms" em todo o mundo. Estas são peptídeos formados por cinco D-aminoácidos e dois L-aminoácidos, sendo que a variação destes dois últimos é um dos principais fatores que levam a existência de aproximadamente 60 tipos de microcistinas. Dois aminoácidos presentes na estrutura da microcistina são fundamentais na sua atividade: o Adda (também presente na nodularina) – (2S,3S,8S,9S)- 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-ácido dienóico e o Mdha - *N*-methyldehydroalanina. O Adda é considerado a parte da molécula responsável por sua atividade biológica, devido a sua interação com as

proteínas fosfatases. Já o Mdha é importante por formar uma ligação covalente irreversível com estas mesmas proteínas (Falconer & Humpage, 1996).

Recentemente um alcalóide citotóxico chamado de cilindrospermopsina foi isolado do gênero *Cilindrospermopsis*. Apesar de poder agir sobre outros tecidos, seu órgão-alvo também é o fígado. No entanto, apresenta um mecanismo de ação bastante diferente das outras hepatotoxinas e sua DL₅₀ é bem mais alta variando de 0,2 a 2,1mg.Kg⁻¹ (Yoo *et al.*, 1995).

Sabe-se que efeitos adversos de toxinas de cianobactérias em seres humanos e animais têm sido causados principalmente pelo consumo de água contaminada. Recentemente um gravíssimo incidente ocorrido em Caruaru (PE) comprovou o perigo das toxinas de cianobactérias. Aproximadamente 130 pessoas se intoxicaram e 54 morreram por ficarem expostas, através de hemodiálise, à água contaminada com microcistinas de cianobactérias que cresciam abundantemente em um reservatório da região (Jochimsen *et al.*, 1998)

Entretanto, poucos são os estudos ecológicos que investigam o papel dessas toxinas no ambiente. Existe um grande debate mundial sobre uma possível vantagem adaptativa na produção destes metabólitos secundários pelas cianobactérias. Uma hipótese é a de que as toxinas contribuem para o controle da herbivoria. Segundo Lampert (1987), em experimentos de laboratório, várias espécies de zooplâncton apresentaram inibição alimentar e até um aumento da mortalidade quando expostas à cianobactérias. Ferrão-Filho (1998) comprovou a toxicidade de *Microcystis aeruginosa*, produtora de microcistinas, a dois gêneros de cladóceros, *Moina* e *Ceriodaphnia*. No entanto, algumas espécies de rotíferos e dáfnias são capazes de se alimentar de cianobactérias tóxicas sem serem afetadas (Yoo *et al.*, 1995). Vasconcelos (1995) verificou, em experimentos de laboratório,

que moluscos bivalves acumulam hepatotoxinas em altas concentrações sem haver mortalidade durante o período de estudo, o que representa um risco para a população humana que consome estes organismos.

1.2) Cianobactérias e Peixes:

Embora existam diversas espécies de peixes herbívoros e fitoplanctívoros, não são muito numerosos os estudos que elucidam os efeitos e as respostas destes organismos à cianobactérias tóxicas.

[As cianobactérias são possivelmente um importante componente na dieta alimentar de vários peixes ciclídeos e ciprinídeos tropicais (Bowen, 1982, citado em Beveridge *et al.*, 1993).] As tilápias, que embora sejam ciclídeos que freqüentemente apresentam um comportamento onívoro, podem ser consideradas peixes herbívoros verdadeiros, pois apresentam um sistema digestivo altamente especializado, capaz de produzir valores de pH abaixo de 1, o que facilita a digestão de carboidratos altamente refratários de plantas (Bitterlich & Gnaiger, 1984, citados em Dempster *et al.*, 1995). Além disso, apresentam um tubo digestivo longo. Conseqüentemente, tilápias são capazes de assimilar de 70 a 80% do carbono de cianobactérias ingeridas, tais como *Microcystis* e *Anabaena* (Moriarty & Moriarty, 1973, citados em Beveridge *et al.*, 1993).

No entanto, o comportamento filtrador de tilápias resulta num balanço energético negativo, se apenas espécies unicelulares e de pequeno diâmetro forem ingeridas. Porém, este balanço pode se tornar positivo se peixe passar a ingerir espécies coloniais e massas de

cianobactérias que formam “blooms” ou mesmo o sedimento rico em detritos de algas (Dempster *et al.*, 1995).

Isto é comprovado pela espécie de tilápia *Oreochromis niloticus* que exibe uma preferência marcante pela cianobactéria *Anabaena cylindrica* em relação à *Microcystis aeruginosa*, sugerindo uma filtração mais eficiente deste peixe em algas filamentosas. Outras espécies também apresentam um aumento substancial nas taxas de filtração a medida que aumenta-se o tamanho das células de algas (Northcott *et al.*, 1991, Dempster *et al.*, 1995).

A estratégia de alguns peixes herbívoros de se alimentarem de colônias ou “blooms” de cianobactérias levou à experiências de introdução de peixes herbívoros em lagos eutróficos, com o objetivo de reduzir a população de cianobactérias (Starling, 1993). Datta & Jana (1998) observaram que a introdução de carpas e tilápias reduziu entre 60 e 93% a população de *Microcystis* não tóxica de limnocurrais em um lago eutrófico.

Mas, esta capacidade de certos peixes de alimentarem com eficiência de cianobactérias pode ser limitada pelas toxinas produzidas por estes organismos. Beveridge *et al.*, (1993) demonstraram que as taxas de filtração e o crescimento das espécies de tilápia *Hypophthalmichthys molitrix* e *Oreochromis niloticus* foram suprimidos na presença de *Microcystis aeruginosa* tóxica. Um trabalho com um resultado semelhante a este foi o de Keshavanath *et al.*, (1994) onde *O. niloticus* apresentou um decréscimo na ingestão de uma mistura de *Microcystis aeruginosa* tóxica e não tóxica à medida que aumentou-se a proporção da cepa tóxica.

Contudo, no ambiente natural, mesmo tendo a habilidade de evitar a ingestão de cianobactérias tóxicas, muito peixes ainda são afetados por estas toxinas por estarem confinados em tanques de aquacultura ou pequenos lagos, onde a ingestão destas células se

torna inevitável (Tencalla & Dietrich, 1997). Além disso, nestas situações de confinamento, os peixes podem ficar expostos às toxinas dissolvidas na água quando ocorre a morte “bloom” e, conseqüentemente, as células se rompem.

Estudos de comportamento com o peixe-zebra, *Danio rerio* demonstraram que ocorrem alterações significativas na motilidade deste peixe exposto a microcistina-LR dissolvida na água mesmo na concentração de $0,5\mu\text{g. L}^{-1}$, além da supressão da produção de ovos (Beganz *et al.*, 1998).

Em corpos d’água com a ocorrência de intensos “blooms”, a mortalidade de peixes sempre foi atribuída à hipoxia devido a alta demanda de oxigênio necessária para decompor um “bloom” em fase senescente. Em lagos do Chile central, a dominância da espécie *Microcystis aeruginosa* coincidiu com uma mortalidade massiva de carpas (Zambrano & Canelo, 1996). No entanto, em muitos casos, o nível de saturação de oxigênio da água era suficiente para não causar este efeito (Bury *et al.*, 1996). Com isto, alguns estudos foram feitos para verificar o efeito das toxinas destes “blooms”, dissolvidas na água, na troca iônica de peixes.

Bury e colaboradores (1996), expuseram a tilápia *O. niloticus* a extratos de uma cepa tóxica e uma não tóxica de *Microcystis aeruginosa* e observaram uma significativa hipocalcemia no plasma dos peixes expostos às duas cepas. Ambas as cepas também inibiram a absorção de Ca^{+2} na membrana basolateral das brânquias assim como no retículo endoplasmático. Neste caso, evidenciou-se um efeito maior de outras substâncias desta cianobactéria, além da microcistinas, no transporte de cálcio deste peixe. Em 1998, Bury *et al.*, verificaram que substâncias obtidas em extratos hidrofóbicos de cianobactérias tóxicas, mais precisamente ácidos graxos, são inibidores potentes de nitrofenol fosfatase – K^{+} dependente de brânquias de *O. niloticus*. Estes autores observaram que estas substâncias

são inibidores mais eficientes que a toxina microcistina-LR. Essa enzima atua em conjunto com a Na^+ / K^+ -ATPase, portanto sua inibição atua indiretamente no balanço de sódio do peixe, gerando um desequilíbrio osmótico.

Portanto, estes estudos indicaram que compostos lipídicos de cianobactérias são inibidores de troca iônica mais potentes que toxinas de cianobactérias. Entretanto, Gaete *et al.* (1994) demonstraram um efeito significativo de microcistina -LR em brânquias da carpa *Cyprinus carpio*. Esta toxina inibiu o funcionamento de enzimas como Na^+ / K^+ , Na^+ , HCO_3^- e Ca^{+2} ATPases de maneira dose-dependente, contribuindo para o desequilíbrio iônico deste peixe.

Baseando-se nestes trabalhos, pode-se verificar que mesmo não gerando hipoxia, um “bloom” pode provocar alterações no comportamento e até mesmo mortalidade de diversos peixes devido às substâncias que liberam no momento da morte e rompimento de suas células.

Um outro grave problema ecológico que microcistinas dissolvidas na água podem gerar é na embriogênese de peixes. Estudos sobre os efeitos de extratos de células de *Microcystis aeruginosa*, contendo esta toxina, no peixe *Danio rerio*, demonstraram aparecimento de mal formações e alta mortalidade dos embriões, sendo que aqueles que sobreviveram apresentaram um desenvolvimento larval retardado (Oberemm *et al.*, 1997, Oberemm *et al.*, 1999).

Vários estudos demonstraram o efeito de microcistinas na fisiologia de algumas espécies de peixe após a ingestão ou injeção intraperitoneal destas toxinas.

No sangue de carpas, as microcistinas levam à mudanças significativas em certos índices como: contagem de eritrócitos, hemoglobina, etc. Porém, estas alterações ainda se encontraram dentro de valores aceitáveis. Atribui-se essas mudanças, tais como o aumento

da contagem de eritrócitos, à alterações morfológicas no órgão alvo da toxina, o fígado, e perda de sangue para o mesmo (Navrátil *et al.*, 1998).

Microcistinas também afetam os índices bioquímicos de peixes. Råbergh *et al.*, (1991) observaram um aumento na atividade de enzimas hepáticas tais como lactato desidrogenase (LDH), alanina aminotransferase (ALAT) e aspartato aminotransferase (ASAT), apenas duas horas após a injeção intraperitoneal de microcistina-LR em carpas. Carbis *et al.* (1997), também observaram elevados índices de atividade destas duas últimas enzimas em carpas coletadas em um lago afetado por um “bloom” de *Microcystis aeruginosa*. Estes autores consideram que a atividade elevada destas enzimas foi correspondente ao estado necrótico de muitas células do fígado afetado por esta toxina.

Estudos mais específicos do efeito de microcistinas em peixes avaliaram a inibição de proteínas fosfatases 1 e 2A no fígado e os danos histológicos e ultraestruturais causados por essa inibição.

Sahin *et al.* (1995) ofereceram por via oral à trutas, [*Oncorhynchus mykiss*], extratos de *M. aeruginosa* contendo microcistinas e verificaram que com uma concentração de 0,05nM de toxina ocorria uma inibição de 50% da atividade de proteínas fosfatases 1 e 2A deste peixe. Esta inibição equivale, segundo estes autores, as mesmas encontradas para fosfatase de músculo de coelho e fígado de camundongo. Assim, fosfatases de peixes parecem ser sensíveis a microcistinas igualmente às fosfatases de mamíferos.

Tencalla & Dietrich, (1997) verificaram que uma dose de 2µg de microcistina-LR. g⁻¹ de fígado inibe a atividade total de proteínas fosfatases deste tecido em trutas (*Oncorhynchus mykiss*). A concentração de toxina acumulada no fígado que proporcionou esta inibição foi de aproximadamente 2% da quantidade oferecida através de extratos via

oral. Isto indicou que, aparentemente, o trato intestinal de trutas representa uma barreira importante à entrada de toxinas.

Em situações de intoxicação aguda, a inibição destas enzimas por microcistinas pode provocar alterações morfológicas graves no fígado.

O salmão do Atlântico é um exemplo de estudos feito para se comprovar o papel de microcistinas em doenças hepáticas que podem ocorrer em peixes. Andersen *et al.*, (1993) expuseram este salmão à doses altas de microcistina-LR e observaram que esta acarretou em uma necrose difusa e megalocitose por todo o fígado. Este experimento reproduziu exatamente os sintomas encontrados nos salmões criados em fazendas de aquacultura na América do Norte, que geraram mortalidade destes peixes e enormes prejuízos para esta economia.

Em experimentos de injeção intraperitoneal de microcistina-LR em carpas (*Cyprinus carpio*), com doses variando de 130 à 550 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de peso corpóreo, o efeito tóxico na célula hepática produz vesiculação do retículo endoplasmático, desligamento de ribossomos do retículo endoplasmático rugoso, perda das vilosidades das mitocôndrias, assim como dispersão de diversas organelas. Também foi observado uma reorganização de microfilamentos, perda da estrutura parenquimal das células e uma grande quantidade de células necróticas (Råbergh *et al.*, 1991).

Este efeito degenerativo das microcistinas no fígado pode levar os peixes à morte em poucos dias. Foi verificado que trutas que ingeriram, através de células liofilizadas, uma dose de 6,6mg de microcistina-LR. Kg^{-1} de peso corpóreo morreram em um período de 96 horas. Uma dose 10 vezes menor demonstrou não ser tóxica em uma única ingestão, no entanto quando oferecida gradativamente causou danos ao fígado (Tencalla *et al.*, 1994).

Basicamente, a principal diferença dos efeitos no fígado observados em peixes em relação à mamíferos é o fato que neste último o efeito agudo de microcistina culmina em intensa congestão do fígado, devido à uma hemorragia intra-hepática. Esta situação não foi observada em peixes. Baseados nisto, Råbergh *et al.*,(1991) e Kotak *et al.*,(1996) consideraram que a morte em peixes ocorre, não por choque hipovolêmico, como nos mamíferos, e sim pela falência funcional do fígado, devido a intensa necrose de suas células.

Estes mesmos autores também observaram efeitos nos rins, tais como: necrose tubular e dilatação da cápsula de Bowman. Os efeitos nos rins foram mais intensos do que em mamíferos e a isto foi atribuído o fato de que rins de peixes ficam expostos por mais tempo às microcistinas, pois os peixes levam mais tempo que mamíferos para sofrerem o efeito letal de microcistinas.

Uma vez intoxicados, os peixes podem excretar microcistinas acumuladas no fígado. A principal via de excreção é a bile (Sahin *et al.*,1996). Além disso, alguns estudos sugerem existir uma metabolização desta toxinas. Pflugmacher *et al.*(1998) observaram que este processo se inicia com a formação de um composto mais polar que as microcistinas através de uma reação enzimática.

A excreção realizada por estes peixes é de extrema importância, visto que toxinas acumuladas em seus tecidos podem ser repassadas na cadeia alimentar.

A bioacumulação de microcistinas foi verificada por Williams *et al.*(1997a), em salmão do Atlântico que se alimentava de larvas de caranguejo. As larvas filtradoras apresentavam altas concentrações de microcistinas e quando ingeridas, estas toxinas eram acumuladas pelo salmão, causando sérios danos ao fígado deste peixe. Este fato ocasionou

grandes prejuízos econômicos a países que os criam com fins comerciais, tais como E.U.A e Canadá.

No Rio de Janeiro, nos últimos anos, tem havido uma diminuição na produção pesqueira na Lagoa de Jacarepaguá concomitantemente com a ocorrência de freqüentes e duradouros “blooms” tóxicos de cianobactérias no local. Esta lagoa, localizada na zona oeste da cidade, apresenta uma comunicação indireta com o mar através da Lagoa da Tijuca e recebe uma grande quantidade de esgoto doméstico e industrial o que a torna eutrófica e bastante poluída (Fernandes, 1991). Portanto, ainda não se pode fazer uma relação direta entre os dois eventos citados acima. Entretanto, nas análises feitas no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, NPPN-UFRJ, a espécie de peixe mais consumida desta lagoa, *Tilapia rendalli*, têm apresentado altas concentrações de microcistinas no fígado com sintomas de hemorragia hepática já observados. Estas hepatotoxinas, também são encontradas nas demais vísceras, ova e no músculo (Magalhães *et al.*, 1999).

A ictiofauna tem um papel fundamental no ecossistema aquático e possivelmente está sendo afetada na Lagoa de Jacarepaguá. Além disso, existe uma comunidade de pescadores que depende economicamente da produção pesqueira do local. Se o músculo dos peixes está sendo contaminado com toxinas de cianobactérias, um problema de saúde pública pode estar sendo gerado na população o consome.

No Brasil, a introdução de espécies de tilápias tais como: *Tilapia rendalli* e *Oreochromis niloticus*, em reservatórios de todo o país, principalmente no nordeste, vem sendo realizada desde 1956 (Gurgel & Fernando, 1994). O intuito das autoridades é o aproveitamento comercial desses reservatórios pela comunidade, além do aumento do conteúdo proteico na dieta destas populações mais carentes.

No entanto, estes reservatórios, atualmente, têm apresentado condições ideais para dominância de cianobactérias, o que de fato tem sido observado. Entretanto, o monitoramento da produção de toxinas por esses organismos é escasso e conseqüentemente o pescado também não é analisado.

Pouco se sabe sobre o processo de acúmulo destas toxinas nos tecidos de peixes nas condições naturais em que vivem e a maior parte dos trabalhos da literatura não utilizaram a ingestão oral de células de cianobactérias para verificar os efeitos de microcistinas nesses organismos. No entanto, isto é fundamental para que identifique as situações de risco para a população. Portanto, um estudo que vise verificar acúmulo, a depuração e efeitos de cianobactérias tóxicas em peixes em condições mais próximas à realidade é de grande relevância científica e social.

*a depuração de microcistinas em fígado e músculo de *Tilapia rendalli*, submetidos a dieta com uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa*.*

*2- Efeitos da ingestão de *Microcystis aeruginosa* tóxica no crescimento de *Tilapia rendalli*.*

*3- Contribuir para o estabelecimento de limites máximos aceitáveis de células de *Microcystis aeruginosa* e concentrações de microcistinas em ambientes de aquicultura pesqueira.*

2- Objetivos:

Em face dos dados expostos, este estudo visa contribuir com o conhecimento sobre os efeitos da alimentação de *Tilapia rendalli* com células de *Microcystis aeruginosa* produtoras de microcistinas. Para tanto, teve-se os seguintes objetivos específicos:

- 1- Verificar o acúmulo e a depuração de microcistinas em fígado e músculo de *Tilapia rendalli*, submetidos a dieta com uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa*.
- 2- Verificar o efeito de *Microcystis aeruginosa* tóxica no crescimento de *Tilapia rendalli*.
- 3- Contribuir para o estabelecimento de limites máximos aceitáveis de células de *Microcystis aeruginosa* e concentrações de microcistinas em ambientes de exploração pesqueira.

3- MATERIAL E MÉTODOS:

Neste trabalho foram realizados quatro experimentos. Em todos eles existiram três etapas iniciais de trabalho: o cultivo das cepas da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, a quantificação de microcistinas produzida pela cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* e a coleta e manutenção em laboratório dos peixes da espécie *Tilapia rendalli*. Como etapa final, em todos os experimentos, foi realizada a extração e a análise de microcistinas no fígado e no tecido muscular dos peixes através do método de imunoenensaio tipo ELISA.

3.1) Cultivo das cepas de *Microcystis aeruginosa* :

As cepas da espécie *Microcystis aeruginosa* escolhidas para serem utilizadas nos experimentos descritos a seguir foram:

NPLJ-4 – origem: Lagoa de Jacarepaguá – Rio de Janeiro- RJ

NPJT-1– origem: Lagoa de Juturnaíba – Araruama – RJ

NPBR-2 – origem: Represa do Broa – SP

Essas cepas foram isoladas a partir de amostras de água dos locais citados acima e fazem parte da coleção de culturas de cianobactérias do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – NPPN- UFRJ.

Todas foram cultivadas em meio ASM-1 (Gorham *et al.*,1964), pH = 8,0, sob temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e intensidade luminosa de $22\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 12

horas e aeração contínua. Os inóculos para iniciar o cultivo foram sempre equivalentes a 10% do volume das culturas e continham aproximadamente 10^5 cels.mL⁻¹.

3.2) Quantificação de microcistinas produzidas pela cepa NPLJ-4:

Dentre as cepas citadas anteriormente, somente NPLJ-4 é produtora de microcistinas. Antes do início dos experimentos com esta cepa foi necessário a quantificação desta toxina produzida por célula. Este dado é muito importante, uma vez que, nos experimentos realizados, o acúmulo de microcistinas em tecidos de peixe foi avaliado de acordo com a quantidade de toxina oferecida.

Para tanto, a cepa NPLJ-4 foi cultivada em um litro do meio ASM-1, como o descrito no item 3.1. O cultivo teve duração de 12 dias, o que corresponde, aproximadamente, ao final da fase exponencial de crescimento desta cepa. A cultura foi então centrifugada a 13.000g, originando um concentrado de células com $1,3 \times 10^7$ células.ml⁻¹. O mesmo foi congelado, liofilizado e o peso deste material seco foi de 145mg.

Em uma etapa seguinte foi feita a extração destas células liofilizadas, de acordo com a metodologia descrita por Krishnamurthy *et al.*, (1986), onde uma solução de butanol: metanol: água (5: 20: 75 v/v) foi adicionada ao material seco (seguindo a proporção de 100mL de solução para cada 500mg de material seco) . Esta mistura sofreu agitação por uma hora e em seguida foi centrifugada, sendo o sobrenadante recolhido. Este procedimento foi repetido por três vezes e os extratos, reunidos, foram evaporados à um terço do volume inicial. As microcistinas contidas neste extrato final foram parcialmente purificadas passando-se o mesmo em um cartucho de C₁₈ que em seguida foi eluído com 20mL de água deionizada, 20mL de metanol 20% e 20mL de metanol 100%. Esta última

3.3) Manutenção de *Tilapia rendalli* em laboratório:

3.3.1) Coleta dos peixes:

Para a realização do teste inicial e dos dois primeiros experimentos, as tilápias foram coletadas em um pequeno lago pertencente a um “Pesque e Pague” no bairro de Campo Grande- RJ, onde foi verificado não haver presença de cianobactérias na água.

Já no terceiro experimento, as tilápias foram coletadas em um tanque do Setor de Aquacultura, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde também não foi verificada a presença de cianobactérias na água.

A coleta destes peixes foi feita com tarrafa de malha fina, sendo selecionados peixes jovens, com aproximadamente 5cm de comprimento, conseqüentemente, não maduros sexualmente. Estes organismos foram transportados em sacos plásticos com água do local misturadas à água da rede de abastecimento. Estes sacos foram colocados em uma caixa de isopor e os peixes assim foram transportados até o laboratório.

No laboratório, os peixes foram postos nos aquários depois de passarem por um período de aclimação de algumas horas para que a água dos sacos plásticos pudessem atingir a mesma temperatura do aquário.

Antes de todos os experimentos, os peixes ficaram aproximadamente duas semanas no aquário recebendo alimento não tóxico, ração para peixe ornamental comercial, *ad libinium*, para que se aclimassem ao novo ambiente. Assumiu-se que este alimento não continha microcistinas, pois a descrição de sua composição pelo fabricante não mencionava o uso de nenhum produto de origem de cianobactérias.

3.3.2) Montagem e monitoramento dos aquários:

Os aquários utilizados nos experimentos foram retangulares, de vidro e com capacidade para 80L, aproximadamente. Todos receberam 60L de água da rede de abastecimento filtrada em filtro de membrana de fibra de vidro para uso doméstico. O cloro foi removido com a adição de hipossulfito de sódio (marca Pet Vita, 1 gota/ litro).

No primeiro e no segundo experimento, os aquários continham um filtro externo vertical de cascalho com uma cobertura de lã de vidro. A água do aquário era sugada através de uma mangueira fina de silicone, passava pelo filtro externo e era devolvida ao aquário, através de uma bomba submersa (Better) ligada à outra mangueira de silicone. O excesso de partículas em suspensão ficava retido neste filtro. Por conta disto, foi necessário trocar a lã vidro a cada dois dias.

Nos dois últimos experimentos, foi montado no fundo dos aquários um filtro biológico com aproximadamente 4cm de espessura. Fixado ao fundo deste filtro, havia um cano de pvc que sustentava um bomba submersa (Better) na superfície da água. Esta bomba, então, sugava a água que havia passado pelas camadas do filtro e a relançava na superfície do aquário, junto com bolhas de ar.

Todos os aquários foram envoltos com papel opaco para que os peixes não sofressem com algum estresse visual.

A temperatura da água dos aquários se manteve entre $23,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, o pH oscilou entre 5,5 e 6,5 e o oxigênio dissolvido apresentou valores entre 55% e 70% de saturação no final e no início dos experimentos, respectivamente.

resultados

3.4) Teste inicial: Estabelecimento do método para fornecimento de cianobactéria tóxica à *Tilapia rendalli*:

Para se iniciar os experimentos principais de acumulação foi necessário determinar o melhor método para se oferecer as células de *Microcystis aeruginosa* aos peixes, uma vez que o oferecimento das células livres no aquário não permitiria saber a quantidade exata de células ingeridas.

Para tanto, o primeiro passo foi cultivar 1L da cepa NPLJ-4 e centrifugar a cultura para concentrá-la (item 3.2).

Primeiro método testado:

- 1- 17,4g de ração comercial para peixes ornamentais foram embebidas em 0,6 mL de concentrado de células da cepa NPLJ-4, correspondendo a uma concentração de $8,3 \times 10^6$ células por grama de alimento.
- 2- Este material foi seco em estufa (50°C) para que este alimento fosse oferecido em pequenos pedaços aos peixes.

O alimento depois de seco não manteve consistência ao ser posto em um frasco com água, se dissolvendo completamente, por isso outro método foi testado:

Segundo método testado:

- 1- 0,8g de ágar foram dissolvidos em 34 mL de água deionizada, aquecendo-se até a temperatura de 86°C .

2- Após a dissolução, esperou-se a temperatura baixar até aproximadamente 50°C e acrescentou-se 1,2mL de cultura concentrada da cepa NPLJ-4, correspondendo a uma concentração de $7,51 \times 10^6$ células por grama de alimento.

3- Imediatamente acrescentou-se 4,0g de ração comercial (10% do alimento total); a mistura foi então homogeneizada e colocada em formas de gelo para resfriar e endurecer em geladeira.

4- Depois de endurecido, o alimento foi partido em pedaços de aproximadamente 0,1 cm de diâmetro e colocado em frasco com água para verificar se o mesmo mantinha a sua consistência.

Como o alimento manteve-se consistente em água, decidiu-se testar a aceitação dos peixes e quantidade ingerida por dia.

Após o preparo do alimento, foram colocados sete peixes jovens, com aproximadamente 5cm de comprimento, em um aquário montado e monitorado como o descrito no item 3.3.2. Os sete peixes foram alimentados diariamente pela manhã, por cinco dias, com o alimento preparado e cortado em pedaços pequenos como descrito anteriormente. O modo de oferecimento foi *ad libitum*, ou seja, ofereceu-se até o momento em que os peixes paravam de ingerir os pequenos pedaços. Como o alimento havia sido pesado anteriormente, soube-se o quanto os sete peixes haviam ingerido descontando o peso final do peso inicial do alimento.

No final do experimento, soube-se que cada peixe ingeriu em média 1g de alimento por dia. Este foi o peso de alimento oferecido em todos os experimentos seguintes, sendo o modo de preparo também o mesmo, ou seja, ágar em concentração de 2% e ração em concentração de 10%. O que variou em cada experimento foi a quantidade, a presença de

células (no caso dos controles não foram adicionadas células) ou a sua concentração. Além da presença ou não de ração no alimento.

3.5) Primeiro experimento: Acúmulo e depuração de microcistinas em tecidos de *Tilapia rendalli* :

Para este experimento, três aquários foram montados como descrito no item 3.3.2 desta seção. Cada aquário recebeu 20 peixes, com aproximadamente 5cm de comprimento. Um aquário foi selecionado para receber o alimento controle e os outros dois aquários receberam alimento tóxico, ou seja, contendo células da cepa NPLJ-4.

Para preparar o alimento tóxico, foi feito um cultivo de 9L da cepa NPLJ-4 como o descrito no item 3.1 desta seção. Ao final do cultivo a cultura foi desmontada e concentrada em um filtrador tangencial (Millipore) à aproximadamente 1L. Com o concentrado, foi feita a contagem das células em microscópio óptico, utilizando-se a câmara de contagem Fucks-Rosenthal. O número de células encontrado foi de $4,32 \times 10^8$ células.mL⁻¹.

Neste experimento ofereceu-se uma concentração de **20,4µg** de microcistinas por grama de alimento, equivalente à $2,6 \times 10^8$ células.g⁻¹. Para o preparo tanto do alimento contendo as células tóxicas da cepa NPLJ-4 quanto do alimento controle utilizou-se o método descrito no item 3.4 desta seção.

O experimento durou 1 mês e foi dividido em duas fases: nos quinze primeiros dias cada peixe dos dois aquários-teste recebeu 1g de alimento tóxico por dia. Foi a chamada “fase de acúmulo de microcistinas”. Nos últimos quinze dias, os peixes destes aquários passaram a receber, diariamente, o alimento controle, na mesma proporção anterior. Foi a

chamada “fase de depuração de microcistinas”. O aquário controle recebeu diariamente o alimento controle, na mesma proporção dos aquários-teste, durante todo o experimento.

A cada três dias, dois peixes de cada aquário foram retirados utilizando-se um “puçá” feito com rede de nylon. Os peixes foram mortos por resfriamento e em seguida dissecados com bisturi para a retirada do fígado e da quantidade máxima possível de músculo. O fígado e o músculo de cada peixe foram pesados e reunidos, ou seja, havia um becker com os fígados ou músculos teste e um com os fígados ou músculos controles. Em seguida, todos foram levados à extração.

Todos os dias as fezes foram retiradas de cada aquário para a verificação da possível presença de microcistinas neste material, além de células de *Microcystis aeruginosa* não digeridas. As fezes foram recolhidas e congeladas e posteriormente extraídas e analisadas pelo método de imunoenensaio tipo ELISA.

Um volume de 1L da água de cada aquário foi retirado, a cada três dias, para a verificação da presença de microcistinas dissolvida, sendo este volume repostado com água filtrada.

3.6) Segundo experimento: Acúmulo de microcistinas em tecidos de *Tilapia rendalli* alimentadas sem ração.

Neste experimento, semelhante ao anterior, três aquários foram montados como descrito no item 3.3.2. Cada aquário recebeu 21 peixes com aproximadamente 5cm de comprimento. Um aquário foi selecionado para receber o alimento controle e os outros dois

aquários receberam um o alimento tóxico, contendo células da cepa NPLJ-4 e o outro um alimento preparado com células da cepa NPJT-1, não tóxica.

Inicialmente pretendeu-se verificar a diferença entre o crescimento de peixes alimentados com uma cepa tóxica e com uma cepa não tóxica. O alimento preparado com ambas as cepas não continha ração.

As cepas foram cultivadas em 9 L de meio (item 3.1) e concentradas à 1L (item3.5). O concentrado da cepa NPLJ-4 continha $3,2 \times 10^8$ células.mL⁻¹ e o concentrado da cepa NPJT-1 continha $2,4 \times 10^8$ células.mL⁻¹. O preparo dos alimentos foi realizado como descrito no item 3.4, exceto pela não adição de ração. O alimento controle, contendo ração, também foi preparado como descrito no item 3.4. A concentração de microcistinas no alimento tóxico foi de **14,6µg** por grama, o que correspondeu à uma concentração de $1,9 \times 10^8$ células. g⁻¹ de alimento. Esta concentração de células foi utilizada no preparo do alimento não-tóxico.

Cada peixe foi alimentado, diariamente pela manhã, com 1g de alimento por dia. Sendo que todo o alimento oferecido foi sempre ingerido em no máximo 5 minutos. Esta comprovação feita através observação detalhada do comportamento dos peixes após cada etapa de alimentação.

Três peixes foram retirados de cada aquário a cada sete dias, tendo sido o experimento planejado para durar 7 semanas. Os peixes retirados dos aquários foram analisados da mesma forma que no experimento anterior.

3.7) Terceiro experimento: Acúmulo de microcistinas em tecidos de *Tilapia rendalli* alimentadas com células rompidas e efeitos no crescimento.

Este experimento, teve o mesmo objetivo do experimento anterior, ou seja, comparar o crescimento de peixes alimentados com uma cepa tóxica e outra não-tóxica.

A montagem dos aquários foi igual ao experimento anterior, contendo cada aquário 18 peixes de aproximadamente 5cm de comprimento. O experimento teve duração de 6 semanas e três peixes de cada aquário foram retirados a cada sete dias. Os peixes foram mortos e dissecados como no item 3.5 até o momento da extração e análise de microcistinas nos tecidos.

A cepa não tóxica escolhida foi NPBR-2. Esta cepa e a NPLJ-4 foram cultivadas em 9L de meio e concentradas a 1L (ítems 3.1 e 3.5). A cepa NPLJ-4 chegou à uma concentração de $4,45 \times 10^8$ células.mL⁻¹. A concentração de microcistinas foi de 29,2µg por grama de alimento, o que correspondeu à uma concentração de $3,8 \times 10^8$ células.g⁻¹ de alimento. O concentrado da cepa NPBR-2 chegou a $6,63 \times 10^8$ células.mL⁻¹ e para o preparo do alimento foi utilizado a mesma concentração de células.g⁻¹ presente no alimento tóxico. O alimento controle foi preparado na mesma quantidade e, em todos os aquários, cada peixe foi alimentado, diariamente pela manhã, com 1g de alimento durante os 42 dias do experimento.

Neste experimento a ração foi novamente acrescentada pois, deste modo, se houvesse uma diferença significativa entre o crescimento dos peixes alimentados com a cepa tóxica e a não-tóxica, a mesma não poderia ser atribuída à uma possível diferença nutricional.

Além disso, o concentrado de células da cepa NPLJ-4, depois de ter suas células contadas, foi exposto à uma ultrasonicação de 80mA por 9 minutos para que as células fossem rompidas e as toxinas ficassem disponíveis na solução. Assim, o volume do concentrado adicionado ao alimento, continuou tendo o mesmo número de células e concentração de microcistinas planejado, estas apenas ficaram livres na solução. Isto foi feito para que fosse potencializado o efeito dessas toxinas nos peixes e para que fosse observada uma possível diferença no processo de acúmulo de microcistinas nos tecidos. A cepa não-tóxica não foi exposta à ultrasonicação.

A tabela I apresenta o desenho experimental básico dos três experimentos. Fazendo-se uma correlação com ambiente, cada experimento poderia representar uma situação ecológica distinta. O primeiro poderia representar uma situação onde os peixes, por um período, se alimentam de células tóxicas, mas dispõem de outras fontes alimentares, sendo que haveria um período seguinte onde as células tóxicas deixariam de ocorrer no ambiente e os peixes não as ingeriria mais. O segundo experimento representaria uma situação de dominância ou “bloom” de *M. aeruginosa* tóxica, onde os peixes não teriam outra opção nutricional. E o terceiro experimento seria equivalente a um “bloom” tóxico em fase senescente, cujas células estão sendo rompidas e ingeridas pelos peixes, havendo no entanto, outras fontes de alimento aos mesmos.

Tabela I – Condições experimentais utilizadas nos 3 experimentos

Experimentos	Duração (dias)	Fases	No. de peixes nos aquários	Tipo de alimento oferecido (1g por peixe)	Concentração de microcistinas ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de alimento)	Concentração de células. g^{-1} de alimento	Intervalo (dias) e nº de peixes retirados por aquário
1º	30	1ª) acúmulo 15 dias	30	C- ágar+ração T- ágar+ração+ <i>M.a.</i> tóxica	20,4	$2,6 \times 10^8$	3 dias/ 2peixes
		2ª) depuração 15 dias	30	C- ágar+ração T- ágar+ração			3 dias/ 2 peixes Fezes -3 dias
2º	28	acúmulo	63	C- ágar+ração T1- ágar+ <i>M.a.</i> tóxica T2- ágar + <i>M.a.</i> 1 não-tóxica	14,6	$1,9 \times 10^8$	7 dias/ 3 peixes
3º	42	acúmulo	54	C- ágar+ração T1- ágar+ração+ <i>M.a.</i> tóxica rompida T2-ágar+ração+ <i>M.a.</i> 2 não-tóxica	29,2	$3,8 \times 10^8$	7 dias/ 3 peixes

C – controle

T – teste

M.a – *Microcystis aeruginosa*

3.8) Extração e análise de microcistinas nas amostras de tecidos de *Tilapia rendalli*:

3.8.1) Extração:

A extração das amostras de fígado e músculo dos peixes foi realizada seguindo a metodologia citada em Magalhães & Azevedo (1997).

Os fígados e músculos, previamente pesados, foram postos em beakers (como descrito na seção 3.5) e a eles foi adicionado 10mL de metanol 100%. Foram agitados por 1 hora, centrifugados e o sobrenadante recolhido, sendo este procedimento repetido mais uma vez. Os dois extratos resultantes foram unidos e colados em um funil de decantação. Em seguida, procedeu-se uma partição com hexano para a retirada do excesso de lipídios. Para isto, adicionou-se 20 mL deste solvente ao extrato metanólico, sendo a mistura, então, agitada. Este processo foi repetido por três vezes. A fase metanólica foi separada e levada a evaporação até a secura total.

Após esta etapa, o extrato seco, retido no frasco, foi ressuspensão em 20mL de água deionizada e esta solução foi passada em um cartucho de octadecilsilano (C18) para uma purificação parcial das microcistinas. O cartucho foi eluído com 30mL de água deionizada, 30mL de metanol 20% e 50mL de metanol 100%, sendo esta última fração evaporada à secura total.

O material seco foi ressuspensão em 1mL de água deionizada e filtrado em filtro de nylon ou celulose regenerada com poro de 0,45µm. Este volume foi mantido em freezer até a posterior análise de microcistinas por imunoenensaio tipo ELISA.

É importante ressaltar que toda a quantidade de microcistinas extraída dos tecidos se refere à microcistinas livres, pois no momento em que essas toxinas se ligam as proteínas fosfatases não podem ser extraídas, uma vez que esta é uma ligação covalente irreversível.

No primeiro experimento, as fezes dos peixes e algumas amostras da água do aquário também foram processadas para análise de microcistinas por imunoenaios tipo ELISA.

As fezes foram extraídas seguindo a metodologia descrita por Krishnamurthy *et al.*, (1986) para células (item 3.2), tendo como a única diferença a análise por ELISA e não por HPLC.

A análise da água seguiu a metodologia descrita por (Tsuji *et al.*, 1994). Para tanto, 1 L de cada aquário teste foi retirado, estes foram reunidos e passados em cartucho de C18 previamente ativado com 20ml de metanol 100% e 20ml de água deionizada. Em seguida o cartucho foi eluído com 20ml de água deionizada, 20mL de metanol 20% e 20mL de metanol 100%. Esta última fração foi passada em um cartucho de sílica gel ativada com 30ml de metanol 100%. Esta sílica foi eluída com 30mL de metanol 100% e 50mL de uma solução de água: metanol: ácido trifluoracético (10: 89.9: 0,1 v/v). Esta última fração foi totalmente seca. O material retido no frasco foi ressuspensão em 1mL de água e filtrado como na última etapa da extração dos tecidos.

3.8.2) Análise das amostras por imunoensaio tipo ELISA:

Todas as amostras de fígado, músculo, fezes e água foram analisadas pelo método de imunoensaio tipo ELISA para detecção de microcistinas desenvolvido por Chu *et al.*, (1990).

O método utilizado na análise de microcistinas é o chamado ELISA competitivo direto. O seu princípio se baseia na identificação de um antígeno (a microcistina) através de um anticorpo específico fixo à uma fase sólida (geralmente uma placa de material inerte). Ou seja, uma placa com anticorpos específicos fixos é incubada com a amostra contendo o antígeno e com um conjugado composto de antígeno ligado a uma enzima, neste caso a peroxidase. O antígeno ligado à enzima e o não ligado (a amostra) competem pela ligação com os anticorpos, sendo que a amostra tem a vantagem de ter sido incubada primeiro. Após a reação, a placa é lavada e somente o que foi ligado aos anticorpos permanece. O substrato da enzima é adicionado e a reação substrato-enzima é colorimétrica. Todas as microcistinas que existirem nas amostras se ligarão aos anticorpos, os que ficarem livres se ligarão ao conjugado microcistina-enzima. Portanto, o resultado é expresso de acordo com as absorbâncias das amostras e quanto mais reação de cor houver, menos toxina existe na amostra. A quantificação é obtida através da comparação das absorbâncias das amostras com as dos padrões de microcistinas.

Foram utilizados nestas análises “kits” de ELISA específicos para microcistinas da empresa americana Envirologix Inc. (catálogo no. EP 022).

Cada amostra analisada foi antes diluída com água deionizada para que, assim, a concentração de microcistinas da amostra estivesse dentro da faixa de concentração dos

padrões do “kit”, ou seja, para que fosse possível a interpolação dos valores de absorbância das amostras na curva padrão obtida e assim, a quantificação pudesse ser feita. Além disso, cada diluição foi analisada em duas réplicas.

3.9) Análise estatística dos dados morfométricos de *Tilapia rendalli* :

As médias de peso e comprimento dos peixes obtidos nos três tratamentos durante os dois últimos experimentos foram testados através de uma análise de variância, para verificar se houve uma diferença significativa entre os tratamentos. Utilizou-se o teste de Duncan, quando uma diferença foi observada com o objetivo de se identificar quais tratamentos diferiram entre si. Ambos os testes foram realizados a um nível de significância de 5% (Bieguelman, 1988).

Estas análises foram realizadas através do programa de Software STATISTICA.

Figura 11 - Peso do alimento oferecido e ingerido por *Tilapia rendalli* no teste inicial

Tratamento	Peso inicial do alimento (g)	Peso final do alimento (g)	Quantidade ingerida pelos 7 indivíduos (g)	Quantidade ingerida por indivíduo (g)
1	14,0	6,6	7,4	1,06
2	14,0	7,2	6,8	0,97
3	14,0	7,9	7,0	1,00
4	14,0	6,1	7,9	1,13
5	13,2	5,7	7,0	1,00

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1) **Teste inicial: Estabelecimento do método para fornecimento de cianobactéria tóxica à *Tilapia rendalli*:**

Este teste foi realizado para que se estabelecesse a metodologia utilizada nos experimentos seguintes. O composto feito de células de *Microcystis aeruginosa* e ração em uma matriz gelatinosa feita de ágar, demonstrou ser a forma de alimento mais adequada a ser utilizada. O ágar foi escolhido por ser um produto que fornece uma consistência semelhante a uma gelatina, o que permitiu a confecção de “blocos” de alimento mensuráveis e que provavelmente não seria tóxico ao peixe, sendo este fato confirmado neste experimento, e a ração foi acrescentada para que o alimento fosse nutricionalmente adequado e atraente ao peixe.

A tabela II mostra a quantidade de alimento ingerida pelos peixes nos 5 dias de teste. O valor médio dos cinco dias, de 1g por peixe, foi o utilizado para o fornecimento de alimento durante os experimentos seguintes.

Tabela II - Peso do alimento oferecido e ingerido por *Tilapia rendalli* no teste inicial

Dias	Peso inicial do alimento (g)	Peso final do alimento (g)	Quantidade ingerida pelos 7 indivíduos (g)	Quantidade ingerida por indivíduo (g)
1	14,0	6,6	7,4	1,06
2	14,0	7,2	6,8	0,97
3	14,0	7,0	7,0	1,00
4	14,0	6,1	7,9	1,13
5	14,0	7,0	7,0	1,00

4.2) Primeiro experimento: Acúmulo e depuração de microcistinas em fígado e músculo de *Tilapia rendalli*.

A presença de microcistinas (MCIST) no fígado e no músculo de *Tilapia rendalli*, alimentada durante 15 dias com a cepa tóxica NPLJ-4, está representada na figura 1.

Pode-se observar que já no terceiro dia de experimento, na fase de acúmulo, detectou-se a presença de $0,2 \mu\text{g MCIST.g}^{-1}$ de fígado destes organismos. No sexto dia encontrou-se $0,6\mu\text{g MCIST.g}^{-1}$ no fígado, o maior valor desta toxina no experimento. Esta concentração foi equivalente a 0,48% do total de microcistinas contidas nas células tóxicas ingeridas durante os seis primeiros dias ($122,4\mu\text{g}$) (Fig. 1A). Sendo que a ingestão diária de cada peixe foi de $20,4\mu\text{g}$ de MCIST. Portanto, a maior concentração de microcistinas acumulada no fígado representou uma percentagem bastante baixa em relação ao total ingerido por estes peixes. O trabalho realizado por Tencalla & Dietrich (1997), demonstrou que ingestão forçada de $342\mu\text{g}$ de MCIST leva à um acúmulo máximo de 1,5% deste total, no fígado de trutas, em 3 horas. No entanto, neste trabalho, as toxinas foram ingeridas livres, através de células liofilizadas, permitindo uma absorção mais rápida pelo trato intestinal. No caso deste primeiro experimento, as células contendo microcistinas foram oferecidas ao peixes intactas, tendo o peixe que digeri-las antes para absorver as toxinas.

Após estes seis primeiros dias, a concentração destas toxinas no fígado decaiu e, em seguida, voltou a aumentar até o final da fase de acúmulo, chegando a 0,1% do total ingerido. A partir do 15º dia, na fase de depuração os valores de microcistinas no fígado voltaram a decair chegando a $0,12\mu\text{g.g}^{-1}$ no final do experimento. No entanto neste período,

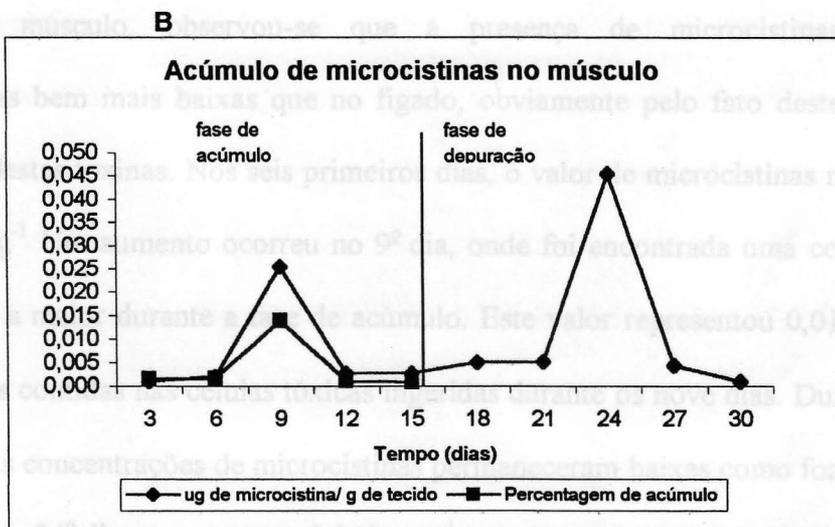
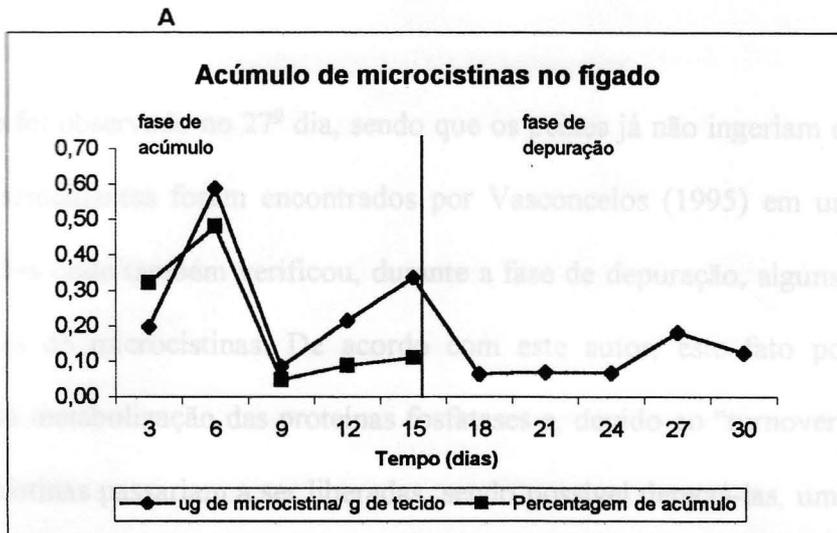


Figura 1. Concentrações de microcistinas e seu percentual de acúmulo no fígado(A) e no músculo(B), em relação à dose ingerida por *Tilapia rendalli* no primeiro experimento.

um aumento foi observado no 27^o dia, sendo que os peixes já não ingeriam células tóxicas. Resultados semelhantes foram encontrados por Vasconcelos (1995) em um estudo feito com mexilhões onde também verificou, durante a fase de depuração, alguns aumentos nas concentrações de microcistinas. De acordo com este autor, este fato possivelmente é decorrente da metabolização das proteínas fosfatases e, devido ao “turnover” das mesmas, essas microcistinas passariam a ser liberadas, sendo possível detectá-las, uma vez que só é possível extrair e detectar microcistinas livres.

No músculo, observou-se que a presença de microcistinas ocorre em concentrações bem mais baixas que no fígado, obviamente pelo fato deste último ser o órgão-alvo destas toxinas. Nos seis primeiros dias, o valor de microcistinas no músculo foi de $0,002\mu\text{g.g}^{-1}$. Um aumento ocorreu no 9^o dia, onde foi encontrada uma concentração de $0,025\mu\text{g.g}^{-1}$, a maior durante a fase de acúmulo. Este valor representou 0,01% do total de microcistinas contidas nas células tóxicas ingeridas durante os nove dias. Durante a fase de depuração, as concentrações de microcistinas permaneceram baixas como foram a partir do 9^o dia, mas no 24^o dia encontrou-se $0,045\mu\text{g.g}^{-1}$, o valor mais alto desta toxina no músculo durante este experimento (Fig. 1B).

Neste experimento, a cinética das concentrações de microcistinas no fígado e no músculo mostrou que os dois maiores valores de concentração no músculo foram equivalentes aos valores mais baixos no fígado, indicando uma possível transferência destas toxinas do fígado para o músculo. Vale ressaltar que a maior concentração de microcistinas encontrada no músculo ocorreu na fase de depuração, nove dias após ser interrompida a ingestão de células tóxicas. Além da hipótese da transferência, este aumento também pode ser o resultado da liberação de microcistinas antes ligadas às proteínas fosfatases, como foi

sugerido acima para o fígado. Isto indica que, em uma situação de “bloom”, mesmo após o desaparecimento das células na água, o músculo de peixes ainda pode estar contaminado por vários dias.

No final da fase de acúmulo, havia $0,34\mu\text{g.g}^{-1}$ de microcistinas no fígado e $0,003\mu\text{g.g}^{-1}$ no músculo. A soma destes totais correspondeu 0,1% do total microcistinas ingeridas no período de 15 dias. Já no final da fase de depuração o fígado apresentou $0,12\mu\text{g MCIST.g}^{-1}$ e o músculo $0,001\mu\text{g MCIST.g}^{-1}$, sendo que ambos os valores correspondem à um decréscimo de 63% em relação às concentrações encontradas no final da fase de acúmulo.

Durante a fase de depuração, foram analisadas as fezes dos peixes alimentados com a cepa tóxica NPLJ-4. Optou-se por não analisar as fezes da fase de acúmulo, devido a impossibilidade de se separar a mesma dos restos do alimento tóxico oferecido aos peixes, que esporadicamente se depositavam no fundo do aquário onde as fezes posteriormente também se acumulavam.

A concentração de microcistinas encontrada nas fezes foi crescente durante a fase de depuração, sendo o maior valor encontrado no último dia, $0,068\mu\text{g.g}^{-1}$ de fezes/ peixe (Fig. 2). A soma das concentrações de microcistinas nas fezes ao longo desta fase fornece um valor de $0,162\mu\text{g.g}^{-1}$ de fezes/ peixe. Este valor correspondeu a 48% do total de microcistinas acumuladas no fígado e no músculo, ao final da fase de acúmulo. Portanto, quase metade da quantidade de toxinas acumuladas em fígado e músculo destes peixes foram excretadas nas fezes até o final da fase de depuração.

Este aumento crescente de microcistinas nas fezes correspondeu à tendência de diminuição nas concentrações destas toxinas em ambos os tecidos. Sendo assim, ao final da fase de depuração dos 63% de microcistinas que deixaram os tecidos, 48% surgiram nas

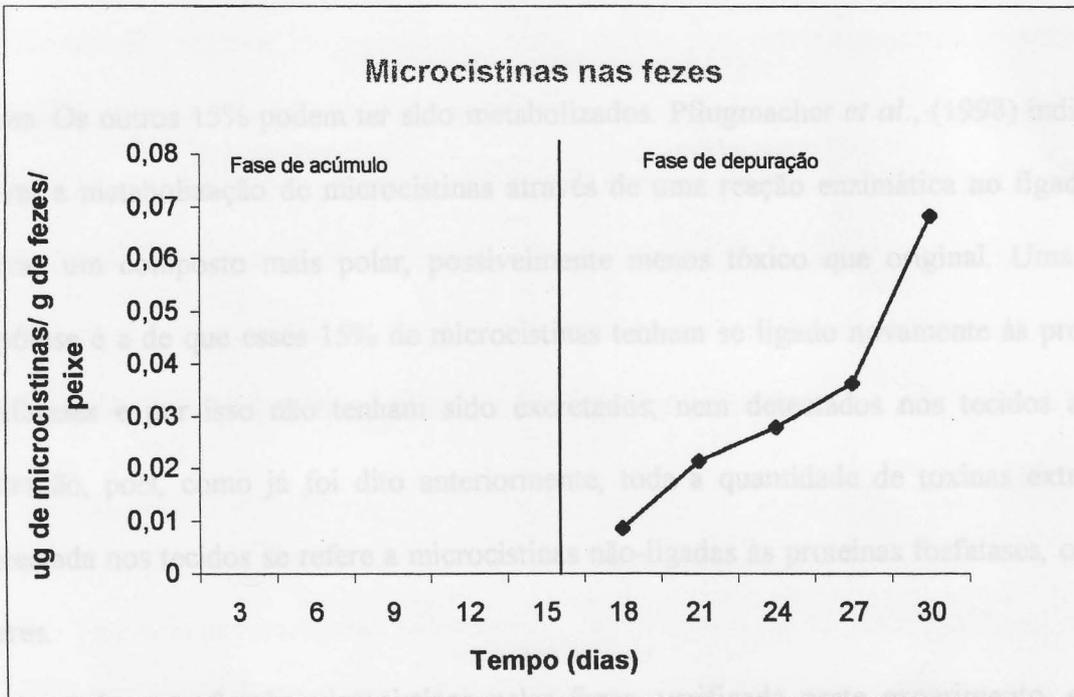


Figura 2. Concentrações de microcistinas nas fezes de *Tilapia rendalli* durante a fase de depuração do primeiro experimento

A água dos aquários não foi trocada em nenhum momento durante o experimento, apenas filtrada. Devido a este fato, concluiu-se que poderia ter havido uma contaminação, mesmo em pequena escala, desta água pelas fezes que se depositavam e continham microcistinas. Portanto, somente para se ter uma idéia da concentração de microcistinas dissolvidas nesta água, que poderia também ser fruto de excreção, a mesma foi analisada no terceiro e no último dia da fase de depuração. No terceiro dia foi encontrada uma concentração de $15,8 \mu\text{g.L}^{-1}$. Este valor correspondeu a aproximadamente 9% do total de microcistinas nas células tóxicas ingeridas aos peixes durante toda a fase de acúmulo. Contudo, não se pode precisar o quanto deste percentual correspondeu a excreção realizada pelos peixes e o quanto correspondeu à contaminação mencionada acima. No último dia desta fase e também do experimento foi encontrado um valor de $4,3 \mu\text{g MCIST.L}^{-1}$. A redução de 73% em 12 dias na concentração de microcistinas dissolvidas na água indica ter

fezes. Os outros 15% podem ter sido metabolizados. Pflugmacher *et al.*, (1998) indicaram haver a metabolização de microcistinas através de uma reação enzimática no fígado que forma um composto mais polar, possivelmente menos tóxico que original. Uma outra hipótese é a de que esses 15% de microcistinas tenham se ligado novamente às proteínas fosfatases e por isso não tenham sido excretados, nem detectados nos tecidos após a extração, pois, como já foi dito anteriormente, toda a quantidade de toxinas extraída e detectada nos tecidos se refere a microcistinas não-ligadas às proteínas fosfatases, ou seja, livres.

A excreção de microcistinas pelas fezes, verificada neste experimento, está de acordo com a literatura que cita a bile como a principal via de excreção destas toxinas (Falconer *et al.*, 1986, citado em Råbergh *et al.*, 1991; Sahin *et al.*, 1996).

A água dos aquários não foi trocada em nenhum momento durante o experimento, apenas filtrada. Devido a este fato, concluiu-se que poderia ter havido uma contaminação, mesmo em pequena escala, desta água pelas fezes que se depositavam e continham microcistinas. Portanto, somente para se ter uma idéia da concentração de microcistinas dissolvidas nesta água, que poderia também ser fruto de excreção, a mesma foi analisada no terceiro e no último dia da fase de depuração. No terceiro dia foi encontrada uma concentração de $15,8 \mu\text{g.L}^{-1}$. Este valor correspondeu a aproximadamente 9% do total de microcistinas nas células tóxicas oferecidas aos peixes durante toda a fase de acúmulo. Contudo, não se pode precisar o quanto deste percentual correspondeu a excreção realizada pelos peixes e o quanto correspondeu à contaminação mencionada acima. No último dia desta fase e também do experimento foi encontrado um valor de $4,3 \mu\text{g MCIST.L}^{-1}$. A redução de 73% em 12 dias na concentração de microcistinas dissolvidas na água indica ter

havido um processo de biodegradação dessas toxinas por microorganismos presentes nos aquários, ao longo da fase de depuração. Este valor é próximo ao encontrado por outros autores. Jones *et al.*(1994), citado em Chorus & Bartram (1999), afirmaram que o processo de biodegradação pode eliminar mais de 90% de microcistinas dissolvidas na água em um período de 2 a 10 dias. No entanto, isto vai depender das condições da água, concentração inicial de toxinas, temperatura e tipo de microorganismos presentes.

4.3) Segundo experimento: Acúmulo de microcistinas em tecidos de *Tilapia rendalli* alimentadas sem ração.

Neste experimento, os peixes foram expostos, durante 28 dias, à três condições alimentares: o controle composto de ração e ágar, o tratamento onde receberam células tóxicas (NPLJ-4) e o tratamento onde receberam células não-tóxicas (NPJT-1), sendo que nos dois últimos, o alimento não continha ração.

O experimento foi planejado para durar 7 semanas, mas um fato não previsto fez com que fosse interrompido no final da quarta semana: os peixes alimentados com a cepa NPJT-1 rejeitaram o alimento logo na primeira semana, passando a ingerir esporadicamente alguns pedaços de alimento, talvez para manterem um mínimo de sobrevivência. Verificou-se, posteriormente, que esta cepa é produtora de geosmina, um metabólito secundário que algumas cianobactérias produzem, sendo este, talvez, o motivo da rejeição dos peixes. Os peixes do aquário que receberam o alimento tóxico, continuaram se alimentando

normalmente e isto possibilitou avaliar o acúmulo de microcistinas nos tecidos em uma condição onde o peixe não recebia ração.

A variação da concentração de microcistinas no fígado e no músculo dos peixes que receberam as células tóxicas pode ser observada na figura 3. Neste experimento os peixes foram analisados a cada sete dias e logo na primeira semana encontrou-se a maior concentração de microcistinas no fígado, $2,8\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Fig. 3A). Este valor corresponde à 2,8% do total ingerido pelos peixes durante os sete primeiros dias. Este percentual é aproximadamente 6 vezes maior que o percentual encontrado no experimento anterior, durante o sexto dia de alimentação com células tóxicas, que foi de 0,48% (Fig 1A.). A partir da primeira semana até o final do experimento, a concentração de microcistinas no fígado decaiu, atingindo um valor final de $0,23\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

A cinética do acúmulo de microcistina no fígado neste experimento é semelhante ao experimento anterior, tendo sua maior concentração na primeira semana, seguida de um decréscimo. No entanto, apesar de neste experimento a dose de toxinas ingeridas diariamente ter sido menor ($14,6\mu\text{g}$), o percentual inicial de acúmulo de 2,8% foi bem maior que o do anterior. A principal diferença entre os dois foi a ausência de ração no alimento tóxico deste experimento e esta pode ter sido causa da diferença nos percentuais entre ambos.

As tilápias são capazes de digerir com eficiência células de cianobactérias, devido ao pH extremamente baixo (aproximadamente 1) e ao longo comprimento do ducto digestivo. No entanto, a absorção de peptídeos pelas células do trato intestinal é baixa (Tencalla *et al.*, 1994). As microcistinas são peptídeos que não são digeridos pelas enzimas da maioria dos animais, portanto, sua absorção no intestino de peixes é conseqüentemente baixa. No primeiro experimento, os nutrientes contidos na ração presente no alimento

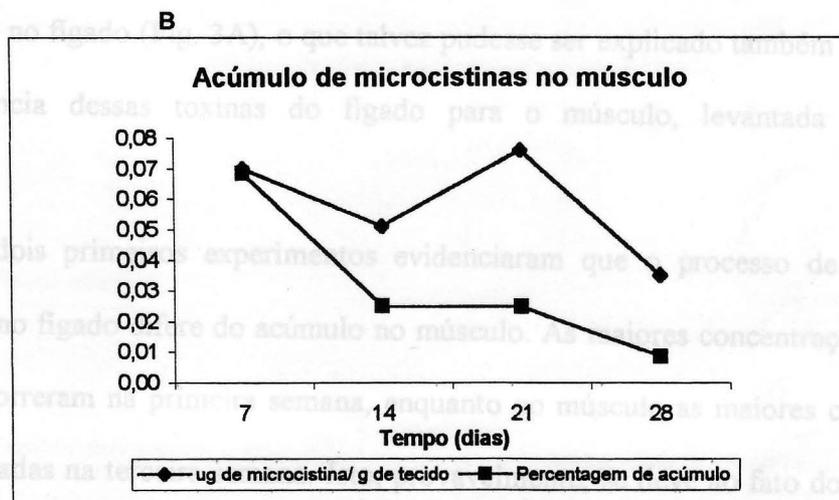
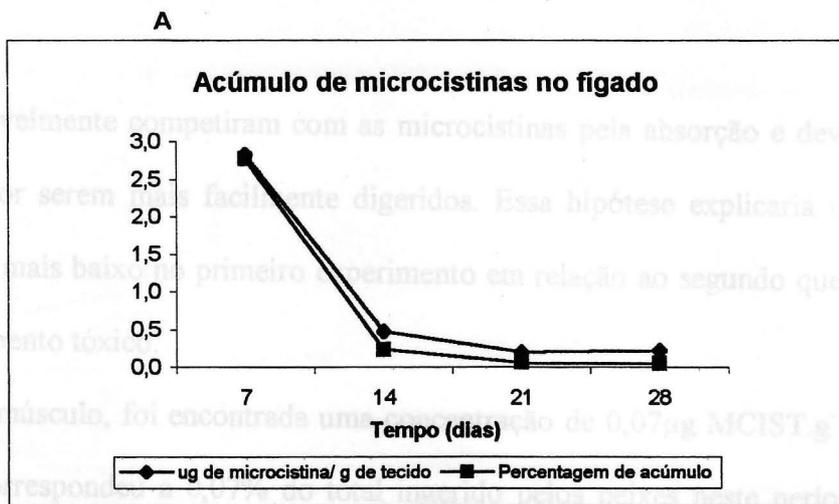


Figura 3. Concentrações de microcistinas e seu percentual de acúmulo no fígado(A) e músculo(B), em relação à dose ingerida por *Tilapia rendalli* durante o segundo experimento.

tóxico provavelmente competiram com as microcistinas pela absorção e devem ter obtido vantagem, por serem mais facilmente digeridos. Essa hipótese explicaria um percentual inicialmente mais baixo no primeiro experimento em relação ao segundo que não continha ração no alimento tóxico.

No músculo, foi encontrada uma concentração de $0,07\mu\text{g MCIST.g}^{-1}$, no 7º dia, e este valor correspondeu a 0,07% do total ingerido pelos peixes neste período (Fig. 3B), sendo o maior percentual de acúmulo no músculo durante este experimento. Mas, a maior concentração de microcistinas encontrada foi de $0,076\mu\text{g.g}^{-1}$ no 21º dia e equivale a menor concentração no fígado (Fig. 3A), o que talvez pudesse ser explicado também pela hipótese de transferência dessas toxinas do fígado para o músculo, levantada no primeiro experimento.

Os dois primeiros experimentos evidenciaram que o processo de acúmulo de microcistina no fígado difere do acúmulo no músculo. As maiores concentrações de toxina no fígado ocorreram na primeira semana, enquanto no músculo as maiores concentrações foram observadas na terceira semana. Isto, provavelmente, se deve ao fato do fígado ser o órgão alvo das microcistinas (Falconer, 1999) recebendo inicialmente as maiores doses de toxinas e, possivelmente transferindo-as para o músculo ao longo do tempo.

O crescimento de *Tilapia rendalli*, exposta aos três tratamentos, foi avaliado através dos dados de peso e comprimento, obtidos durante este experimento. O tratamento em que os peixes receberam a cepa não-tóxica NPJT-1 funcionou basicamente como um controle sem alimento, pois os peixes rejeitaram esta cepa, ingerindo quantidades mínimas do alimento esporadicamente. A figura 4 mostra os gráficos de crescimento de *Tilapia rendalli*, neste experimento.

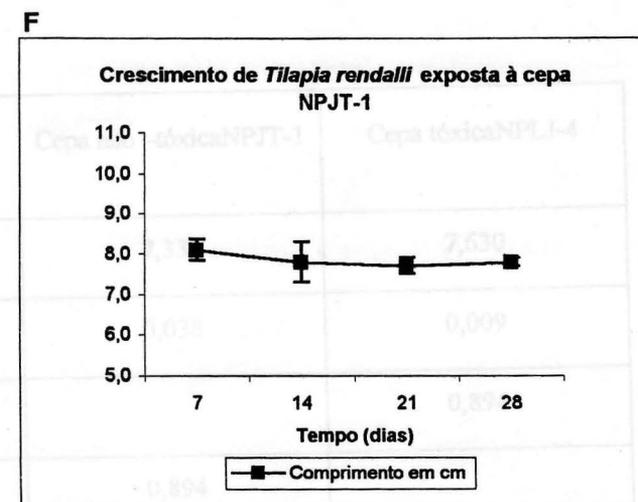
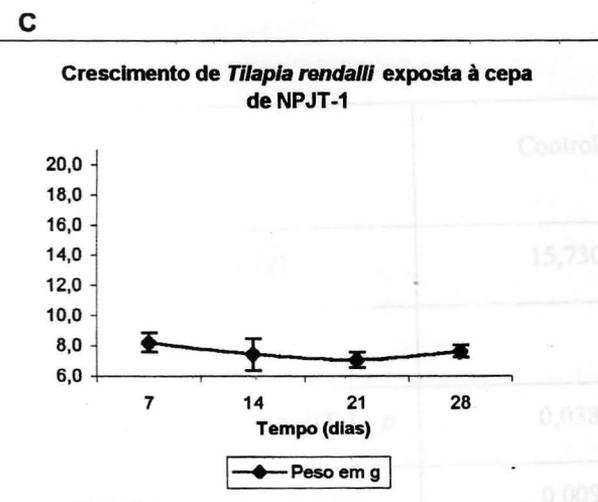
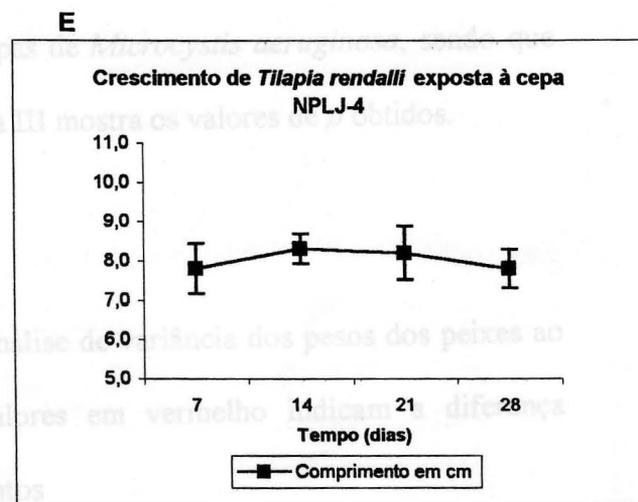
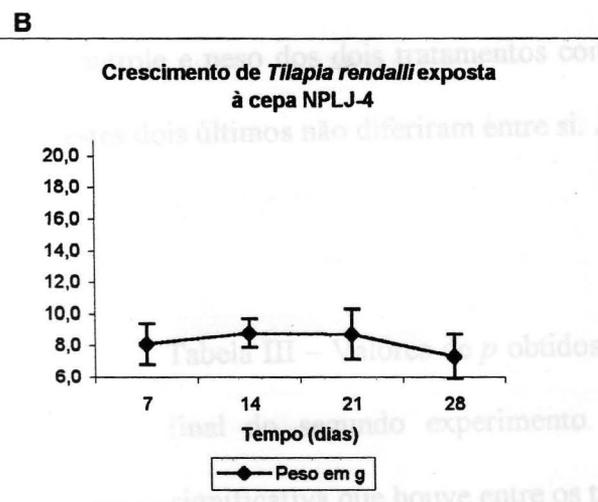
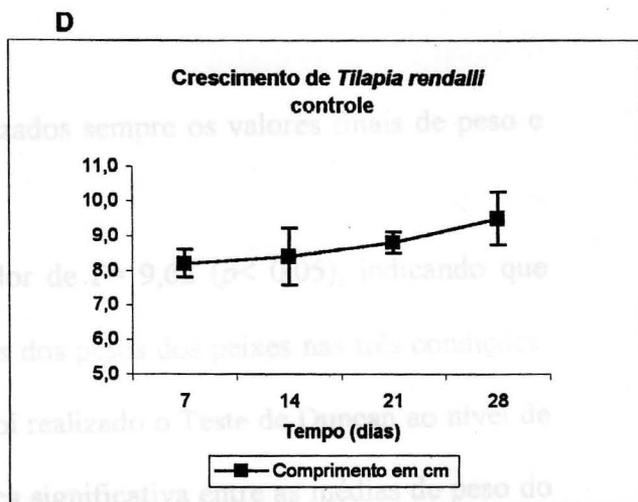
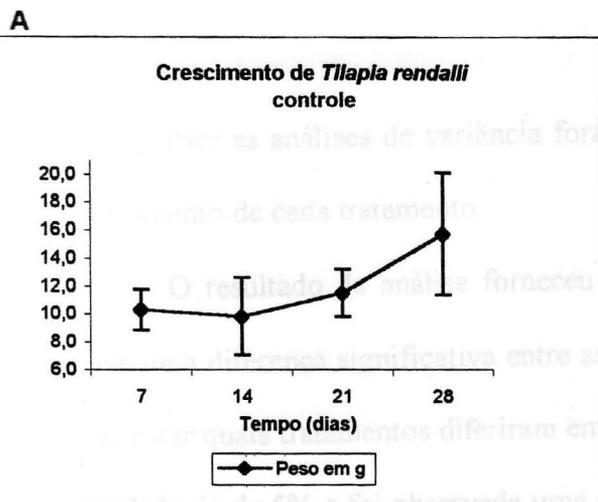


Figura 4. Crescimento de *Tilapia rendalli* no segundo experimento. Gráficos A, B e C representam as médias dos pesos dos organismos no controle, no tratamento com a cepa tóxica NPLJ-4 e no tratamento com a cepa não-tóxica NPJT-1. Os gráficos D, E e F são as médias dos comprimentos nos mesmos tratamentos. As barras em cada ponto indicam o desvio padrão de cada valor médio.

Para as análises de variância foram utilizados sempre os valores finais de peso e comprimento de cada tratamento.

O resultado da análise forneceu um valor de $F= 9,62$ ($p < 0,05$), indicando que houve uma diferença significativa entre as médias dos pesos dos peixes nas três condições. Para testar quais tratamentos diferiram entre si, foi realizado o Teste de Duncan ao nível de significância de 5% e foi observada uma diferença significativa entre as médias de peso do controle e peso dos dois tratamentos com as cepas de *Microcystis aeruginosa*, sendo que estes dois últimos não diferiram entre si. A tabela III mostra os valores de p obtidos.

Tabela III – Valores de p obtidos pela análise de variância dos pesos dos peixes ao final do segundo experimento. Os valores em vermelho indicam a diferença significativa que houve entre os tratamentos

	Controle	Cepa não -tóxica NPJT-1	Cepa tóxica NPLJ-4
Médias de peso (g)	15,730	7,330	7,630
Controle - p		0,038	0,009
Cepa não -tóxica NPJT-1 - p	0,038		0,894
Cepa tóxica NPLJ-4 - p	0,009	0,894	

As médias do comprimento também foram testadas e o resultado da análise de variância forneceu um valor de $F= 10,16$ ($p < 0,05$), indicando que houve uma diferença significativa entre as médias dos peixes nos três tratamentos. Para testar quais tratamentos diferiram entre si, o Teste de Duncan foi aplicado ao nível de significância de 5% e uma diferença significativa foi observada entre as médias de comprimento do controle e dos dois outros tratamentos sendo que estes dois últimos não diferiram entre si, como demonstra a tabela IV.

Tabela IV – Valores de p obtidos pela análise de variância dos comprimentos dos peixes ao final do segundo experimento. Os valores em vermelho indicam a diferença significativa que houve entre os tratamentos.

	Controle	Cepa não-tóxica NPJT-1	Cepa tóxica NPLJ-4
Médias de comprimento (cm)	9,460	7,760	7,800
Controle - p		0,035	0,008
Cepa não -tóxica NPJT-1 - p	0,035		0,941
Cepa tóxica NPLJ-4 - p	0,008	0,941	

Estes resultados indicam que os peixes alimentados com as cepas tóxica e não-tóxica tiveram um crescimento reduzido em relação ao controle. No entanto, no tratamento com a cepa tóxica, não se pode precisar se este efeito foi decorrente da intoxicação com microcistinas e/ou de uma deficiência nutricional, como provavelmente aconteceu com a cepa não-tóxica.

4.4) Terceiro experimento: Acúmulo de microcistinas em tecidos de *Tilapia rendalli* alimentadas com células rompidas e efeitos no crescimento.

Neste experimento, *Tilapia rendalli* foi exposta, durante 28 dias, a três tipos de alimento: controle, alimento contendo células da cepa não-tóxica NPBR-2 e alimento contendo células da cepa tóxica NPLJ-4 previamente lisadas, com uma concentração de microcistinas de $29,2\mu\text{g.g}^{-1}$, portanto, superior aos experimentos anteriores. Em todos os tratamentos os alimentos continham adição de ração.

A cinética de acúmulo de microcistinas nos tecidos foi diferente em relação aos experimentos anteriores. Na figura 5A pode-se observar que, neste experimento, a maior concentração de microcistinas encontrada no fígado, ($1,7\mu\text{g.g}^{-1}$) ocorreu no 42º dia, ou seja, última semana do experimento. Ao contrário dos dois experimentos anteriores onde a maior concentração no fígado ocorreu na primeira semana.

No músculo, o maior valor de microcistina ($0,096\mu\text{g.g}^{-1}$) ocorreu no 14º dia, segunda semana (Fig. 5B), o que também difere dos experimentos anteriores que apresentaram as maiores concentrações nas últimas semanas.

A principal diferença entre este experimento e os dois primeiros é o fato das células tóxicas oferecidas aos peixes terem sido rompidas, ou seja as toxinas presentes no alimento estavam mais disponíveis.

A maior disponibilidade das microcistinas pode ter facilitado a absorção, o que levou à um aumento crescente da concentração destas toxinas no fígado. No entanto este

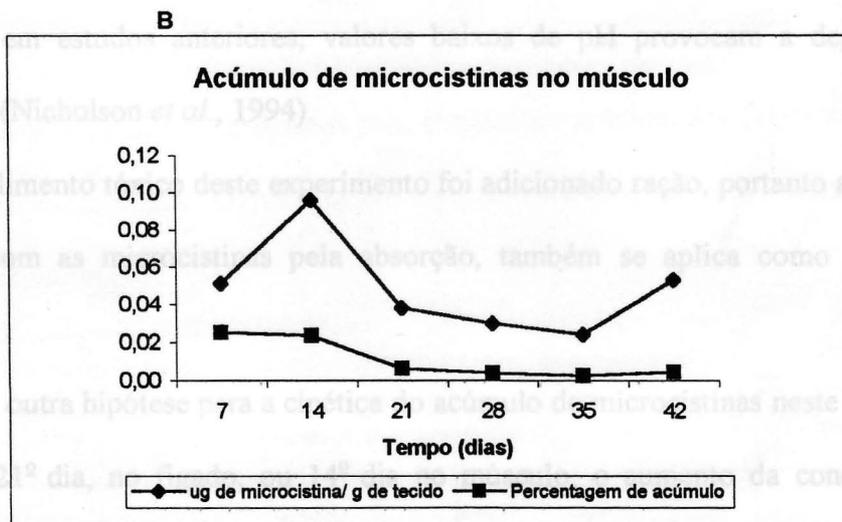
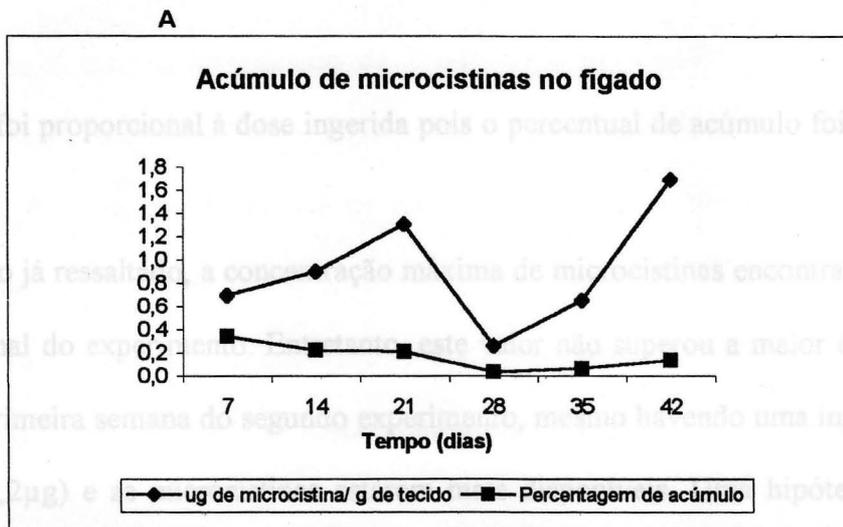


Figura 5. Concentrações de microcistinas e seu percentual de acúmulo no fígado(A) e músculo(B), em relação à dose ingerida por *Tilapia rendalli* durante o terceiro experimento.

A figura 6 mostra os gráficos de crescimento de *Tilapia rendalli*, nos três aumentos não foi proporcional à dose ingerida pois o percentual de acúmulo foi decrescente (Fig. 5A).

Como já ressaltado, a concentração máxima de microcistinas encontrada no fígado ocorreu no final do experimento. Entretanto, este valor não superou a maior concentração ocorrida na primeira semana do segundo experimento, mesmo havendo uma ingestão diária mais alta (29,2µg) e as microcistinas estarem mais disponíveis. Uma hipótese para esta observação é fato de que microcistinas livres podem estar expostas aos ácidos do sistema digestivo das tilápias e conseqüentemente mais expostas a degradação, pois como já demonstrado em estudos anteriores, valores baixos de pH provocam a degradação de microcistinas (Nicholson *et al.*, 1994).

No alimento tóxico deste experimento foi adicionado ração, portanto a hipótese de competição com as microcistinas pela absorção, também se aplica como no primeiro experimento.

Uma outra hipótese para a cinética do acúmulo de microcistinas neste experimento é que até o 21º dia, no fígado, ou 14º dia no músculo, o aumento da concentração de microcistinas livres poderia ter ocorrido devido a maior facilidade de absorção das toxinas que estavam livres. A partir de então, houve um decréscimo ocasionado provavelmente pela ligação da maior parte das microcistinas às proteínas fosfatases. Na fase final do experimento, o aumento ocorrido possivelmente pode ser explicado pela liberação destas toxinas devido à metabolização destas proteínas fosfatases, uma vez que este aumento não correspondeu ao percentual acumulado, em relação à dose ingerida. Entretanto, estudos bioquímicos sobre a cinética de absorção desta toxina precisariam ser realizados para a comprovação ou rejeição destas hipóteses aqui levantadas.

A figura 6 mostra os gráficos de crescimento de *Tilapia rendalli*, nos três tratamentos: controle, alimento com a cepa tóxica NPLJ-4 e alimento com a cepa não-tóxica NPBR-2. O resultado da análise de variância dos valores médios finais de peso forneceu um valor de $F= 7,92$ ($p < 0,05$), indicando que houve uma diferença significativa entre os pesos dos peixes nas três condições. Para testar quais tratamentos diferiram entre si, foi realizado o Teste de Duncan ao nível de significância de 5% e observou-se que existe uma diferença significativa entre as médias de peso do tratamento com a cepa tóxica e as médias do peso dos dois outros tratamentos: controle e tratamento com a cepa não-tóxica, sendo que estes dois últimos não diferiram entre si. A tabela V mostra os valores de p obtidos.

Tabela V – Valores de p obtidos pela análise de variância dos pesos dos peixes ao final do terceiro experimento. Os valores em vermelho indicam diferença significativa que houve entre os tratamentos.

	Controle	Cepa não-tóxica NPBR-2	Cepa tóxica NPLJ-4
Médias de peso (g)	8,430	8,060	5,830
Controle - p		0,622	0,048
Cepa tóxica NPLJ-4 - p	0,048	0,019	
Cepa não -tóxica NPBR-2 - p	0,622		0,019

As médias do comprimento também foram testadas e o resultado da análise de variância forneceu um valor de $F= 3,71$ ($p > 0,05$), indicando que não houve uma diferença significativa entre as médias dos peixes nos três tratamentos.

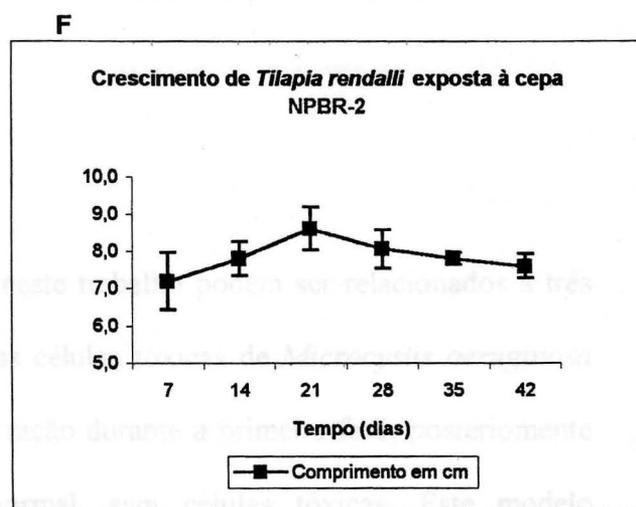
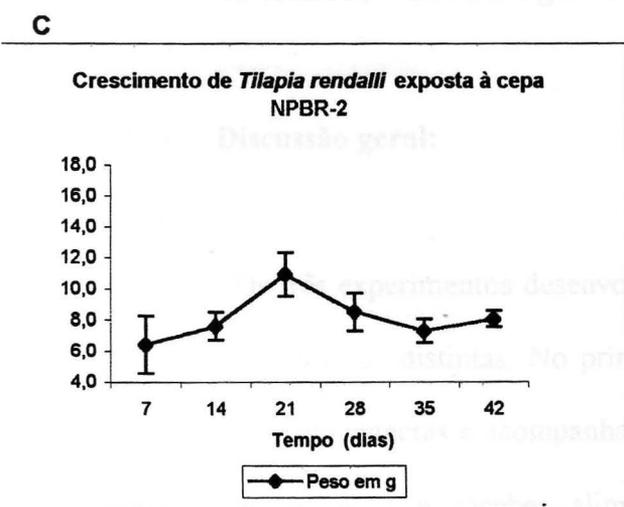
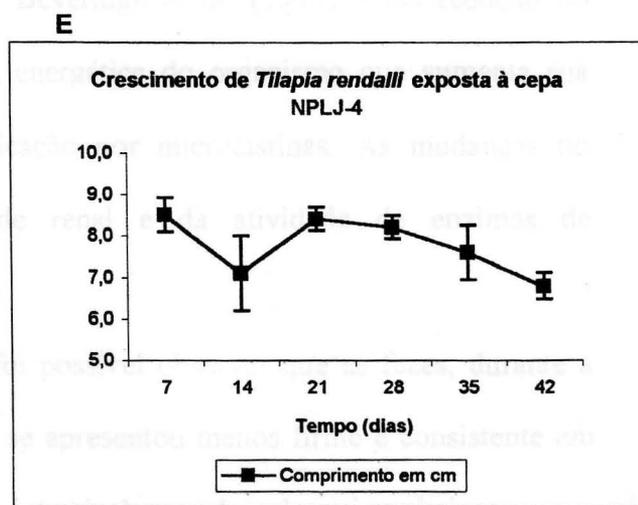
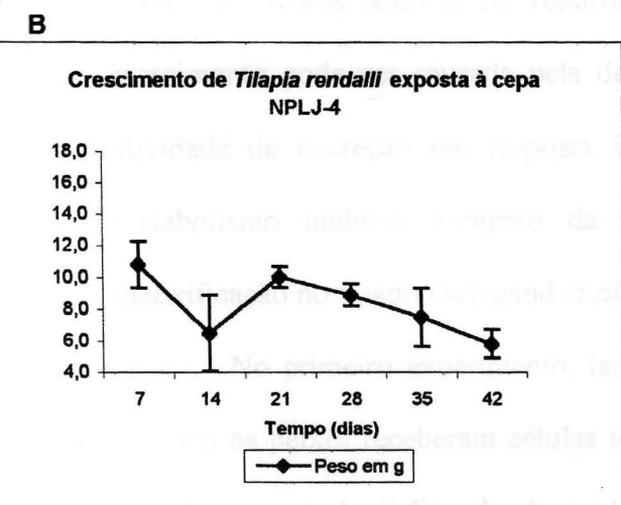
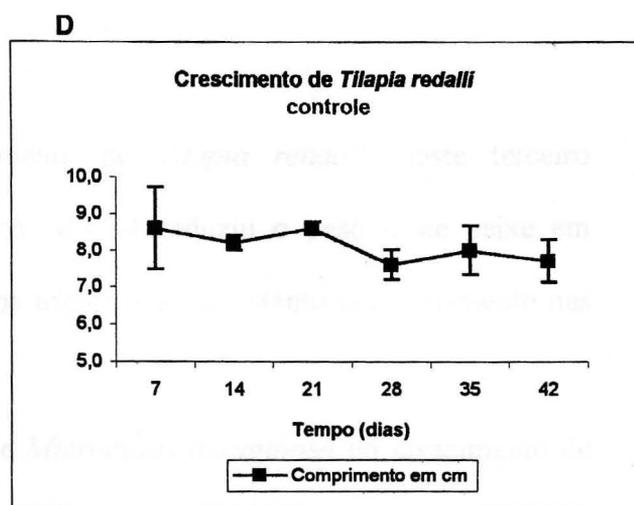
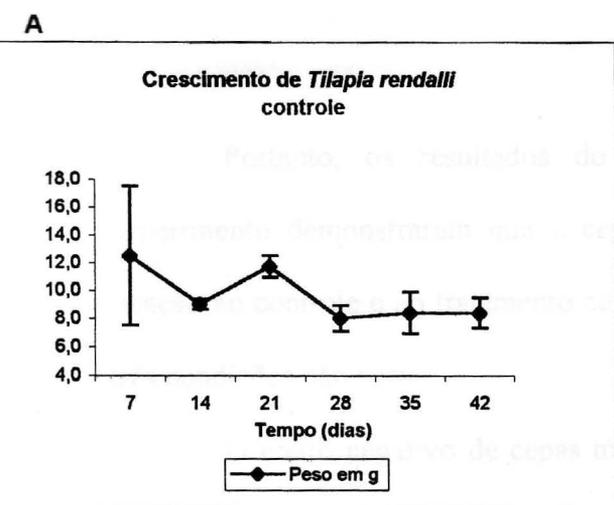


Figura 6. Crescimento de *Tilapia rendalli* no terceiro experimento. Gráficos A, B e C representam as médias dos pesos dos organismos no controle, no tratamento com a cepa tóxica NPLJ-4 e o tratamento com a cepa não-tóxica NPBR-2. Os gráficos D, E e F são as médias dos comprimentos dos organismos nos mesmos tratamentos. As barras em cada ponto indicam desvio padrão de cada valor médio.

Portanto, os resultados do crescimento de *Tilapia rendalli* neste terceiro experimento demonstraram que a cepa tóxica NPLJ-4 reduziu o peso deste peixe em relação ao controle e ao tratamento com a cepa não-tóxica, no entanto o comprimento nas três condições não variou.

O efeito negativo de cepas tóxicas de *Microcystis aeruginosa* no crescimento de peixes herbívoros também foi reportado por Beveridge *et al.* (1993). Uma redução no crescimento pode ser causada pela demanda energética do organismo que aumenta sua atividade de excreção em resposta à intoxicação por microcistinas. As mudanças no metabolismo incluem aumento da atividade renal e da atividade de enzimas de detoxificação no fígado (Wiegand *et al.*, 1999).

No primeiro experimento, também foi possível observar que as fezes, durante a fase em os peixes receberam células tóxicas, se apresentou menos firme e consistente em relação ao controle, indicando algum distúrbio intestinal causado pelas microcistinas.

4.5) Discussão geral:

Os três experimentos desenvolvidos neste trabalho podem ser relacionados à três situações ecológicas distintas. No primeiro, as células tóxicas de *Microcystis aeruginosa* foram oferecidas intactas e acompanhadas de ração durante a primeira fase, posteriormente os peixes passaram a receber alimento normal, sem células tóxicas. Este modelo experimental pode representar uma situação onde os peixes, por um período, se alimentariam de células tóxicas, mas dispõem de outras fontes alimentares. Em um período seguinte as células tóxicas deixariam de ocorrer no ambiente.

O segundo experimento representaria uma situação de dominância ou “bloom” de *M. aeruginosa* tóxica, onde os peixes não teriam outra opção nutricional. E o terceiro experimento seria equivalente a um “bloom” tóxico em fase senescente, cujas células estariam sendo rompidas e ingeridas pelos peixes, havendo no entanto, outras fontes de alimento.

Os resultados obtidos nestes experimentos demonstram processos diferenciados de acúmulo de microcistinas no fígado e músculo de *Tilapia rendalli*. Em termos gerais, pode-se dizer que a situação em que o peixe só disponha de células tóxicas de *M. aeruginosa* como fonte alimentar, representada pelo segundo experimento, foi a situação onde ocorreu inicialmente o maior acúmulo de microcistinas livres nos tecidos.

Um acúmulo com concentrações iniciais menores que as da situação anterior, porém mais duradouro ao longo do tempo, foi verificado no terceiro experimento, que representaria uma situação de um “bloom” senescente.

O primeiro experimento, indica que peixes ingerindo células intactas junto com outras fontes alimentares, acumula menos microcistinas em seus tecidos que nas duas situações anteriores. Além disso, uma vez interrompida a ingestão de células tóxicas, estes peixes são capazes de excretar essas toxinas em suas fezes. No entanto aumentos expressivos nas concentrações de microcistinas no músculo ainda podem ser detectados vários dias após a interrupção da ingestão de células tóxicas.

Nos três experimentos, os aumentos das concentrações de microcistinas seguidos de decréscimo, podem estar associados a outros fatores, além daqueles discutidos especificamente em cada experimento.

Primeiramente, a excreção de microcistinas, que foi comprovada na fase de depuração do primeiro experimento, pode ter ocorrido também na fase de acúmulo e em

todo o tempo de duração dos dois outros experimentos. Isto pode ser um dos fatores responsáveis pelos decréscimos nas concentrações de microcistinas nos tecidos.

Além da excreção, os altos e baixos valores de microcistinas detectadas nos tecidos podem ser o resultado da metabolização (“turnover”) de proteínas fosfatases ligadas covalentemente às microcistinas, que no momento de sua degradação liberariam estas toxinas no tecido, podendo estas, então, serem extraídas e detectadas (Sahin *et al.*, 1996). O processo inverso também pode ocorrer, ou seja, microcistinas que antes estavam livres no tecido, se ligariam covalentemente às proteínas fosfatases, não podendo mais serem detectadas. Este fenômeno de desligamento destas proteínas é a hipótese que melhor explicaria o aumento na concentração de microcistinas no fígado na fase de depuração do primeiro experimento, onde já não havia mais a ingestão de células tóxicas (Fig. 1A).

Vasconcelos (1995), em experimentos de acúmulo de microcistinas em mexilhões, observou estes mesmo padrão de aumentos na concentração de microcistinas nos tecidos destes organismos quando estes já não se alimentavam mais de cianobactérias tóxicas. Este autor também levantou a hipótese de metabolização de proteínas fosfatases e liberação de microcistinas nos tecidos como uma explicação para esta observação.

Carmichael (comunicação pessoal) relatou também ter observado este mesmo padrão de aumento na concentração de microcistinas nos fígados de pacientes intoxicados em sessões de hemodiálise em Caruaru.

Williams *et al.* (1997b), em experimentos com microcistinas marcadas radioativamente, verificaram que 5 horas após a injeção intraperitoneal, aproximadamente 60% destas toxinas estavam ligadas covalentemente a proteínas fosfatases e consequentemente, não detectáveis pela extração com metanol. Um resultado semelhante foi obtido por Tencalla & Dietrich (1997), 3 horas após um ingestão forçada de células

tóxicas liofilizadas, cerca de 63% de microcistinas estavam ligadas covalentemente a proteínas fosfatases. Baseando-se nestes dados da literatura pode-se concluir que os valores de microcistinas detectados nos tecidos de *Tilapia rendalli* em todos os experimentos representou uma parte da concentração real presente, que certamente foi maior.

Em todos os experimentos não houve mortalidade de peixes e nenhum organismo apresentou sintomas macroscópicos da intoxicação por microcistinas. Estas toxinas, em doses únicas e mais elevadas, quando injetadas intraperitonealmente ($550\mu\text{g.kg}^{-1}$, Råbergh *et al.*, 1991) ou mesmo oferecidas oralmente, através de ingestão forçada ($6600\mu\text{g.kg}^{-1}$, Tencalla *et al.*, 1994) causam a morte de peixes em um período de horas.

Nos experimentos deste trabalho, as doses diárias oferecidas foram bem menores que as citadas na literatura, no entanto, os peixes ingeriram células tóxicas por um período que variou de 15 dias à seis semanas, ou seja, um período de exposição crônica não encontrado em trabalhos da literatura. Estas doses diárias de microcistinas foram equivalentes ao que se pode encontrar em “blooms” de *Microcystis aeruginosa* e ao que tem sido encontrado no ducto digestivo de tilápias coletadas na Lagoa de Jacarepaguá-RJ (Magalhães & Azevedo, 1997), significando que estas são doses que um peixe possivelmente ingere em uma lagoa afetada por um “bloom”. A não mortalidade dos peixes nos experimentos também está de acordo com que se observa nesta lagoa, ou seja, com concentrações equivalentes no fígado às encontradas nos experimentos, os peixes da Lagoa de Jacarepaguá são coletados com aparência “saudável”, sem nenhum sintoma macroscópico de intoxicação. Peixes hemorrágicos também já foram coletados, no entanto as concentrações de microcistinas encontradas no fígado foram bastante superiores (Magalhães & Azevedo, 1997).

Tilapia rendalli ingere ativamente colônias *Microcystis aeruginosa* tóxica em florações como foi visto nos trabalhos citados acima e nestes experimentos, onde estes peixes não evitaram o alimento tóxico, ao contrário do que foi observado na literatura para outras espécies de tilápia (Keshavanath *et al.*, 1994). Portanto, devem existir mecanismos que permitam à estas tilápias sobreviver por longos períodos de exposição às células tóxicas. Um deles pode ser a excreção, que impede que o acúmulo de microcistinas seja bem maior. Pode haver também uma resistência à concentrações altas destas toxinas no fígado e/ou detoxificação das mesmas por enzimas presentes neste órgão. Além disso, um fator importante seria o baixo pH do ducto digestivo de tilápias, em torno de 1, que poderia promover uma degradação de toxinas durante o processo digestivo. Portanto, estes mecanismos possivelmente estiveram envolvidos na sobrevivência das tilápias durante os experimentos.

4.6) Avaliação do potencial de risco do acúmulo de microcistinas em músculo de *Tilapia rendalli* para a população humana.

A ingestão prolongada de microcistinas é um risco para a saúde humana, uma vez que estas toxinas são potentes promotores de tumores hepáticos (Falconer & Humpage, 1996).

Os resultados dos três experimentos descritos anteriormente demonstram um acúmulo de microcistinas no músculo de *Tilapia rendalli*. Esta espécie de peixe é consumida comercialmente e o acúmulo de microcistinas em seu tecido muscular não está restrito a experimentos laboratoriais, pois tem sido observado com frequência em peixes

coletados na Lagoa de Jacarepaguá – RJ devido a “blooms” de cianobactérias, como foi descrito na seção 1.2 (Magalhães *et al.*, 1999).

Os resultados de acúmulo destas toxinas no músculo podem ser compatíveis com o que poderia ser encontrado na natureza, pois a concentração oferecida foi equivalente ao que o peixe costuma ingerir no ambiente natural, como foi discutido anteriormente.

A Organização Mundial de Saúde em seu livro intitulado “Toxic Cyanobacteria in Water – a guide to their public health consequences, monitoring and management” (Chorus & Bartram, 1999), estabelece que a ingestão máxima aceitável de microcistina-LR é $0,04\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo/dia.

A figura 7 mostra as concentrações de microcistinas acumuladas nos músculos de *Tilapia rendalli* nos três experimentos realizados.

Baseando-se nestes valores, a figura 8 mostra a ingestão diária de microcistinas por uma pessoa de 60Kg que consumisse 300g de destes músculos, que foi o peso médio do músculo das tilápias coletadas na Lagoa de Jacarepaguá (Magalhães, comunicação pessoal).

No primeiro experimento, observa-se que uma pessoa, nas condições citadas anteriormente, que consuma tilápias que tenham ingerido diariamente por nove dias $20,4\mu\text{g}$ de microcistinas, teria uma ingestão de $0,13\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo/dia ou seja aproximadamente 3 vezes acima do limite aceitável para o consumo diário. Observa-se também que nove dias após se interromper o oferecimento de alimento tóxico aos peixes, esta ingestão seria de $0,23\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo/dia. Portanto, pode-se afirmar que alguns dias após o término de um “bloom” ou onde os peixes já tenham interrompido a ingestão de células tóxicas, o músculo ainda pode apresentar concentrações de microcistinas acima do limite aceitável para ingestão diária desta toxina por uma pessoa adulta.

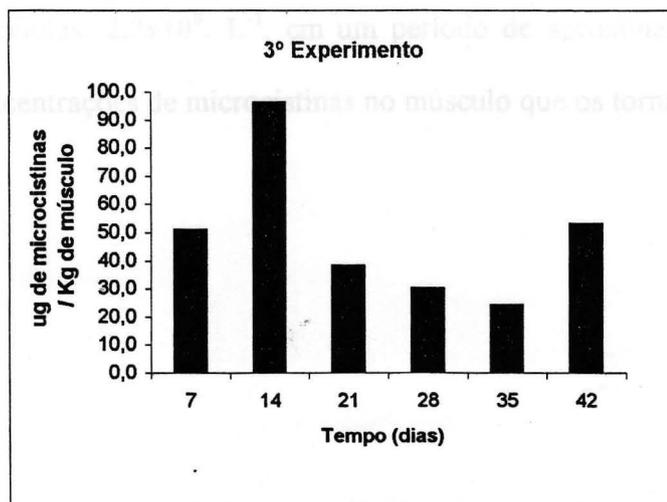
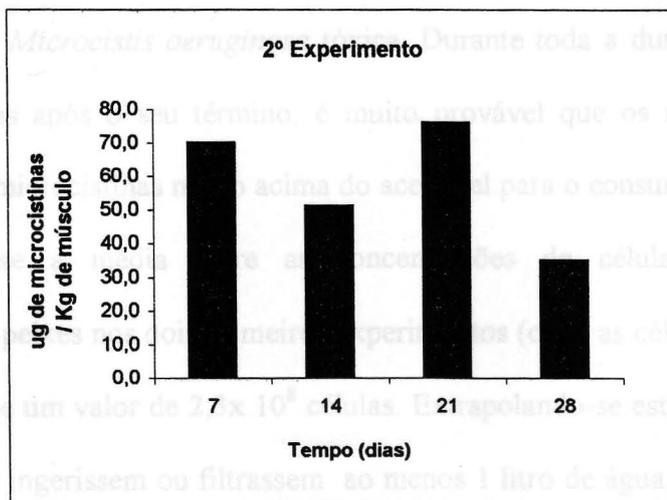
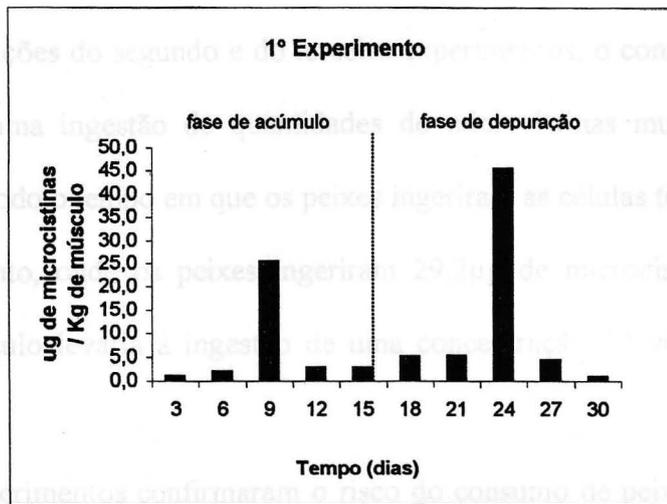


Figura 7. Concentrações de microcistinas por Kg de músculo de *Tilapia rendalli* durante o primeiro, segundo e terceiro experimentos.

Nas condições do segundo e do terceiro experimentos, o consumo de 300g destes peixes levaria a uma ingestão de quantidades de microcistinas muito acima do limite aceitável durante todo o tempo em que os peixes ingeriram as células tóxicas. No 14º dia do terceiro experimento, onde os peixes ingeriram 29,2µg de microcistinas diariamente, o consumo do músculo levaria à ingestão de uma concentração 12 vezes acima do limite aceitável (Fig. 8).

Estes experimentos confirmaram o risco do consumo de peixes durante “blooms” ou dominância de *Microcystis aeruginosa* tóxica. Durante toda a duração deste evento, e mesmo alguns dias após o seu término, é muito provável que os músculos apresentem concentrações de microcistinas muito acima do aceitável para o consumo humano.

Fazendo-se a média entre as concentrações de células tóxicas ingeridas diariamente pelos peixes nos dois primeiros experimentos (onde as células foram oferecidas intactas), obteve-se um valor de $2,3 \times 10^8$ células. Extrapolando-se esta concentração para a água, se os peixes ingerissem ou filtrassem ao menos 1 litro de água diariamente com esta concentração de células, $2,3 \times 10^8 \cdot L^{-1}$, em um período de aproximadamente sete dias, já apresentariam concentrações de microcistinas no músculo que os tornaria impróprios para o consumo humano.

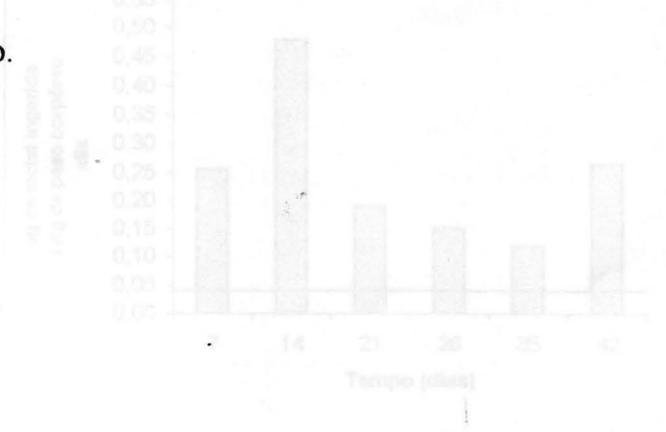


Fig. 8. Ingestão diária de microcistinas por uma pessoa de 60kg que consuma 300g de músculo de Tilapia durante as concentrações equivalentes aos 3 experimentos. A linha horizontal indica a dose de ingestão diária tolerada por 1kg de peso corpóreo - 0,04µg

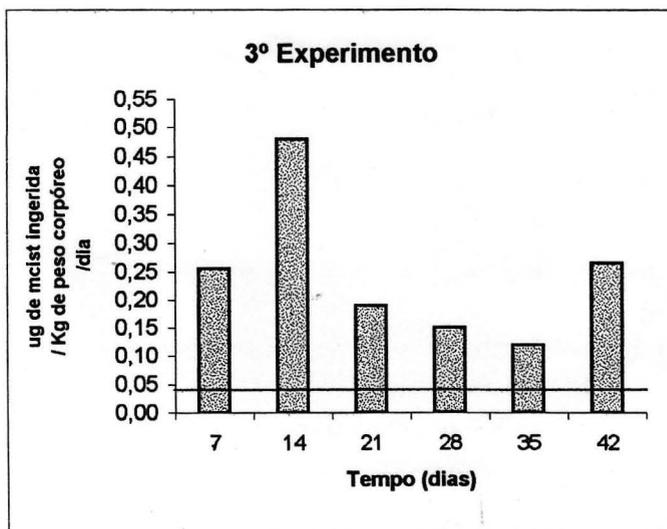
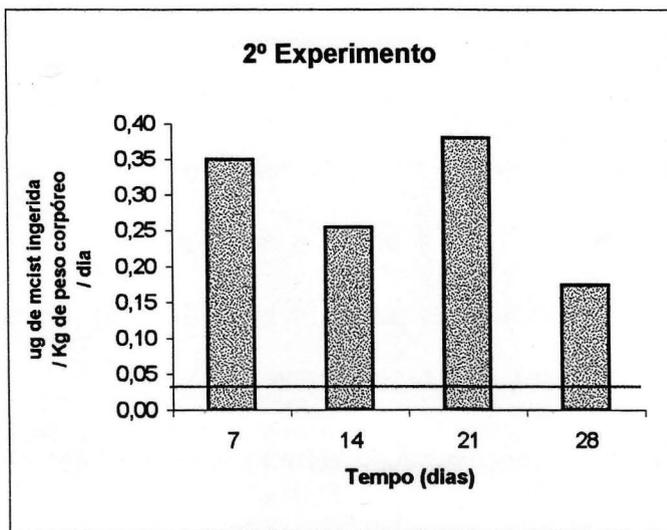
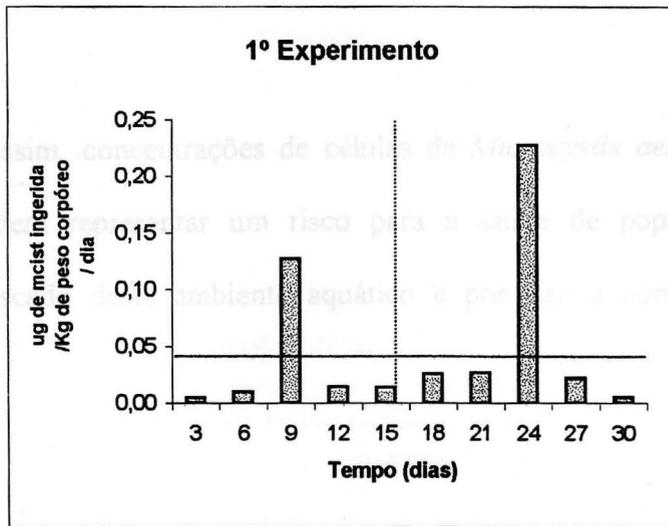


Figura 8. Ingestão diária de microcistinas por uma pessoa de 60Kg que consuma 300g de músculo de *Tilapia rendalli* nas condições equivalentes aos 3 experimentos. A linha azul delimita a dose de ingestão diária tolerada por Kg de peso corpóreo - 0,04ug

5- CONCLUSÕES:

Sendo assim, concentrações de células de *Microcystis aeruginosa* próximas de $2,3 \times 10^8 \cdot L^{-1}$ podem representar um risco para a saúde de populações humanas que consomem o pescado deste ambiente aquático e por isso a comercialização deve ser interrompida.

- 1- *Tilapia rendalli*, ao ingerir células intactas de *Microcystis aeruginosa* tóxica, acumula microcistinas no fígado e no músculo, sendo estas toxinas detectáveis nestes tecidos no terceiro dia de ingestão.
- 2- Nos dois primeiros experimentos, em que *Tilapia rendalli* ingeriu células intactas de *Microcystis aeruginosa*, o maior acúmulo de microcistinas no fígado ocorreu na primeira semana, enquanto que o maior acúmulo no músculo ocorreu na terceira semana, sugerindo uma diferença no processos de acúmulo em cada tecido.
- 3- A ingestão de células tóxicas intactas de *Microcystis aeruginosa* por *Tilapia rendalli*, sem a presença de ração permitem, inicialmente, o acúmulo de concentrações maiores de microcistinas no fígado e no músculo, quando comparadas às células oferecidas com ração.
- 4- A ingestão por *Tilapia rendalli* de células tóxicas rompidas de *Microcystis aeruginosa*, juntamente com ração, permite o acúmulo de concentrações maiores de microcistinas no fígado e no músculo, quando comparadas às células oferecidas intactas e com ração.

5- CONCLUSÕES:

- 1- *Tilapia rendalli*, ao ingerir células intactas de *Microcystis aeruginosa* tóxica, acumula microcistinas no fígado e no músculo, sendo estas toxinas detectáveis nestes tecidos ao terceiro dia de ingestão.
- 2- Nos dois primeiros experimentos, em que *Tilapia rendalli* ingeriu células intactas de *Microcystis aeruginosa*, o maior acúmulo de microcistinas no fígado ocorreu na primeira semana, enquanto que o maior acúmulo no músculo ocorreu na terceira semana, sugerindo uma diferença no processos de acúmulo em cada tecido.
- 3- A ingestão de células tóxicas intactas de *Microcystis aeruginosa* por *Tilapia rendalli*, sem a presença de ração permitem, inicialmente, o acúmulo de concentrações maiores de microcistinas no fígado e no músculo, quando comparadas às células oferecidas com ração.
- 4- A ingestão por *Tilapia rendalli* de células tóxicas rompidas de *Microcystis aeruginosa*, juntamente com ração, permite o acúmulo de concentrações maiores de microcistinas no fígado e no músculo, quando comparadas às células oferecidas intactas e com ração.

- 5- *Tilapia rendalli* se mostrou capaz de excretar, através das fezes, aproximadamente 50% de microcistinas acumuladas em seus tecidos, em um período de 15 dias após ser interrompida a ingestão de células tóxicas.
- 6- Nove dias após ser interrompida a ingestão de células tóxicas, o músculo de *Tilapia rendalli* apresentou a maior concentração de microcistinas durante o experimento, indicando uma possível transferência destas toxinas do fígado para o músculo, ou uma liberação destas toxinas.
- 7- Doze dias após ser interrompida a ingestão de células tóxicas, o fígado de *Tilapia rendalli*, apresentou um aumento na concentração de microcistinas, indicando haver uma possível liberação de toxinas neste tecido.
- 8- A alimentação de *Tilapia rendalli* com células tóxicas de *Microcystis aeruginosa*, em concentrações de microcistinas compatíveis com o encontrado no ambiente, não causou mortalidade no período de até seis semanas. No entanto, causou redução no ganho de peso.
- 9- Os três experimentos permitiram verificar que *Tilapia rendalli*, ao ingerir concentrações de microcistinas normalmente encontradas em florações tóxicas de *Microcystis aeruginosa*, acumulou microcistinas no músculo em concentrações acima do limite aceitável para o consumo diário por uma pessoa adulta. Estas concentrações permaneceram acima deste limite mesmo após vários dias depois da interrupção da ingestão de células tóxicas, por estes peixes.

6 - BIBLIOGRAFIA:

- 10- Os dados obtidos permitiram verificar que o consumo de *Tilapia rendalli* proveniente de ambientes aquáticos que apresentam florações com um número de células tóxicas *Microcystis aeruginosa* em torno de $2,3 \times 10^8 \text{cels.L}^{-1}$ pode constituir um sério risco à saúde pública.

ANDERSEN, R.J.; LUU, H.A.; CHEN, D.Z.X.; HOLMES, C.F.B.; KENT, M.L.; LE BLANC, M.; TAYLOR, P.J.R.M & WILLIAMS, D.E. (1993). Chemical and biological evidence links microcystins to salmon 'neopen liver disease'. *Toxicol.* 31(10): 1315-1323.

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

BAGANZ, D.; STAAKS, G. & STEINBERG, C. (1998). Impact of the cyanobacterium toxin, microcystin-LR on behaviour of zebrafish, *Danio rerio*. *Water Research*, 3: 948-952.

BEVERIDGE, M.C.M.; BAIRD, D.J.; RAHMATULLAH, S.M.; LAWTON, L.A.; BEATTIE, K. & CODD, G.A. (1993). Grazing rates on toxic and non-toxic strains of cyanobacteria by *Hypophthalmichthys molitrix* and *Greochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology*, 43: 901-907.

BURY, N.R.; FLIK, G.; EDDY, F.B. & CODD, G. A. (1996). The effects of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca^{2+} transport and Na^+/K^+ -ATPase in tilapia gills. *The Journal of Experimental Biology*, 199: 1319-1326.

BURY, N.R.; CODD, G. A; BONGA, S.E.W. & FLIK, G. (1998). Fatty acids from cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with potent inhibitory effects on gill Na^+/K^+ -ATPase activity. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 81-89.

6 - BIBLIOGRAFIA:

- ANDERSEN, R.J.; LUU, H.A.; CHEN, D.Z.X.; HOLMES, C.F.B.; KENT, M.L.; LE BLANC, M.; TAYLOR, F.J.R.M & WILLIAMS, D.E. (1993). Chemical and biological evidence links microcystins to salmon 'netpen liver disease'. Toxicol. 31(10): 1315-1323.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. & NAMIKOSHI, M. (1994). First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Journal of Applied Phycology, 6: 261-265.
- BAGANZ, D.; STAAKS, G. & STEINBERG, C. (1998). Impact of the cyanobacteria toxin, microcystin-LR on behaviour of zebrafish, *Danio rerio*. Water Research, 3: 948-952.
- BEVERIDGE, M.C.M.; BAIRD, D.J.; RAHMATULLAH, S.M.; LAWTON, L.A.; BEATTIE, K.^a & CODD, G.A. (1993). Grazing rates on toxic and non-toxic strains of cyanobacteria by *Hypophthalmichthys molitrix* and *Oreochromis niloticus*. Journal of Fish Biology, 43: 901-907.
- BURY, N.R.; FLIK, G.; EDDY, F.B. & CODD, G. A. (1996). The effects of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca^{2+} transport and Na^+/K^+ - ATPase in tilapia gills. The Journal of Experimental Biology, 199: 1319-1326.
- BURY, N.R.; CODD, G. A; BONGA, S.E.W. & FLIK, G. (1998). Fatty acids from cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with potent inhibitory effects on gill Na^+/K^+ - ATPase activity. The Journal of Experimental Biology, 201: 81-89.

- CARBIS, C.R; RAWLIN, G.T; GRANT, P; MITCHELL,G.F; ANDERSON, J.W & MCCAULEY, I.(1997).** A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L.,exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. Journal of Fish Diseases, 20: 81-91.
- CARMICHAEL, W.W. (1994).** The toxins of Cyanobacteria. Scientific American, 270 (1): 78-86.
- CHORUS, I. & BARTRAM, J. (1999).** Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon-WHO, London. 416 p.
- COSTA, S.M. & AZEVEDO, S.M.F.O. (1994).** Implantação de um Banco de Culturas de Cianofíceas Tóxicas. Iheringia - Série Botânica, 45: 5º artigo.
- CHU, F. S.; HUANG, X. & WEI, R. D.(1990).** Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algae blooms. J. Assoc. Off. Anal. Chem.,73(3): 451-456.
- DATTA, S. & JANA, B.B. (1998).** Control of bloom in a tropical lake: grazing efficiency of some herbivorous fishes. Journal of Fish Biology, 53: 12-24.
- DEMPSTER, P.; BAIRD, D.J. & BEVERIDGE, M.C.M. (1995).** Can fish survive by filter-feeding on microparticles? Energy balance in tilapia grazing on algal suspensions. Journal of Fish Biology, 47: 7-17.
- FALCONER, I.R. (1999).** An Overview of Problems Caused by Toxic Blue-Green Algae (Cyanobacteria) in Drinking and Recreational Water. Environ. Toxicol., 14: 5-12.
- FALCONER, I.R. & HUMPAGE, A.R. (1996).** Tumor Promotion by Cyanobacterial toxins. Phycologia, 35(6 suppl.): 74-79.

- FERNANDES, H.R.S.M. (1991).** Abordagem Geoquímica no Estudo da Poluição por Metais Pesados nos Sistemas Fluvial e Lagunar da Baixada de Jacarepaguá-RJ. Tese (Mestrado em Geoquímica). Universidade federal Fluminense. 112p.
- FERRÃO-FILHO, A. S. (1998).** Influência das florações de cianobactérias tóxicas na dinâmica de populações zooplanctônicas da Lagoa de Jacarepaguá (RJ): Efeitos tóxicos de *Microcystis aeruginosa* sobre cladóceros. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-UFRJ, Rio de Janeiro. 212 p (Dissertação).
- GAETE, V.; CANELO, E.; LAGOS, N. & ZAMBRANO, F. (1994).** Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. Toxicon, 32(1): 121-127.
- GORHAM, P.R.; McLACHLON, J.R.; HAMMER, V.T. & KIM, W.K. (1964).** Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.). Bréb. Verh. int. Ver. Limnol., 15:796-804.
- GURGEL, J.J.S & FERNANDO, C.H. (1994).** Fisheries in semi-arid Northeast Brazil with special reference to the role of tilapias. Int.Revue ges. Hydrobiol., 79(1): 77-94.
- JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; FILHO, D.A.M.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O & JARVIS, W.R. (1998).** Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. New Engl. J. Med., 338 (13), 873-878.
- KESHAVANATH, P.; BEVERIDGE, M.C.M.; BAIRD, D.J.; LAWTON, L.A.; NIMMO, A. & COOD, G.A. (1994).** The functional grazing response of phytoplanktivorous fish *Oreochromis niloticus* to mixtures of toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Journal of Fish Biology, 45: 123-129.

- KOTAK, B.G.; SEMALULU, S.; FRITZ, D.L.; PREPAS, E.E.; HRUDEY, S.E. & COPPOK, R.W. (1996).** Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toxicon, 34(5): 517-525.
- KRISHNAMURTHY, T.; CARMICHAEL, W. W. & SARVER, E. W.(1986).** Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. Toxicon, 24: 865-873.
- LAGOS, N.; LIBERONA, J.L.; ANDRINOLO, D.; ZAGATTO, P.A.; SOARES, R.M. & AZEVEDO, S.M.F.O. (1997).** First evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil. Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae- Vigo – Espanha. p.115.
- LAMPERT, W (1987).** Laboratory studies on zooplâncton-cyanobacteria interactions. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 21:483-490.
- MAGALHÃES, V.F. & AZEVEDO, S.M.F.O (1997).** Ecological implications of hepatotoxic *Microcystis aeruginosa* in Jacarepaguá lagoon-RJ-Brazil. VIII International Conference on Harmful Algae – Vigo, Espanha.
- MAGALHÃES, V.F.; SOARES, R.M. & AZEVEDO, S.M.F.O (1999).** Bioacumulação de microcistinas (hepatotoxinas de cianobactérias) em músculos de peixe: rico potencial para a saúde humana. VII Congresso Brasileiro de Limnologia- Perspectivas da Limnologia para o século XXI. Florianópolis – BR.

- NAVRÁTIL, S.; PALÍKOVÁ, M. & VAJCOVÁ, V. (1998).** The effects of microcystin-LR and biomass of blue-green algae on blood indices of carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Vet. Brno, 67: 273-279.
- NICHOLSON, B.C.; ROSITANO, J. & BURCH, M.D. (1994).** Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. Water Research, 28: 1297-1303.
- NORTHCOTT, M.E.; BEVERIDGE, M.C.M. & ROSS, L.G.(1991).** A laboratory investigation of the filtration and ingestion rates of the tilapia, *Oreochromis niloticus*, feeding on two species of blue-green algae. Environmental Biology of Fishes, 31: 81-85.
- OBEREMM, A.; FASTNER, J. & STEINBERG, C.E.W. (1997).** Effect of microcystin-LR and the cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebra-fish (*Danio rerio*). Water Research, 31(11): 2918-2921.
- OBEREMM, A.; BECKER, J.; CODD, G.A. & STEIBERG, C.E.W. (1999).** Effect of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. Environ. Toxicol. 14: 77-88.
- PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; OBEREMM, A.; BEATTIE, K.A.; KRAUSE, E.; CODD, G.A. & STEINBERG, C. (1998).** Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxification. Biochimica et Biophysica Acta, 1425: 527-533.

TUNDISI, J.L. & TUNDISI, T.M. (1992) Eutrophication of lakes and reservoirs: a comparative analysis of studies, perspectives. In: *Algae and Environment - a global approach*, eds. A. M. S. Mendes, M. et al., pp. 1-33. Sociedade Brasileira de Fisiologia

- RÁBERGH, C.M.I.; BYLUND, G. & ERIKSSON, J.E. (1991).** Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology*, 20: 131-146.
- SAHIN, A.; TENCALLA, F.; DIETRICH, D.; KONSTANZE, M. & NAEGELI, H. (1995).** Enzymatic analysis of liver samples from rainbow trout for diagnosis of blue-green algae-induced toxicosis. *Am. J. Vet. Res.*, 56(8):1110-1115.
- SAHIN, A.; TENCALLA, F.; DIETRICH, D. & NAEGELI, H. (1996).** Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. *Toxicology*, 106: 123-130.
- STARLING, F.L.R.M. (1993).** Análise experimental dos efeitos da Tilápia do Congo (*Tilapia rendalli*) e Carpa Prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) sobre a estrutura da comunidade planctônica do Lago Paranoá, Brasília(DF). *Acta Limnologica Brasiliensia* VI: 144-156.
- TENCALLA, F. & DIETRICH, D. (1997).** Biochemical characterization of Microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon*, 34:583-595.
- TENCALLA, F.; DIETRICH, D. & SCHLATTER, C. (1994).** Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 30: 215-224.
- TSUJI, K.; NAITO, S.; KONDO, F.; WATANABE, M.; SUZUKI, S.; NAKAZAWA, H.; SUZUKI, M.; SHIMADA, T. & HARADA, K. (1994).** A clean up method for analysis of microcystins in lake water. *Toxicon* 32(10):1251-1259.
- TUNDISI, J.G. & TUNDISI, T.M. (1992).** Eutrofication of lakes and reservoirs: a comparative analysis, case studies, perspectives. In: *Algae and Environment - a general approach*, eds.: Cordeiro-Marino, M. *et al.*, pp. 1-33, Sociedade Brasileira de Ficologia.

VASCONCELOS, V. M. (1995). Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mutilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology, 32: 227-237.

WATANABE, M. F. HARADA, K., CARMICHAEL, W.W & FUJIKI, H. (1996). Toxic *Microcystis*. CRC press..

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S.; OBEREMM, A.; MEEMS, N.; BEATTIE, K.A.; STEIBERG, C.E.W & CODD, G.A. (1999). Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 14: 89-95.

WILLIAMS, D.E; CRAIG, M; DAWE, S.C; KENT, M.L; HOLMES, C.F.B & ANDERSEN, R.J (1997a). Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and dungeness crab larvae. Chem. Res. Toxicol, 10: 463-469.

WILLIAMS, D.E; CRAIG, M; DAWE, S.C; KENT, M.L; ANDERSEN, R.J & HOLMES, C.F.B (1997b). ¹⁴C-labeled microcystin-LR administered to atlantic salmon via intraperitoneal injection provides *in vivo* evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. Toxicol, 35(6): 985-989.

YOO, R.S; CARMICHAEL, W.W; HOEHN, R.C & HRUDEY, S.E (1995). Cyanobacterial (blue-green algae) toxins: a resource guide. AWWA Research Foundation and American Water Works Association, 229 p.

ZAMBRANO, F. & CANELO, E. (1996). Effects of microcystin-LR on partial reations of the Na⁺ -K⁺ pump of de gill of carp (*Cyprinus carpio* Linneo). Toxicol, 34: 451-458.

7- ANEXOS:

7.1) Primeiro experimento:

Tabela I – Valores de microcistinas nos extratos de fígado analisados por imunoenensaio tipo ELISA, peso dos fígados e concentração de microcistinas por grama de tecido.

Fígado	Fígado ng/ml	Fígado Peso g	microcistinas ng/g
10/Jul	0	0	0
13/Jul	45,3	0,23	196,96
16/Jul	238,76	0,406	588,08
19/Jul	61,028	0,712	85,71
22/Jul	168,8	0,788	214,21
25/Jul	318,04	0,947	335,84
28/Jul	78,24	1,218	64,24
31/Jul	124,56	1,784	69,82
03/Ago	96,24	1,4	68,74
06/Ago	189,92	1,049	181,05
09/Ago	176,9	1,423	124,31

Tabela II - Valores de microcistinas nos extratos de músculo analisados por imunoenensaio tipo ELISA, peso dos músculos e concentração de microcistinas por grama de tecido.

Músculo	microcistinas ng/ml	Músculo Peso g	microcistinas ng/g
10/Jul	0	0	0
13/Jul	7,99	8,4	0,95
16/Jul	16,94	8,6	1,97
19/Jul	223,94	8,8	25,45
22/Jul	27,1	9,772	2,77
25/Jul	26,92	9,925	2,71
28/Jul	52,38	10,285	5,09
31/Jul	56,72	10,782	5,26
03/Ago	702,76	15,463	45,45
06/Ago	54,14	12,2	4,44
09/Ago	16,34	16,35	1,00

Tabela III - Valores de microcistinas nos extratos das fezes analisadas por imunoenensaio tipo ELISA, peso das fezes, concentração de microcistinas por grama de fezes e por peixe.

Fezes Fase depuração	microcistinas ng /ml	Peso fezes gramas	microcistinas ng/g	microcistinas ng/g/peixe
28/Jul	836,74	4,86	172,17	8,61
31/Jul	764,97	2,24	341,5	21,34
03/Ago	331,42	0,99	334,76	27,90
06/Ago	308,28	1,06	290,83	36,35
09/Ago	114,4	0,419	273,03	68,26

7.2) Segundo experimento:

Tabela IV – Valores de microcistinas nos extratos de fígado analisados por imunoenensaio tipo ELISA, peso dos fígados e concentração de microcistinas por grama de tecido.

Fígado	microcistinas ng/ml	Fígado Peso g	microcistinas ng/g
23/Dez	0	0	0
30/Dez	565,47	0,2	2827,35
06/Jan	103,17	0,22	468,95
13/Jan	105,67	0,54	195,69
20/Jan	135,97	0,6	226,62

Tabela V - Valores de microcistinas nos extratos de músculo analisados por imunoenensaio tipo ELISA, peso dos músculos e concentração de microcistinas por grama de tecido.

Músculo	microcistinas ng/ml	Músculo Peso g	microcistinas ng/g
23/Dez	0		0
30/Dez	190,9	2,7	70,70
06/Jan	253	4,9	51,63
13/Jan	336,3	4,4	76,43
20/Jan	136,9	3,9	35,10

Tabela VI – Dados morfométricos de *Tilapia rendalli* nos três tratamentos: alimento controle, alimento com cepa tóxica NPLJ-4 e alimento com cepa não-tóxica NPJT-1 (P= peso, C= comprimento).

Controle	Peso	Comprimento	média	desvio padrão
Data	g	cm		
30/Dez	12	8,7	P-10,3	P-1,47
	9,3	8		
	9,6	8	C-8,2	C-0,4
06/Jan	11,4	9	P-9,8	P-2,8
	11,5	8,8		
	6,5	7,5	C-8,4	C-0,81
13/Jan	13,2	9,1	P-11,5	P-1,7
	9,8	8,5		
	11,6	8,7	C-8,8	C-0,3
20/Jan	20,3	10,3	P-15,7	P-4,36
	15,3	9,3		
	11,6	8,8	C-9,5	C-0,76
NPLJ-4				
Data				
30/Dez	9,3	8,3	P-8,1	P-1,3
	6,7	7,1		
	8,2	8,1	C-7,8	C-0,64
06/Jan	9,3	8,6	P-8,8	P-0,92
	9,3	8,5		
	7,7	7,9	C-8,3	C-0,38
13/Jan	10,5	9	P-8,7	P-1,57
	7,6	8		
	8	7,7	C-8,2	C-0,68
20/Jan	8,1	8	P-7,3	P-1,41
	5,7	7,2		
	8,2	8,1	C-7,8	C-0,49
NPJT-1				
Data				
30/Dez	8,7	8,3	P-8,2	P-0,62
	7,5	7,8		
	8,4	8,2	C-8,1	C-0,26
06/Jan	8,4	8,3	P-7,4	P-1,06
	7,6	7,9		
	6,3	7,3	C-7,8	C-0,5
13/Jan	7,6	7,9	P-7,03	P-0,51
	6,6	7,6		
	6,9	7,5	C-7,7	C-0,2
20/Jan	8	7,8	P-7,6	P-0,4
	7,7	7,9		
	7,2	7,7	C-7,8	C-0,1

7.3) Terceiro experimento:

Tabela VII – Valores de microcistinas nos extratos de fígado analisados por imunoenensaio tipo ELISA, peso dos fígados e concentração de microcistinas por grama de tecido.

Fígado	microcistinas ng/ml	Fígado Peso g	microcistinas ng/g
12/Mar	0	0	0
19/Mar	409,55	0,59	694,15
26/Mar	315,25	0,35	900,71
02/Abr	1330,85	1,02	1304,75
09/Abr	200,95	0,77	260,97
16/Abr	335,55	0,51	657,94
23/Abr	339,45	0,2	1697,25

Tabela VIII - Valores de microcistinas nos extratos de músculo analisados por imunoenensaio tipo ELISA, peso dos músculos e concentração de microcistinas por grama de tecido.

Músculo	microcistinas ng/ml	Músculo Peso g	microcistinas ng/g
12/Mar	0	0	0
19/Mar	373,95	7,23	51,72
26/Mar	446,75	4,63	96,49
02/Abr	271,6	7,11	38,20
09/Abr	198,75	6,42	30,96
16/Abr	124,15	5,13	24,20
23/Abr	184,85	3,46	53,42

Tabela IX – Dados morfométricos de *Tilapia rendalli* no tratamento controle (P= peso, C= comprimento).

Controle	Peso	Comprimento	média	desvio padrão
Data	g	cm		
19/Mar	16,4	9,3	P-12,5	P-4,99
	14,3	9,2		
	6,9	7,3	C-8,6	C-1,12
26/Mar	9,2	8,4	P-9,03	P-0,37
	9,3	8,2		
	8,6	8	C-8,2	C-0,2
02/Abr	11,2	8,5	P-11,7	P-0,78
	11,3	8,5		
	12,6	8,8	C-8,6	C-0,17
09/Abr	7	7,2	P-8	P-0,91
	8,8	8		
	8,2	7,8	C-7,6	C-0,41
16/Abr	10	8,7	P-8,4	P-1,48
	8	7,8		
	7,1	7,4	C-8	C-0,66
23/Abr	7,3	7	P-8,4	P-1,05
	8,6	8		
	9,4	8	C-7,7	C-0,58

Tabela X – Dados morfométricos de *Tilapia rendalli* no tratamento com cepa tóxica NPLJ-4 (P= peso, C= comprimento).

NPLJ-4	Peso	Comprimento	média	desvio padrão
Data	g	cm		
19/Mar	9,2	8	P-10,8	P-1,47
	12	8,8		
	11,4	8,6	C-8,5	C-0,41
26/Mar	9,1	8	P-6,5	P-2,4
	4,3	6,2		
	6,1	7,2	C-7,1	C-0,9
02/Abr	9,7	8,2	P-10,03	P-0,66
	9,6	8,2		
	10,8	8,7	C-8,4	C-0,28
09/Abr	8,3	8	P-8,9	P-0,7
	8,8	8		
	9,7	8,5	C-8,2	C-0,28
16/Abr	9,1	8,3	P-7,5	P-1,84
	8	7,7		
	5,5	7	C-7,6	C-0,65
23/Abr	5,4	6,7	P-5,8	P-0,92
	6,9	7,2		
	5,2	6,6	C-6,8	C-0,32

Tabela XI – Dados morfométricos de *Tilapia rendalli* no tratamento com cepa não-tóxica NPBR-2 (P= peso, C= comprimento).

NPBR-2 Data	Peso g	Comprimento cm	média	desvio padrão
19/Mar	8,5	8	P-6,4	P-1,85
	5,7	7		
	5	6,5	C-7,2	C-0,76
26/Mar	8,6	8,3	P-7,6	P-0,88
	7,3	7,7		
	6,9	7,4	C-7,8	C-0,45
02/Abr	12,5	9,3	P-10,9	P-1,41
	10	8,2		
	10,1	8,4	C-8,6	C-0,58
09/Abr	7,1	7,5	P-8,5	P-1,21
	9,4	8,5		
	8,9	8,2	C-8,06	C-0,51
16/Abr	8,2	8	P-7,3	P-0,75
	7	7,8		
	6,8	7,7	C-7,8	C-0,15
23/Abr	8,5	7,5	P-8,06	P-0,51
	7,5	7,4		
	8,2	8	C-7,6	C-0,32