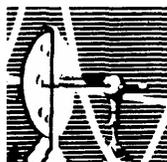


***RODRIGO DE CÁSSIO DA SILVA***

---

Acúmulo e Depuração de Cilindrospermopsina  
(cianotoxina) e seu efeito no crescimento em  
tilápias juvenis (*Oreochromis niloticus*).

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias**

**Rio de Janeiro  
2008**

# ***RODRIGO DE CÁSSIO DA SILVA***

---

Acúmulo e Depuração de Cilindrospermopsina  
(cianotoxina) e seu efeito no crescimento em  
tilápias juvenis (*Oreochromis niloticus*).

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

**Orientadora: Dra. Valéria Freitas de Magalhães**

**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias**

**Rio de Janeiro  
2008**

Silva, Rodrigo de Cássio da

Acúmulo e Depuração de Cilindrospermopsina (cianotoxina) e seu efeito no crescimento em tilápias juvenis (*Oreochromis niloticus*) / Rodrigo de Cássio da Silva. Rio de Janeiro, 2008.

Xi, 89 f.: il.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2008.

Orientador: Valéria Freitas de Magalhães

1. Bioacumulação. 2. Cilindrospermopsina. 3. *Oreochromis niloticus*.

I. Magalhães, Valéria Freitas de e II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título.

**“Acúmulo e Depuração de Cilindrospermopsina  
(cianotoxina) e seu efeito no crescimento em tilápias  
juvenis (*Oreochromis niloticus*)”.**

**RODRIGO DE CÁSSIO DA SILVA**

**Dissertação de Mestrado Submetida à Universidade Federal do  
Rio de Janeiro Visando a Obtenção do Grau de Mestre em  
Ciências Biológicas (Biofísica)**

Aprovada por:

---

Dr. Olaf Malm  
(Presidente da Banca)

---

Dr. Jean Remy Daveé Guimarães

---

Dr. José Lailson Brito Junior

---

Dr. Raquel Moraes Soares  
(Revisor)

---

Dra. Valéria Freitas de Magalhães  
(Orientadora)

Rio de Janeiro, RJ, Brasil.  
28 de março de 2008.

*“Eu quero saber como Deus criou este mundo. Não estou interessado neste ou naquele fenômeno, no espectro deste ou daquele elemento. Eu quero conhecer os pensamentos Dele, o resto são detalhes”.*

*Albert Einstein*

*Agradeço a Deus pela oportunidade de  
poder aprender e crescer...*

*Dedico à minha mãe, em que eu  
sempre me espelharei...  
“...e em toda sua meninice, ele um dia me disse  
que chegava lá...olha aí, é o meu guri...”*

*E a todos que acreditaram que eu conseguiria.*

*Obrigado.*

## AGRADECIMENTOS

- À Deus, minha mãe, pai, irmã e tia.
- À Minha orientadora Valeria Freitas de Magalhães, pela paciência, carinho e dedicação demonstrados durante esses anos de convívio.
- À CAPES pela bolsa concedida.
- À BEACON (Sr. Erik e Sr. Titan) por ter nos cedido os kits de ELISA, fundamentais na realização desse trabalho.
- À Furnas Centrais Elétricas por nos ter concedido os peixes, que também foram fundamentais na realização do estudo. Um agradecimento especial ao Sr. Dirceu Marzulo, responsável técnico, pela generosidade e paciência.
- Ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, por ter dado todo suporte na realização dessa pesquisa. Agradecimentos especiais à Leila e Carlos, ambos do departamento de compras, à Sandra Brito da pós-graduação e Edna da secretaria. Todos de fundamental importância.
- Ao Marcelo Manzi e “Carlinha” (Laboratório de Ecologia de peixe) pela enorme ajuda no parâmetro estatística...Sem eles a interpretação dos dados seria muito difícil.
- À professora Érica Caramarshi, pela disponibilidade durante as dúvidas surgidas ao longo dos estudos.
- À banca examinadora, Prof. Olaf Malm, Prof. Jean Remy, Prof. José Lailson, pela disponibilidade e afino na correção desta dissertação.
- À tão querida Raquel “zinha” pela revisão da tese e pela amizade demonstrada.
- À Prof. Sandra Azevedo pelos conselhos e conhecimentos a mim transmitidos ao longo desses anos de convivência.
- Aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC): Alessandrinha, Bel, Déia, João, Ricardo, Job, Ronaldo, Elis, Priscila, Simone, Aloysio, Raquelzita, Levi, Ana Cláudia, Pedro, Ramon, Luana, Maria, Luis Otávio, Vítor, Suzane, Ana Lúcia. Um agradecimento especial ao Rafael “Bobby”, pela amizade construída. E a todos que não citei aqui, mas que passaram pelo laboratório contribuindo para a pesquisa.

- Aos componentes do Laboratório de Radioisótopos.
- Aos amigos externos (que são muitos, ainda bem!)...TODOS...pela paciência que demonstravam quando eu dizia: “Não posso. Vou cuidar dos peixes!”. Um agradecimento especial à Viviane Múrcia, pela amizade, carinho, companheirismo, paciência demonstrados ao longo desses anos, e por ter me ensinado que no final tudo dá certo!
- E a todos que auxiliaram, de alguma forma, para esse trabalho. Sintam-se imensamente agradecidos

## RESUMO

### ACÚMULO E DEPURAÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA (CIANOTOXINA) E SEU EFEITO NO CRESCIMENTO DE TILÁPIAS JUVENIS (*Oreochromis niloticus*).

Cilindrospermopsina (CYN) é um alcalóide tóxico produzido por diversos gêneros de cianobactérias e responsável por diversos casos de intoxicação entre humanos e animais. Seu principal mecanismo de ação é a inibição de síntese protéica, no entanto, em doses subletais produz efeitos em organismos aquáticos, incluindo mudanças no desenvolvimento embrionário e de comportamento, que ainda são pouco estudados. Poucas informações estão disponíveis a respeito da bioacumulação de CYN nesses organismos. Neste estudo foram examinados o acúmulo, a depuração e o efeito de CYN no crescimento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a extrato celular tóxico e células íntegras de *Cylindrospermopsis raciborskii* produtoras de CYN. Quatro experimentos, em condições de laboratório, foram feitos. No primeiro experimento, os animais foram alimentados durante 15 dias, com alimento ( $0.5 \text{ g alimento} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{peixe}^{-1}$ ) com uma concentração de  $0.31 \mu\text{g CYN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ alimento}$ . Durante o período de exposição os animais foram coletados a cada 3 dias. No segundo experimento, os peixes foram alimentados por 30 dias ( $0.5 \text{ g alimento} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{peixe}^{-1}$ ) contendo uma concentração de  $0.35 \mu\text{g CYN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ alimento}$ . Após o 15º dia de experimento, os peixes foram coletados a cada 3 dias. No terceiro experimento os animais receberam ( $0.5 \text{ g alimento} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{peixe}^{-1}$ ), durante 12 dias, alimento contendo extrato tóxico ( $0.8 \mu\text{g CYN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ alimento}$ ), e nos 10 dias subseqüentes os animais foram alimentados com alimento não tóxico. O quarto experimento, as tilápias receberam ( $0.5 \text{ g alimento} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{peixe}^{-1}$ ), durante 15 dias, alimento contendo células íntegras de *C. raciborskii* ( $5.4 \mu\text{g CYN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ alimento}$ ). Em todos os experimentos, os animais foram pesados, medidos e seu tecido muscular e vísceras coletados. A extração foi feita com água e metanol 100%, então, as amostras foram filtradas e analisadas por imunoenensaio enzimático (ELISA). Foi verificado que os animais expostos à toxina tiveram seu crescimento suprimido no experimento 1 mas isso não foi verificado nos outros experimentos. No primeiro experimento as mais altas concentrações de toxina no músculo e nas vísceras foram observadas no terceiro dia, essas concentrações decaem, oscilando ao longo do tempo. No segundo experimento, as maiores concentrações de toxina no músculo e nas vísceras foram observadas no primeiro dia de coleta (19º dia -  $0.15 \text{ ng CYN} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $7.83 \text{ ng CYN} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente). No experimento de depuração (terceiro) as concentrações de toxina encontradas no músculo e nas vísceras durante a fase de depuração foram muito semelhantes às encontradas durante a fase de acúmulo. No último experimento, as mais altas concentrações de toxina no músculo, foram encontradas no 12º dia ( $2.3 \text{ ng CYN} \cdot \text{g}^{-1}$ ) e nas vísceras, no 15º dia ( $21.1 \text{ ng CYN} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Estudos sobre a distribuição da cilindrospermopsina em tecido animal mostram que a maioria da toxina é observada nas vísceras. No presente estudo foi observado um padrão oscilatório ao longo do tempo de exposição à toxina e isso pode estar relacionado com o processo de detoxificação. Os resultados obtidos nesse estudo não corroboram os obtidos na literatura já que aqui os peixes alimentados com extrato tóxico acumulam proporcionalmente mais toxina do que os animais alimentados com células íntegras. Este é o primeiro trabalho que investiga a bioacumulação de CYN em tecidos de tilápias e indica a importância de se promover um contínuo monitoramento desses organismos para consumo humano e animal.

## ABSTRACT

### BIOACCUMULATION AND DEPURATION OF THE CYANOBACTERIAL TOXIN CYLINDROSPERMOPSIN AND ITS EFFECTS ON GROWTH IN THE JUVENILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*).

Cylindrospermopsin (CYN) is a toxic alkaloid produced by several genera of cyanobacteria and is implicated in human and wildlife poisoning incidents. The principal mode of action for CYN is protein synthesis inhibition, but the sublethal effects of this toxin in aquatic organisms, including changes to development and behavior, have been poorly studied. Little information is available regarding bioaccumulation of CYN in these organisms. This study examined its bioaccumulation, depuration and effects on growth in the juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to freeze-thawed whole cell extracts and whole cells of toxic (*Cylindrospermopsis raciborskii*). Four experiments under laboratory conditions with these fish were done. In the first one the animals were fed for 15 days with fish food plus cells extracts ( $0.5 \text{ g food.day}^{-1} \cdot \text{fish}^{-1}$ ) containing  $0.31 \mu\text{g CYN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ food}$ . Every three days for a fifteen day period, fish were collected. In the second trial, fish were fed during 30 days and the fish food ( $0.5 \text{ g food.day}^{-1} \cdot \text{fish}^{-1}$ ) contained  $0.35 \mu\text{g CYN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ food}$ . After 15 days, fish were collected each 3 days. In the third trial fish received ( $0.5 \text{ g food.day}^{-1} \cdot \text{fish}^{-1}$ ), during 12 days, fish food with cells extract at a higher toxin concentration ( $0.8 \mu\text{g CYN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ food}$ ). In the following 10 days, the animals were fed ( $0.5 \text{ g food.day}^{-1} \cdot \text{fish}^{-1}$ ) without toxic cells extracts. The fourth trial, fish received ( $0.5 \text{ g food.day}^{-1} \cdot \text{fish}^{-1}$ ), during 15 days, food plus whole cells of *C. raciborskii* ( $5.4 \mu\text{g CYN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ food}$ ). Fish weight and length were measured, its samples of muscle tissue and viscera, in all trials, were extracted with water and 100% methanol, filtered, evaporated and resuspended in water and analyzed by ELISA immunoassays. It was verified that CYN exposed animals had their biomass and sizes reduced in relation to non-exposed fish in the trial 1, but not in the others trials. In the first trial the higher concentration of CYN in muscle tissue was observed on third day, tending to reduce on day with oscillations throughout the time. Viscera showed the maximum concentration on third day and presented the same concentration oscillation pattern throughout the time. In the second trial, maximum concentration was found in the first sampling day on muscle tissues (19th day –  $0.15 \text{ ng CYN} \cdot \text{g}^{-1}$ ) and viscera ( $7.83 \text{ ng CYN} \cdot \text{g}^{-1}$ ). In the depuration experiment (3rd trial) the concentration found in muscle tissue and viscera, in depuration period, were almost the same found on first sampling day. In the last trial (4th trial), highest concentrations of CYN in muscle tissue was found on 12nd day ( $2.3 \text{ ng CYN} \cdot \text{g}^{-1}$ ). But in viscera, the higher concentration was found on 15th day ( $21.1 \text{ ng CYN} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Studies of CYN distribution in animal tissues showed that the majority of this toxin is observed in viscera, resulting from the consumption of toxin-containing food. In this study we have noted a bi-phasic pattern of CYN throughout the time and it could be attributed to the detoxification process. These results do not corroborate other works since fish accumulated CYN when nourished with cellular extracts more than toxic cells. This is the first investigation of CYN bioaccumulation in tilapia and indicates the importance of continuous monitoring of this compound in organisms for human and animal consumptions.

## Sumário

	Pág.
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivo.....</b>	<b>16</b>
2.1. Geral.....	16
2.2. Específico.....	16
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Cultivo da cepa de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Extração e Análise de Cilindrospermopsina da Cepa CYP011K.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3. Coleta e manutenção dos animais em laboratório.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4. Estabelecimento do método para fornecimento de cianobactéria tóxica e extrato celular tóxico aos animais expostos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.5. Experimento 1: Acúmulo de cilindrospermopsina em tecidos de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta a extrato tóxico.....</b>	<b>22</b>
3.5.1. Experimento 1A - com duração de 15 dias.....	22
3.5.2. Experimento 1B - com duração de 30 dias.....	24
<b>3.6. Experimento 2: Acúmulo e depuração de cilindrospermopsina em tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas ao extrato tóxico.....</b>	<b>25</b>
<b>3.7. Experimento 3: Acúmulo de cilindrospermopsina em tecidos de tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>) exposta a células íntegras de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>3.8. Extração e análise de cilindrospermopsina.....</b>	<b>28</b>
3.8.1. Extração de cilindrospermopsina de víscera e tecido muscular de tilápias.....	28
3.8.2. Extração de cilindrospermopsina das fezes e água do experimento 2.....	29
3.8.3. Extração do Alimento.....	30
<b>3.9. Análise por Imunoensaio enzimático do tipo ELISA.....</b>	<b>31</b>
<b>3.10. Análise estatística dos dados de peso e comprimento das tilápias.....</b>	<b>32</b>
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Quantidade de alimento oferecida aos animais.....</b>	<b>33</b>

<b>4.2. Estabelecimento do protocolo de extração.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Correlações ecológicas entre os experimentos apresentados e o meio ambiente.....</b>	<b>34</b>
<b>4.4. Experimento 1A.....</b>	<b>35</b>
4.4.1. Análise dos dados de peso e comprimento.....	35
4.4.2. Relação peso:comprimento.....	38
<b>4.5. Experimento 1B.....</b>	<b>40</b>
4.5.1. Análise dos dados de peso e comprimento.....	40
4.5.2. Relação peso:comprimento.....	43
<b>4.6. Experimento 2.....</b>	<b>45</b>
4.6.1. Análise dos dados de peso e comprimento.....	45
4.6.2. Relação peso:comprimento.....	48
<b>4.7. Experimento 3.....</b>	<b>50</b>
4.7.1. Análise dos dados de peso e comprimento.....	50
4.7.2. Relação peso:comprimento.....	53
<b>4.8. Dados da variação das concentrações de cilindropermopsina em tecidos de tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>) em diferentes condições experimentais.....</b>	<b>59</b>
4.8.1. Experimento 1A.....	59
4.8.2. Experimento 1B.....	62
4.8.3. Experimento 2.....	66
4.8.4. Experimento 3.....	69
<b>4.9. Avaliação do potencial de risco para o consumo de tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>) contaminadas com cilindropermopsina.....</b>	<b>77</b>
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>81</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>82</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

As temáticas relacionadas com meio ambiente vêm sendo amplamente difundidas na sociedade e se constituindo em objeto de preocupações políticas e de práticas governamentais, independentemente do grau de industrialização do país em questão, o que evidencia uma nova consciência política e social. Portanto, é cada vez maior o número de cidadãos que percebe na degradação ambiental uma ameaça à saúde e ao bem-estar social das civilizações.

Os problemas relativos à contaminação ambiental têm ocupado espaço significativo em agendas de estudos e pesquisas na sociedade contemporânea, por estarem, de uma maneira geral, associados ao crescente processo de industrialização iniciado em meados do século XVIII com a Revolução Industrial. Desde então, o desenvolvimento de novas tecnologias, processos de produção e seus produtos têm contribuído significativamente para o comprometimento das condições de saúde do homem e dos ecossistemas (Brilhante & Caldas, 1999).

A descarga de nutrientes através do lançamento de efluentes domésticos e indústrias nos ambientes aquáticos, e ainda, o escoamento de fertilizantes utilizados amplamente nos processos agrícolas são umas das principais ações antrópicas que vem favorecendo a degradação desses ecossistemas (Tundisi & Matsumura-Tundisi, 1992).

Essas ações, dentre outros impactos, causam a eutrofização que é o aumento no aporte de nutrientes, principalmente, nitrogênio e fósforo, excedendo a capacidade de assimilação do sistema (Reynolds, 1984; Kennish, 1990).

A figura a seguir reproduz a evolução de um processo de eutrofização em um território específico, no caso de um lago ou uma represa, e é possível observar uma associação entre o uso e a ocupação do solo e este processo (figura 1).

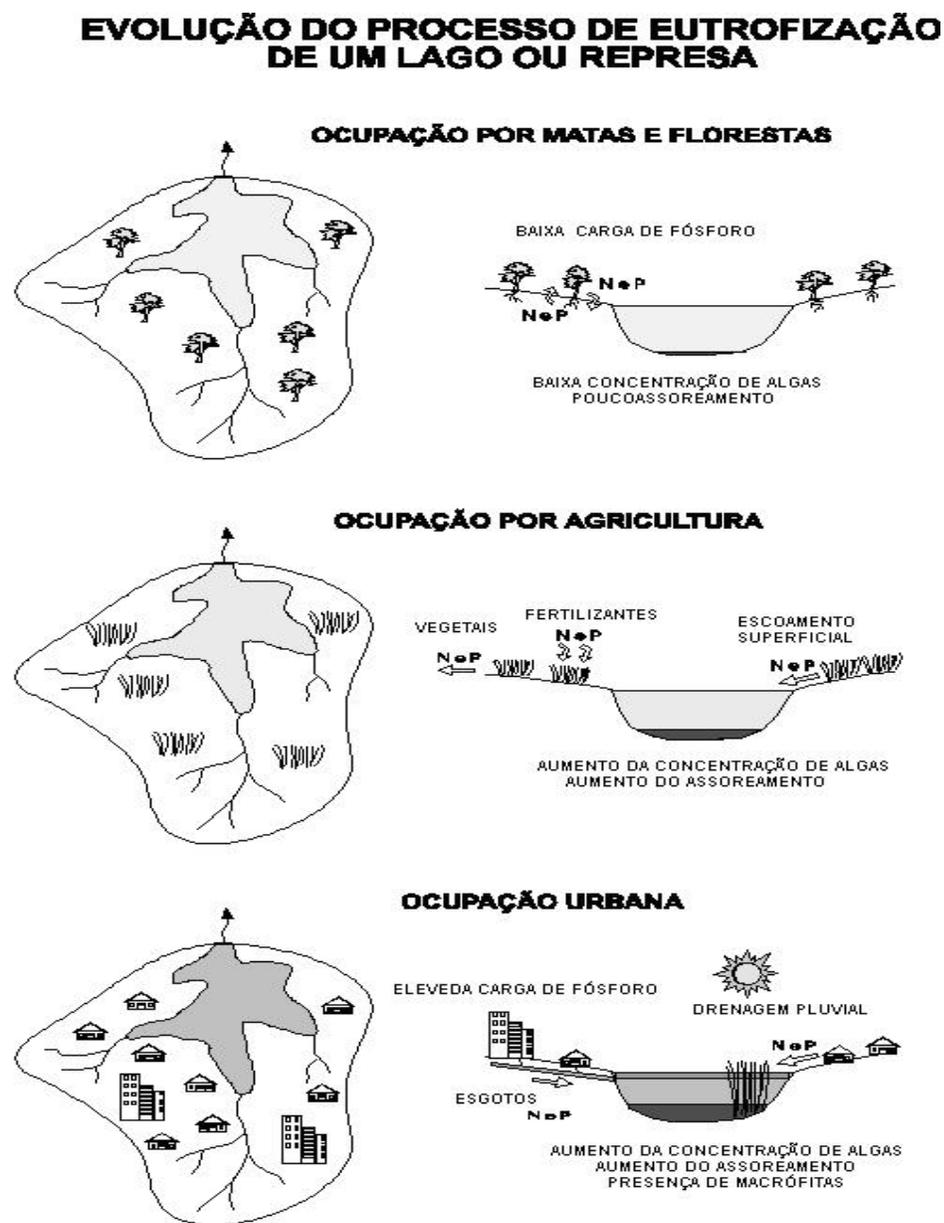


Figura 1. Evolução do processo de eutrofização em um lago ou represa. Associação entre o uso e ocupação do solo e a eutrofização. (Fonte: Von Sperling, 1996).

Alguns autores (Arceivala, 1981; Thomann & Mueller, 1987; Von Sperling, 1994 *apud* Von Sperling, 1996) pontuam diferentes conseqüências ambientais e econômicas decorrentes desse processo. Por exemplo:

- Problemas estéticos e recreacionais;
- Condições anaeróbias no fundo do corpo d'água (redução do oxigênio dissolvido);
- Eventuais condições anaeróbias no corpo d'água como um todo;
- Eventual mortandade de peixes;
- Maior dificuldade e elevação nos custos de tratamento da água;
- Problemas com o abastecimento de águas industriais;
- Modificações na qualidade e quantidade de peixes de valor comercial;
- Redução na navegação e capacidade de transporte;
- Desaparecimento gradual do lago como um todo;
- Incidência de florações de microalgas e cianobactérias.

Quanto ao comprometimento da qualidade da saúde humana, é sabido que desde Hipócrates (filósofo grego – considerado o “pai da medicina”) aos dias atuais, as ciências que investigam a relação saúde/meio ambiente/ser humano, têm procurado as causas, os modos de transmissão e a prevenção das doenças no habitat humano. No que diz respeito a preocupação com os perigos do consumo de água contaminada, é possível identificar em documentos egípcios e gregos da antiguidade, bem como em passagens da *Bíblia*, por exemplo, no livro de ÊXODO capítulo 7, onde é destacada uma floração de dinoflagelados:

*Todas as águas do rio se tornaram em sangue (...) De modo que os peixes que estavam no rio morreram, e o rio cheirou mal, e os egípcios não podiam beber da água do rio; e houve sangue por toda a terra do Egito.*

Ao longo das últimas décadas o problema das proliferações (florações) de algas nocivas, têm adquirido uma posição de suma importância dentro da comunidade científica,

principalmente àquela ligada a saúde pública, além de estar recebendo uma crescente atenção da mídia e dos meios de comunicação, apesar de não se tratar de um fenômeno recente.

A literatura específica tem mostrado que corpos d'água eutrofizados são bastante favoráveis à proliferação de cianobactérias, e tal fenômeno tem sido registrado em diversos países no mundo (Yoo *et al.*, 1995) e no Brasil há registros de ocorrência dessas microalgas em 11 dos 26 estados brasileiros (Sant'anna & Azevedo, 2000).

As **cianobactérias** são organismos classificados como fotossintetizantes, datados de aproximadamente 3,5 bilhões de anos, fato esse que as tornam umas das possíveis responsáveis pela formação da atmosfera atual, além disso, acredita-se também que foram as precursoras na origem dos cloroplastos através de um evento endossimbiótico. Elas possuem clorofila *a* e outros pigmentos acessórios, como por exemplo, ficocianina, o que lhes conferiu, antigamente, também o nome de “algas azuis”. Está entre as formas de vida mais antiga já descrita no planeta terra. E podem se organizar de maneira unicelular, colonial e filamentosa, além disso, seu tamanho celular pode variar de 2µm a 40µm de diâmetro.

Esses organismos podem viver em simbiose com plantas e fungos, podendo ser bentônicos ou planctônicos. As cianobactérias possuem uma distribuição cosmopolita e podem ser encontradas em diversos tipos de hábitat como, por exemplo, lagos antárticos, fossas termais, desertos áridos e solos tropicais ácidos. Entretanto, são organismos mais comumente conhecidos por fazerem parte da comunidade planctônica em ambientes marinhos e de água doce.

Estas microalgas possuem adaptações especiais que lhes conferem vantagens no meio ambiente em que se encontram, por exemplo: são fixadoras de nitrogênio atmosférico

contribuindo para fertilidade do solo e da água (Rai, 1990 *apud* Chorus & Bartram, 1999), possuem controle da flutuabilidade por meio de estruturas chamadas de aerótopos (ou vacúolo gasosos) e também possuem pigmentos acessórios que possibilitam uma melhora na captação de luz.

No entanto, o aumento excessivo desses organismos nos ecossistemas aquáticos pode produzir impactos drásticos sobre os recursos pesqueiros e sobre a saúde pública, além da diminuição da biodiversidade local, odores desagradáveis e gosto ruim na água onde as mesmas estão presentes.

Além disso, casos de intoxicação humana e animal têm se tornado freqüentes. Um dos primeiros relatos foi documentado por Francis no ano de 1878. No entanto há relatos desse tipo de intoxicação ocorridos a mais de 1000 anos, na dinastia chinesa, onde o General Zuh Ge-Ling relatou perda de parte da tropa devido à intoxicação por ingestão de água de um rio que estava “verde” (Shun Zang Yu, comunicação pessoal *apud* Chorus & Bartram, 1999).

Tais incidentes devem-se ao fato de que as cianobactérias são potencialmente produtoras de toxinas (cianotoxinas).

As **Cianotoxinas** configuram-se como metabólitos secundários produzidos por cianobactérias e que acarretam conseqüências danosas a diversos organismos, entretanto, parecem ser mais danosas a animais terrestres do que aos organismos aquáticos. Esses compostos podem ser classificados de acordo com a estrutura química como peptídeos cíclicos (microcistinas e nodularina), como alcalóides (anatoxina-a, anatoxina-a (s), saxitoxinas, cilindrospermospinas, aplysiatoxina e lyngbyatoxina-a) e os lipopolissacarídeos (LPS). Esses metabólitos são mais comumente classificados de acordo com a sua toxicidade em mamíferos como: dermatotoxinas (aplysiatoxina e lyngbyatoxina-a),

hepatotoxinas (microcistinas e nodularina), citotoxinas (cilindrospermopsina) e neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a (s) e saxitoxinas) (Kaebernick & Neilan, 2001).

As dermatotoxinas, aplysiatoxina e lyngbyatoxina-a, até o momento foram encontradas em cianobactérias bentônicas marinhas do gênero *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Schizothrix*. Essas toxinas podem causar dermatites de contato. As aplysiatoxinas são potentes promotores de tumor e ativadoras de proteínas quinases C, enquanto que a lyngbyatoxina-a causa inflamação oral e gastrointestinal (Chorus & Barthram, 1999).

As neurotoxinas já foram identificadas em espécies do gênero *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Thricodesmium*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis*. São conhecidos três diferentes tipos de neurotoxinas. As saxitoxinas ou toxinas paralisante de mariscos (*Paralytic Shellfish Poison* – PSPs) são assim chamadas por serem os mexilhões seus principais vetores, freqüentemente relacionados às florações de dinoflagelados marinhos, essas toxinas acarretam um quadro toxicológico característico. Elas também agem no sistema nervoso bloqueando os canais de sódio neuronais impedindo a propagação do impulso nervoso. Já a anatoxina-a e anatoxina-a(s) são potentes bloqueadores neuromusculares pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos e inibidoras da ação da acetilcolinesterase, impedindo a degradação da acetilcolina, respectivamente (Carmichael, 1992; Falconer, 1998).

As hepatotoxinas são as toxinas mais comumente produzidas pelas cianobactérias. Essas toxinas são oligopeptídeos cíclicos, como as microcistinas e a nodularina ou alcalóides como a cilindrospermopsina.

Dentre essas, as mais freqüentemente encontradas são as microcistinas que comprovadamente agem como inibidoras potentes e específicas de proteínas fosfatases dos tipos 1 e 2 A (PP1 e PP2), sendo consideradas promotoras de tumores (Carmichael, 1992;

Rinehart *et al.*, 1994). Essas hepatotoxinas penetram nos hepatócitos através dos receptores dos ácidos biliares, promovendo uma desorganização dos filamentos intermediários e dos microfilamentos de actina, que são polímeros protéicos do citoesqueleto, gerando uma diminuição do tamanho dos hepatócitos. Conseqüentemente, o fígado perde a sua arquitetura e passa a desenvolver graves problemas (Hooser *et al.*, 1991; Carmichael, 1994).

A nodularina é assim denominada por ter sido primeiramente isolada de uma microalga chamada *Nodularia spumigena* (Rinehart *et al.*, 1988). Essa toxina é um pentapeptídeo cíclico com estrutura muito semelhante a das microcistinas. Além da semelhança estrutural, essa toxina tem um modo de ação também semelhante: a mesma inibe a ação das proteínas fosfatases 1 e 2A (Ohta *et al.*, 1994), no entanto não se liga covalentemente a essas proteínas.

A cilindrospermopsina, também uma hepatotoxina, foi recentemente classificada como citotoxina, pois atinge outros órgãos além do fígado. Em 1979 uma “doença” acometeu os moradores de Palm Island (Austrália). Um total de 148 pessoas, das quais 138 crianças foram hospitalizadas. Os sintomas característicos da população afetada foram anorexia e hepatomegalia. Testes sanguíneos nos pacientes mostraram níveis anormais de glicose e proteínas, bem como a presença de sangue na urina dos pacientes, progredindo para uma diarreia sanguinolenta. A médica local Susan Byth reportou o incidente como “doença misteriosa” (mystery disease – Byth, 1980).

Com base nas análises, inicialmente foi sugerida uma doença causada por uma toxina vegetal proveniente de uma fonte comum (Bourke *et al.*, 1983). No entanto, um importante estudo ecológico deste reservatório mostrou que o mesmo apresentava,

periodicamente, florações de cianobactérias, principalmente das espécies *Anabaena circinalis* e *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Sabia-se que a água do local tinha odor e cheiro desagradáveis durante aquele incidente e, além disso, o tratamento da água não havia sido feito de maneira correta (havia sido tratada com o algicida sulfato de cobre), podendo acarretar riscos à saúde da população consumidora daquela água.

Estudos toxicológicos feitos com as duas cepas do local demonstraram que apenas a cepa da espécie *C. raciborskii* era tóxica (Hawkins *et al.*, 1985). Este fato se constituiu o primeiro caso documentado de intoxicação causado por cilindrospermopsina, que seria posteriormente identificada e quimicamente definida como uma potente hepatotoxina (Ohtani *et al.*, 1992).

A **cilindrospermopsina** (CYN – figura 2), é um alcalóide guanidínico cíclico que já foi identificado em espécies do gênero *Cylindrospermopsis* (Hawkins *et al.* 1985; Ohtani *et al.*, 1992), *Umezakia* (Harada *et al.*, 1994), *Aphanizomenon* (Banker *et al.*, 1997; Shaw *et al.* 1999), *Raphidiopsis* (Li *et al.*, 2001), *Anabaena* (Schembri *et al.*, 2001), *Aphanizomenon flos-aquae* (Preussel *et al.*, 2006) e mais recentemente *Lyngbya wollei* (Seifert *et al.*, 2007).

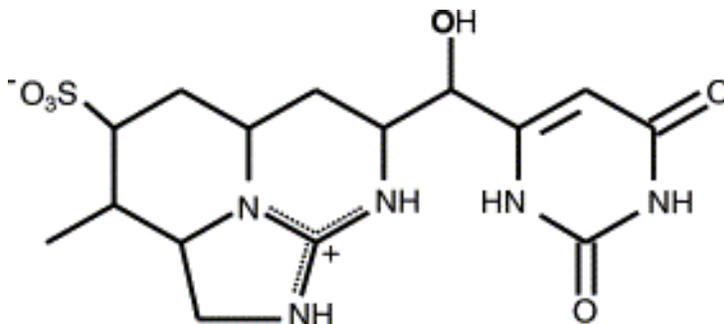


Figura 2. Estrutura química da molécula de cilindrospermopsina.

É uma molécula quimicamente estável a luz solar, a alta variação de pH bem como a altas variações de temperatura (Chiswell *et al.*, 1999).

Trata-se de um potente inibidor de síntese protéica (Terao *et al.*, 1994) e, segundo estudos realizados por Humpage *et al.* (2000) e Shen *et al.* (2002), a cilindropermopsina pode causar danos a estrutura do DNA, indicando, portanto, um possível efeito carcinogênico e/ou mutagênico.

Seu órgão-alvo principal é o fígado onde a toxina causa necrose centrolobular em mamíferos (Hawkins *et al.*, 1985; Seawright *et al.*, 1999; Bernard *et al.*, 2003; Griffiths & Saker, 2003; Humpage & Falconer, 2003), no entanto também causa danos aos rins afetando a sua arquitetura básica além de causar necrose no túbulo proximal e, além disso, foi verificada hemorragia nos pulmões (Hawkins *et al.*, 1985; Bernard *et al.*, 2003). O timo e coração também são afetados (Harada *et al.*, 1994; Falconer *et al.*, 1999). Kiss, *et al.* (2002) sugeriram ainda, que esta toxina pode ter atividade neurotóxica.

Segundo Norris *et al.* (2001), estudos realizados em camundongos com CYN marcada com carbono radioativo, indicaram que a principal via de excreção desta toxina é a renal onde aproximadamente 50% da dose intraperitonealmente administrada foi observada na urina após 6 horas, enquanto que 20% estava presente no fígado. Após 48 horas, 13% da toxina permanecia no fígado, ao passo que apenas uma pequena quantidade se mantinha nos rins. A excreção fecal, neste caso, foi variável, com média de 10%.

Segundo Ohtani *et al.* (1992) a dose letal, intraperitoneal (i.p.), que mata 50% dos animais (DL<sub>50</sub>) de CYN purificada em camundongos é de 2100 µg/Kg em 24 horas e de 200 µg/Kg em 5-6 dias. Humpage e Falconer (2003) determinaram em 30 µg/Kg/dia a Concentração de Efeito Não Observável (CENO) para camundongos (via oral) estabelecendo o valor de 0,03 µg/Kg/dia como a Ingestão Diária Tolerada (IDT ou TDI). A

partir deste dado foi atribuído a esta toxina um valor máximo aceitável, em água para consumo humano de 1,0 µg/L.

No Brasil a presença desta toxina já foi identificada no carvão ativado da clínica de diálise, envolvida na tragédia de Caruaru, onde 130 pessoas se intoxicaram e 54 morreram devido à exposição à água contaminada com cianotoxinas (Carmichael *et al.*, 2001). E recentemente, Moreira & Bizi (2007) detectaram, através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massa (LC-MS/MS) a presença desta toxina em uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* isolada de um reservatório brasileiro.

As cianobactérias são possivelmente um importante componente na cadeia alimentar de vários peixes tropicais de acordo com Bowen (1982, apud Beveridge *et al.*, 1993).

O conhecimento de que algumas espécies de peixes herbívoros se alimentam de colônias e florações de cianobactérias, levou ao desenvolvimento de experiências de introdução desses peixes em lagos eutróficos com o objetivo de reduzir a população de cianobactérias (Starling, 1993).

No Brasil, a introdução de Tilápias tais como: *Tilapia rendalli* e *Oreochromis niloticus*, em reservatórios de todo país, principalmente no nordeste, vem sendo feita desde 1956 (Gurgel & Fernando, 1994) como estratégia sócio-econômica para a população do entorno, pois se trata de um recurso alimentar de alto valor nutritivo.

Em termos de contexto nacional, **as tilápias** têm sido bastante valorizadas, pois no intuito de promover um aumento no sistema de produção e contribuir com a perspectiva do desenvolvimento sustentável, grandes investimentos nas áreas de cultivo e produção de pescados têm sido empregados. O Programa Nacional de Apoio à Competitividade e a

Sustentabilidade da Cadeia da Tilápia, que é parte integrante do plano de ação do Departamento de Pesca e Aqüicultura do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, fez investimentos na ordem de aproximadamente R\$ 5.700.000,00 no ano de 2000 e de R\$ 81.000.000,00 no ano de 2003 provenientes de recursos públicos e setores privados (IBAMA, 2004).

Duas perspectivas servem como justificativa desses investimentos voltados para o crescimento da piscicultura e que precisam ser observadas. A primeira diz respeito à produção do pescado voltado para a promoção da qualidade alimentar dos consumidores, visto que, se trata de um alimento com alto valor nutritivo. E a segunda, visa a geração de divisas para o país no que diz respeito à exportação desse pescado e seus produtos e subprodutos, por exemplo, o couro. Tais perspectivas promoveram a introdução de espécies de peixes que possuem esses potenciais, sendo que a espécie tilápia-do-nilo, que foi introduzida no país em 1971, é, na atualidade, a espécie de água doce mais cultivada no país (Ibama, 2004).

A tilápia ocupa um lugar de destaque no que diz respeito à produção de pescado em tanques-rede. Isso se deve ao fato desse animal ser muito resistente ao transporte e manuseio, de fácil adaptação a diversos tipos de rações, de rápido crescimento e bastante resistente à baixas concentrações de oxigênio dissolvido, além de possuir uma carne saborosa (Freitas & Gurgel, 1984).

Essa espécie de pescado apresenta uma boa aceitação por parte dos consumidores e é comercializada na forma de filés congelados ou resfriados com preços competitivos em relação à outras espécies comercializadas (Siqueira, 2001). Além disso, a tilápia-do-nilo é considerada uma espécie “magra”, isto é, possui um percentual de gordura de apenas 2,09%, e essa característica favorece o processo de secagem e salga dos filés (Huet, 1973).

Esse animal pode ser cultivado em uma grande variedade de ambientes que vão desde tanques fertilizados a tanques com contínua renovação de água ou tanques-rede (Lovishin & Cyrino, 1998). Em 1996, a produção de tilápias no Brasil foi de 10.000 toneladas, aumentando para 75.000 ton. em 2002 e com uma produção estimada em 182.000 toneladas de pescado em 2010 (Fitzsimmons, 2000).

Diante desse contexto, é possível admitir que o processo de crescimento da aquicultura no Brasil é uma realidade, no entanto, a tendência é que esse processo cause vários impactos ambientais, já que o papel ecológico dos peixes, além dos padrões de predação podem ter conseqüências importantes para a estrutura e funcionamento do ecossistema em que esses animais estão inseridos (Rocha & Roche, 2005).

Um estudo feito por Gomes (2005) demonstrou que, em mesocosmos experimentais a presença de tilápias mais a sua dieta alteraram as características físicas, químicas e biológicas da água desse mesocosmos, provocando um aumento na concentração de nutrientes (fósforo e nitrogênio) que, por conseguinte propiciaram o crescimento de cianobactérias. Costa *et al.* (2007) em um levantamento da presença de cianobactérias e cianotoxinas em pesque-pague do estado do Rio de Janeiro concluíram que dos 30 estabelecimentos selecionados, 10 continham a presença de cianobactérias. Amostras de peixes (tilápias) foram analisadas e a concentração de microcistinas no músculo variou de 0,05 a 0,23 µg/Kg. Galvão *et al.* (2007) em um estudo feito em um pesque-pague do interior do Estado de São Paulo, detectaram a presença de saxitoxinas em tilápias cultivadas naquele local, o que configura sérios riscos à saúde pública.

O tipo de alimentação de cada peixe pode ser classificado com base na natureza dos itens ingeridos (carnívoria, omnívoria, planctívoria, herbívoria, detritívoria, entre outros). Com base no modo de alimentação, os peixes fitoplanctívoros têm uma fundamental

importância no que diz respeito ao consumo humano, pois são esses animais que ingerem diretamente o fitoplâncton e conseqüentemente as cianotoxinas, no caso das cianobactérias.

No caso dos peixes ciclídeos (tilápias, por exemplo), estudos demonstram que a presença de algumas adaptações à herbivoria, dá vantagens no que diz respeito à digestão de cianobactérias, como por exemplo: tubo digestório bastante alongado com maior superfície de absorção e pH do trato gastrointestinal de neutro à levemente alcalino (Fischer & Dietrich, 2000; Carbis *et al.*, 1997).

Alguns efeitos de cianotoxinas em peixes já foram descritos por Malbrouck & Kestemont (2006) Por exemplo, durante a fase embrionária, exposições à essa toxina podem causar inibição do desenvolvimento desse embrião, diminuição na taxa de sobrevivência e taxa de crescimento, além de efeitos de má-formação observados com técnicas histopatológicas (anormalidades na cabeça, no saco vitelínico, no corpo e na cauda, alterações ultra-estruturais em hepatócitos e células cardíacas). Nas fases juvenil e adulta, experimentos em campo e em condições de laboratório demonstraram que a ingestão de microcistinas afeta padrões de crescimento e osmoregulação, aumenta a atividade enzimática do fígado, modifica o comportamento animal, além de causar diversos danos histopatológicos nos rins, fígado, coração, guelras e intestino.

Na realidade brasileira, vem sendo observado, na última década, um grande aumento na ocorrência de espécies *Cylindrospermopsis raciborskii* em diferentes regiões do país, de acordo com que demonstram alguns estudos, como o de Bouvy *et al.*(1999); Branco & Senna (1994); Huszar *et al.* (2000); Jardim *et al.*(1999); Kómarkóva *et al.* (1999). Muitas vezes essa espécie representa 100% da biomassa algal total em alguns ecossistemas. Essa situação se deve, principalmente, ao fato de que os reservatórios e

açudes brasileiros possuem altos valores de temperatura, pH, salinidade e condutividade, além de altas taxas de nitrogênio inorgânico dissolvido (Gomes *et al.*, 2007).

Vários trabalhos já foram realizados com relação a bioacumulação de cianotoxinas em animais que podem servir para consumo humano e de outros componentes da cadeia trófica, bem como suas conseqüências para essas espécies expostas (Magalhães *et al.*, 2001; Van Buynder *et al.*, 2001; Magalhães *et al.*, 2003; Malbrouck *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2003; Yokoyama & Park, 2003; Jang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Saker *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2004; Xie, 2004; Cazenave *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Chen & Xie, 2005a; Chen & Xie, 2005b; Kankaanpaa *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005; Sapia *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2006; White *et al.*, 2006;). Saker & Eagleshan (1999) estudaram o acúmulo da cilindrospermopsina em tecidos de lagosta, onde as maiores concentrações de CYN foram encontradas no hepatopancreas com 4,3 µg CYN/g de tecido liofilizado, seguido de 0,9 µg CYN/g de tecido muscular liofilizado. Saker *et al.* (2004), estudaram o acúmulo e depuração de CYN em mexilhão observando que ao final de duas semanas (período de acúmulo) a concentração de CY foi maior na hemolinfa (68,1 %), e ao final da fase de depuração (duas semanas) 50% da toxina ainda permanecia nos tecidos do animal.

Ainda assim, pouco se sabe sobre o processo de acúmulo de cilindrospermopsina (Saker *et al.*, 1999; Saker *et al.*, 2004; Metcalf *et al.*, 2002; White *et al.*, 2006; Nogueira *et al.* 2006; White *et al.*, 2007; Kinnear, *et al.*, 2007), principalmente nos tecidos de peixes, seja em condições naturais ou em laboratório.

Nesta perspectiva, objetivou-se verificar o acúmulo e depuração de cilindrospermopsina em tecido muscular de tilápias submetidos à dieta com uma cepa tóxica de *Cylindrospermopsis raciborskii*, examinando também o efeito desta cepa tóxica,

bem como de sua toxina, no crescimento deste animal, contribuindo deste modo, para o conhecimento da dinâmica dessa toxina neste organismo aquático.

Os experimentos e análise foram feitos no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O detalhamento da coleta, material e métodos, resultados e discussão dos mesmos compõem itens à parte desta dissertação.

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1. Geral:**

Tendo em vista todas as informações anteriores, esse trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento dos efeitos da alimentação de tilápias (*Oreochromis niloticus*) com células de *Cylindrospermopsis raciborskii* produtora de cilindrospermopsina. E para isso teve os seguintes objetivos específicos:

### **2.2. Específicos:**

2.2.1 Verificar o processo de acúmulo e depuração de cilindrospermopsina em tecido muscular e vísceras de tilápias (*Oreochromis niloticus*), submetidas a uma dieta com cultura de células e extrato celular de *C. raciborskii* produtora de cilindrospermopsina, simulando duas situações ecológicas distintas:

- um ambiente após a senescência de uma floração (lise celular) e com outra fonte de alimento
- e um ambiente com floração e com outra fonte de alimento;

2.2.2 Verificar o efeito destas células, bem como de sua toxina, no processo de crescimento desses animais.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS:**

Para o desenvolvimento desse trabalho foram realizados três experimentos, todos no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCFo.) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

No presente trabalho, algumas etapas foram comuns aos três experimentos realizados:

1. O cultivo de células da cepa *Cylindrospermopsis raciborskii* (cepa CYP011K);
2. A quantificação de toxina produzida por esta cepa produtora de cilindrospermopsina por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), bem como por testes de imunoensaio enzimático do tipo ELISA;
3. A coleta e manutenção dos peixes da espécie *Oreochromis niloticus*.
4. A quantificação da toxina, tanto no início quanto no final dos experimentos, no alimento oferecido aos animais (controle e experimental) para verificação e confirmação da concentração de toxina presente através da técnica de ELISA;

Como etapa final, em todos os experimentos, foram realizadas as extrações e análises dos tecidos musculares e vísceras de todos os animais para a verificação da possível presença desta toxina, essas análises foram realizadas através da técnica de ELISA.

Todos estes procedimentos estão descritos nos itens a seguir.

### **3.1 – Cultivo da cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii*:**

A cepa escolhida para ser utilizada nos experimentos foi a CYP011K, produtora de cilindrospermopsina, e foi gentilmente cedida pelo Dr. Andrew Humpage “Australian Water Quality Center” - Austrália. Esta cepa foi cultivada em meio ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964), pH 8,0, sob temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ , intensidade luminosa de  $56 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  medida a partir de sensor quântico (QSL-100, Box – Biospherical Instruments Inc.), com fotoperíodo de 12 horas e aeração contínua. Os inóculos para o início dos cultivos foram sempre equivalentes a 10% do volume das culturas.

### **3.2 – Extração e Análise de Cilindrospermopsina da Cepa CYP011K:**

Para a quantificação de cilindrospermopsina, a cepa foi cultivada em grandes volumes (nove litros) nas condições citadas anteriormente. O crescimento da cultura foi acompanhado através da contagem de células em microscópio óptico, em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, na qual estimou-se o número de células por mililitro. Ao chegar a uma concentração de aproximadamente 10.000.000 células/mL, a cultura foi desmontada, congelada a  $-50^\circ \text{C}$  (Shell Freezer – Labconco) e liofilizada (Freezone 6 - Labconco). O material seco foi extraído de acordo com a metodologia proposta por Welker *et al.*, (2002), segundo a qual o material liofilizado foi ressuspensão em água ultra-pura (Milli-Q) e agitado durante uma hora. O material foi centrifugado (Eppendorf 5403 – 40.000 g por 30 minutos), o sobrenadante recolhido e filtrado em filtros de celulose regenerada (45  $\mu\text{m}$  de porosidade e 13 mm de diâmetro) para posterior análise em CLAE (Shimadzu), segundo a

metodologia proposta por Welker *et al.*(2002), cujo os procedimentos estão sistematizados nas Tabela I e II, respectivamente.

Tabela I – Condições cromatográficas segundo Welker *et al.*,(2002):

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição</b>
Fluxo	1 mL/min
Volume injetado (loop)	100 µL
Fase Móvel	Gradiente de 0-50% Metanol + TFA (0,05%) e água ultra-pura
Detecção	262 nm
Tempo	20 min. em gradiente e 15 minutos em isocrático

Tabela. II – Componentes do sistema de CLAE (Shimadzu):

<b>Componentes</b>	<b>Descrição</b>
Detector	UV/VIS – Detector de diiodo – SPDM 10 Avp
Bomba	LC-10AT VP
Loop	100 µL
Coluna	Lichrospher 100 – RP (reverse phase) – 18 (125x4 mm), 5 µm
Software	Class VP

### **3.3 – Coleta e manutenção dos animais em laboratório:**

Os peixes utilizados nos experimentos foram gentilmente cedidos por Furnas Centrais Elétricas S.A. e coletados na Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Furnas, localizada no município de Furnas – Minas Gerais. Da estação até o laboratório, os animais

foram transportados em sacos plásticos, com água do próprio tanque, na proporção de 2/3 de água e 1/3 de ar, totalizando, em média, 10 peixes por saco, acondicionados em caixas de isopor. No laboratório, os animais foram colocados em aquários com aproximadamente 30 litros de água da torneira, previamente tratada com uma gota de hipossulfito de sódio por litro de água para que houvesse completa remoção do cloro residual presente naquela água. A aeração foi contínua e a temperatura do ar mantida em aproximadamente de  $23^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C. Os peixes permaneceram nestes aquários por, no mínimo, uma semana para a aclimação antes do início dos experimentos.

Os aquários foram cobertos com papel opaco para que os animais não sofressem nenhum tipo de estresse visual, e a água desses aquários foi trocada a cada 5 dias. Nessa fase, os animais eram alimentados com ração comercial, que foi utilizada em todos os experimentos, inclusive no preparo dos alimentos tóxicos e não-tóxicos. Partiu-se da premissa de que esta ração não continha cilindropermopsina, visto que na sua composição não há qualquer informação do fabricante quanto ao uso de produtos com origem em cianobactérias, no entanto foi feita a análise deste produto confirmando-se a ausência de cilindropermopsina.

Para a realização do primeiro e terceiro experimentos foram coletados animais pequenos, com aproximadamente cinco centímetros de comprimento, considerados juvenis e, portanto, imaturos sexualmente (Fryer & Iles, 1973). Para o segundo experimento foram coletados animais maiores, entre oito e doze centímetros, ainda assim, imaturos sexualmente e, portanto, também juvenis.

### **3.4 – Estabelecimento do método para fornecimento de cianobactéria tóxica e extrato celular tóxico aos animais expostos:**

Após algumas pesquisas e testes preliminares, optou-se por preparar o alimento tóxico para os peixes tomando como referência a metodologia estabelecida por Soares *et al.*, (2004). E com base nesse método foram adotados os seguintes procedimentos:

1. Utilizou-se 0,8 gramas de ágar dissolvidos em 34 mL de água deionizada aquecendo-se até a temperatura de 86° C, para que houvesse a polimerização do mesmo;
2. Após essa dissolução, esperou-se a redução da temperatura até 50° C para então acrescentar à solução 1,2 mL de extrato celular (Welker *et al.* 2002) ou cultura de células de *C. raciborskii* na concentração desejada;
3. Em ato contínuo, acrescentou-se 4,0 gramas de ração comercial (correspondente a 10% do alimento). Tal mistura, ao assumir uma consistência homogênea, foi colocada em recipientes para que pudessem ser resfriadas em geladeira.

O alimento não-tóxico foi feito da mesma maneira, entretanto, não foi utilizado extrato nem células tóxicas para o seu preparo.

Após vários testes para o estabelecimento da quantidade de alimento que para cada animal poderia ingerir por dia, Soares *et al.*, (2004) chegaram a conclusão de que a cada cinco centímetros de animal deveria ser oferecido 1 grama de alimento por dia. No entanto, após alguns testes preliminares para os experimentos que serão apresentados a seguir, observou-se que havia sobra de alimento no fundo do aquário. De acordo com as nossas observação, verificou-se que os peixes utilizados necessitavam de apenas 0,5 grama de

alimento por dia. Essa, então, foi a quantidade de alimento oferecido, em todos os experimentos, variando apenas a quantidade de toxina e de células nos mesmos.

### **3.5. Experimento 1: Acúmulo de cilindropermopsina em tecidos de *Oreochromis niloticus* exposta a extrato tóxico.**

#### **3.5.1 – Experimento 1A - com duração de 15 dias:**

Para a realização deste experimento, quarenta aquários, com aproximadamente três litros de água cada, foram montados, e à água destes foram adicionadas uma gota por litro de hipossulfito de sódio (anti-cloro) para remoção de todo cloro residual (24 horas). Todos que continham os peixes receberam aeração contínua e ficaram aclimatados, por uma semana, a uma temperatura do ar de aproximadamente  $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Em cada aquário foram colocados quatro peixes, com aproximadamente cinco centímetros de comprimento cada um. Vinte aquários foram selecionados para receber o alimento controle enquanto que os aquários restantes receberam o alimento tóxico, isto é, contendo extrato de *Cylindrospermopsis raciborskii* produtora de cilindropermopsina. Ambos foram preparados de acordo com o item 3.4, sendo que o alimento controle não recebeu nenhum tipo de extrato tóxico. O desenho experimental está mostrado na figura 3.

Para o preparo do alimento tóxico, foi feito um cultivo de nove litros da cepa CYP-011K de acordo com os procedimentos descritos no item 3.1. Ao alcançar a fase estacionária, foi feita a contagem de células, em microscópio óptico (Olympus BX50F4) utilizando câmara de Fuchs-Rosenthal e observou-se um número de  $1,5 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, a partir de então, a cultura foi desmontada para posterior congelamento e liofilização da

mesma. O material liofilizado passou pelo processo de extração conforme descrito no item 3.2.

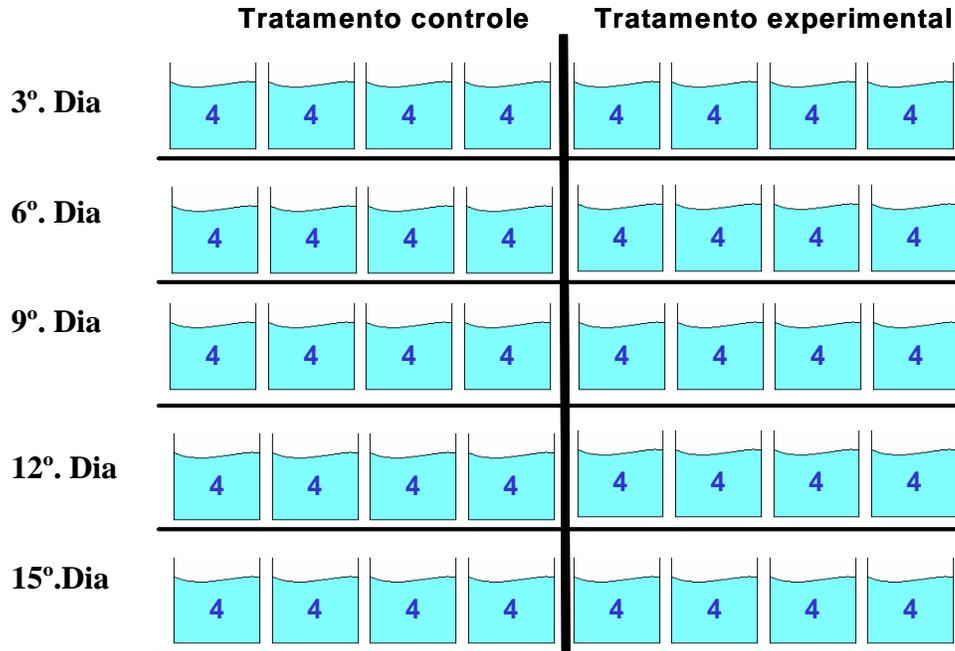


Figura 3: Representação esquemática dos aquários para realização do experimento 1A com duração de 15 dias.

Nesse experimento foi oferecido por dia a cada peixe uma concentração de 0,31 µg de CYN por grama de alimento, sendo que cada peixe comia apenas 0,5 grama de alimento por dia (descrito no item 3.4), portanto, aproximadamente, 0,15 µg de CYN. Tal valor foi equivalente à  $1,5 \times 10^7$  células.

Este experimento foi realizado durante um período de 15 dias, sendo que os aquários controle receberam o alimento não-tóxico e os aquários experimentais receberam o alimento tóxico diariamente.

A cada três dias, quatro aquários controle e quatro experimentais foram desmontados e os animais foram coletados através de uma pequena rede de nylon (puçá). Após esse procedimento, os animais foram pesados e medidos (comprimento total) para se observar efeitos no crescimento do animal, e, posteriormente, mortos por resfriamento em

freezer (-10° C). Em seguida os animais foram dissecados com auxílio de bisturi para separação das vísceras e quantidade máxima possível de músculo. Músculos e vísceras foram pesados, separadamente, e colocados em beckers separados (músculos) e tubos do tipo Falcon (vísceras).

As vísceras e músculos dos animais que estavam no mesmo aquário foram reunidas e colocadas no mesmo recipiente para que houvesse massa suficiente (amostra composta). Em seguida todos foram submetidos ao processo de extração, procedimento que será descrito posteriormente, e analisados de acordo com a técnica de ELISA.

### 3.5.2. Experimento 1B - com duração de 30 dias:

Este experimento foi semelhante ao anterior, pois utilizou a mesma metodologia diferenciando-se apenas no número de aquários utilizados (vinte), na duração do experimento (trinta dias) e no número de peixes utilizados em cada aquário (três peixes por aquário com cinco centímetros cada) conforme demonstrado na figura 4.

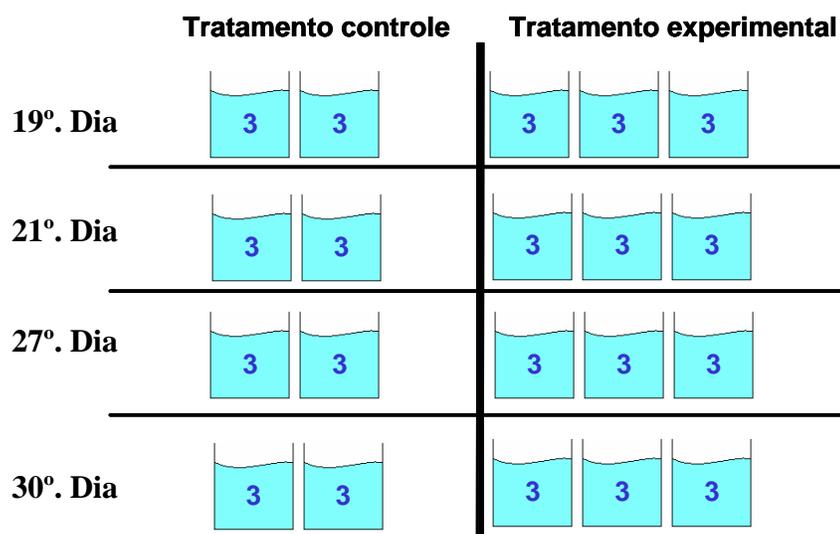


Figura 4: Representação esquemática dos aquários para realização do experimento com duração de 30 dias.

O cultivo da cepa, as condições utilizadas na aclimação e o modo de alimentação foram os mesmos do experimento relatado no item 3.5.1. Para isso, oito aquários foram selecionados para receberem o alimento controle, e doze aquários receberam o alimento tóxico, como uma concentração de cilindropermopsina de  $0,35 \mu\text{g CYN} \cdot \text{g}^{-1}$  de alimento, sendo que cada animal comia 0,5 grama de alimento ( $0,175 \mu\text{g CYN} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

Os peixes foram alimentados durante quinze dias consecutivos, e após esse período, dois aquários controle e três aquários experimentais foram desmontados a cada quatro dias, para que fosse realizada a biometria e retirada dos tecidos dos animais neles contidos. Após essa etapa, os mesmos foram mortos por resfriamento e armazenados para posterior dissecação de suas vísceras e músculos, processos já explicados no item anterior. O método de extração e análise por ELISA foi idêntico ao experimento anterior e será explanado posteriormente.

### **3.6. Experimento 2: Acúmulo e depuração de cilindropermopsina em tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas ao extrato tóxico.**

Para realização desse experimento, trinta e seis aquários com aproximadamente 3 litros de água foram montados de acordo com a figura 5. Cada aquário recebeu um peixe com aproximadamente dez centímetros de comprimento, isto é, o dobro do tamanho dos peixes do experimento anterior, no entanto considerados sexualmente imaturos.

Dezoito aquários foram selecionados para receberem o alimento controle e os aquários restantes, foram selecionados para receberem o alimento contendo extrato tóxico de células de *Cylindropermopsis raciborskii* produtora de cilindropermopsina. O

alimento tóxico foi preparado como descrito no item 3.4 deste capítulo. O cultivo da cepa também foi feito de acordo com o experimento relatado no item 3.5.

Após a extração e análise do alimento tóxico, verificou-se uma concentração de 0,80  $\mu\text{g CYN.g}^{-1}$  de alimento, no entanto, cada animal só ingeria 0,5 gramas de alimento, portanto cada animal recebeu a concentração de 0,4 $\mu\text{g CYN}$  por dia.

Esse experimento teve a duração de vinte e dois dias e foi dividido em duas fases: a primeira com duração de doze dias e foi chamada fase de acúmulo de cilindrospermopsina e a segunda fase, denominada de fase de depuração, que teve duração de 10 dias.

Durante a fase de acúmulo, os peixes experimentais receberam o alimento tóxico. Houve duas coletas nesse período, uma no terceiro dia (três aquários controle e três aquários experimentais) e outra no décimo segundo dia (três aquários controle e três aquários experimentais). Os animais foram pesados, medidos e mortos por resfriamento. Os tecidos (vísceras e músculo) foram extraídos e analisados. Essas coletas foram realizadas com o objetivo de verificar e/ou confirmar o acúmulo da toxina nas vísceras e músculo dos peixes expostos ao extrato tóxico.

Na segunda fase, denominada de fase de depuração de cilindrospermopsina, todos os animais, experimentais e controle, foram alimentados com alimento não-tóxico (0,5 gramas por dia) até o final do experimento. A cada três dias, três aquários controle e três aquários experimentais foram coletados. Também nessa fase, os animais foram pesados, medidos e mortos por resfriamento. Seus tecidos (vísceras e músculo) submetidos à extração e análise. Além disso, nesses mesmos dias, 500 mL da água dos aquários bem como as fezes, nos seus respectivos dias, foram coletadas e utilizadas para análise da presença de cilindrospermopsina. Durante esse período a água não foi trocada.

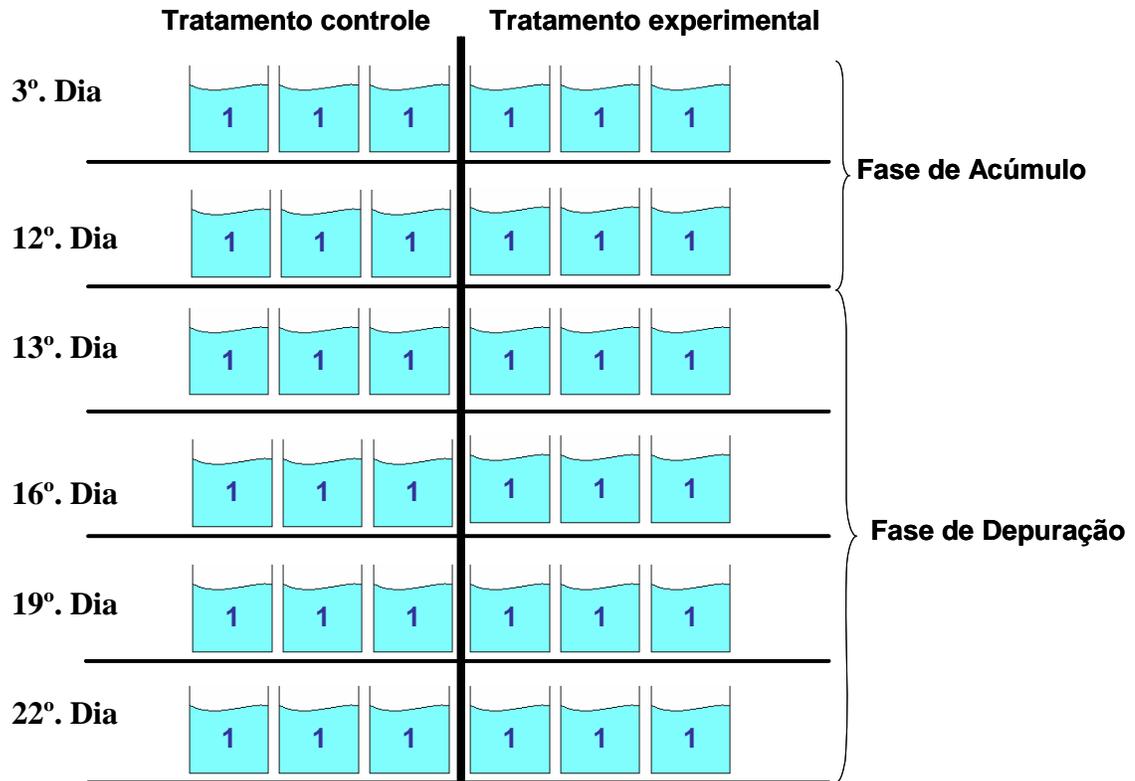


Figura 5: Representação esquemática dos aquários para realização do experimento de depuração de CYN.

### 3.7. Experimento 3: Acúmulo de cilindrospermopsina em tecidos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) exposta a células íntegras de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Para a realização deste experimento, assim como no experimento 1A, quarenta aquários, com aproximadamente três litros de água cada, foram montados, e à água destes foram adicionadas uma gota por litro de hipossulfito de sódio (anti-cloro) para remoção de todo cloro residual. Todos receberam aeração contínua e ficaram aclimatados, por uma semana, a uma temperatura de aproximadamente  $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Em cada aquário foram colocados quatro peixes, com aproximadamente cinco centímetros de comprimento cada um. Vinte aquários foram selecionados para receber o alimento controle enquanto que os

aquários restantes receberam o alimento tóxico, isto é, contendo células de *Cylindrospermopsis raciborskii* produtora de cilindrospermopsina. Ambos foram preparados de acordo com o item 3.4, sendo que o alimento controle não recebeu nenhum tipo de célula tóxica. O desenho experimental está evidenciado na figura 3 do item 3.5.1.

Para o preparo do alimento tóxico, foi feito um cultivo de três litros da cepa CYP-011K de acordo com os procedimentos descritos no item 3.1. Ao alcançar a fase estacionária, foi realizada a contagem de células, em microscópio óptico utilizando câmara de Fuchs-Rosenthal e observou-se um número de células de  $4,3 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, a partir de então, a cultura foi desmontada para que a mesma fosse centrifugada (35.000 g por 10 minutos) chegando à uma concentração de  $4,1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>. Essa cultura foi então preparada para servir como alimento tóxico, segundo o item 3.4 deste capítulo, e após a diluição, chegou a uma concentração de  $2,8 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> ( $5,4 \mu\text{g CYN.g}^{-1}$  de alimento), e esse alimento foi oferecido aos animais até o final do experimento.

Os processos de coleta, biometria, desenho experimental, dias de coleta e extração foram idênticos aos utilizados no item 3.5.1.

### **3.8 - Extração e análise de cilindrospermopsina.**

#### **3.8.1. Extração de cilindrospermopsina de víscera e tecido muscular de tilápias.**

O processo de extração das vísceras e tecido muscular dos animais controle e experimentais foi adaptado da metodologia de Saker *et al.*, (2004).

As vísceras e músculos foram coletados de acordo com os procedimentos descritos no item 3.5.1, e então foram pesados.

No experimento 1 (1A e 1B) e 3 foi adicionado ao músculo 2mL de água ultra-pura e no experimento 2 foram adicionados 4mL. As amostras desse tecido foram homogeneizadas com auxílio de um “mixer” (Tissuemiser System). Após esse processo foram adicionados 5 mL (experimento 1A, 1B e 3) e 10mL (experimento 2) de metanol 100% e utilizou-se novamente o “mixer” para homogeneização do tecido. O material obtido por meio desse processo foi colocado em um agitador magnético por um período de uma hora e, posteriormente, colocado na geladeira durante aproximadamente doze horas (“overnight”).

As vísceras sofreram processo semelhante ao tecido muscular, diferenciando-se no fato de que não foi colocada água para homogeneização, já que as mesmas naturalmente possuem uma fração aquosa maior que facilita a homogeneização com o “mixer”. Portanto, foram adicionados 5 mL (experimento 1A, 1B e 3) e 10mL (experimento 2) de metanol 100% e então homogeneizados.

O material homogeneizado tanto das vísceras quanto do tecido muscular foi centrifugado (Eppendorf 5403 – 40.000 g por 30 minutos) e o sobrenadante foi levado à evaporação até secar. Esse material foi ressuspensão em 2 mL de água ultra-pura agitado por uma hora e novamente centrifugado para retirada do excesso de material particulado. O sobrenadante foi então filtrado em filtros de celulose regenerada (0,45 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro) e congelados para posterior análise por técnica de ELISA.

### **3.8.2. Extração de cilindropermopsina das fezes e água do experimento 2.**

As coletas de fezes e de água foram realizadas concomitantemente aos dias de coletas dos animais, somente no experimento 2, com o intuito de verificar a possível depuração da toxina.

Aproximadamente 500 mL de água dos aquários coletados foram congeladas a -50° C (Shell Freeer – Labconco) e liofilizadas (Freezone 6 - Labconco). Ao material liofilizado foram adicionados 5 mL de água ultra-pura e agitado por uma hora. O extrato obtido foi centrifugado (40.000 g por 30 minutos), filtrado em filtros de celulose regenerada (0,45 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro) e congelado para posterior análise por ELISA.

Para a coleta das fezes, o restante da água dos aquários foi decantada e coletada por meio do processo de sifonamento. O material foi centrifugado (15.000 g por 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O “pellet” (fezes) foi pesado, congelado e liofilizado. Esse material foi submetido à extração com 3 mL de metanol 100% e agitado por uma hora, após esse processo foi levado a evaporação. O material seco foi então ressuspense em 10 mL de água ultra-pura, agitado por uma hora e centrifugado. Assim como os tecidos e a água, este material foi filtrado em filtros de celulose regenerada (0,45 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro) e congelado para posterior análise por ELISA.

### **3.8.3. Extração do Alimento.**

O alimento foi extraído no início e no final de cada experimento para confirmação da quantidade de toxina. Para isso, utilizou-se 2 gramas de alimento, ao qual foram adicionados 5 mL de água ultra-pura. O material foi agitado por 1 hora, centrifugado a 40.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, filtrado (0,45 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro) e analisado por ELISA.

### **3.9. Análise por Imunoensaio enzimático do tipo ELISA:**

O método utilizado para a análise de cilindropermopsina escolhido foi o chamado ELISA competitivo direto. Nesses experimentos foram utilizados “kits” de ELISA específicos para cilindropermopsina (Beacon<sup>®</sup> Kit).

Seu princípio baseia-se na identificação de um antígeno, no caso a toxina cilindropermopsina, através de um anticorpo específico em solução. Uma placa com anticorpos secundários Anti-IgG é incubada com a amostra contendo o antígeno com um conjugado composto de antígeno ligado a uma enzima (a peroxidase) e anticorpos específicos Anti-CYN. O antígeno ligado a enzima e o antígeno não ligado (CYN, nesse caso) competem pela ligação com os anticorpos específicos. Este, por sua vez, se ligam aos anticorpos da placa. Após a reação, a placa é lavada e somente o que foi ligado aos anticorpos secundários permanecem. O substrato da enzima é adicionado e essa reação, substrato-enzima, é colorimétrica. Toda cilindropermopsina que existir na amostra analisada se ligará ao anticorpo, e o anticorpo que ficar livre se ligará ao conjugado CYN-enzima. Logo, o resultado é expresso de acordo com a absorbância das amostras. Sendo a quantificação feita através da comparação das absorbâncias das amostras com a dos padrões de CYN utilizados nas curvas de calibração de cada “kit”, sendo a relação cor/concentração de toxina inversamente proporcional.

As amostras que ficaram fora da faixa da curva de calibração foram diluídas com água ultra-pura para que fosse feita a correta quantificação das mesmas. Além disso, os

valores de falso-positivo encontrados nas amostras dos animais controle, que também foram analisados, foram descontados dos valores encontrados nos animais experimentais. É importante ressaltar que a quantidade de toxina extraída dos tecidos corresponde às toxinas livres, pois se essas tiverem conjugadas a algum tipo de proteína detoxificante, as mesmas não são identificadas pelos anticorpos.

### **3.10. Análise estatística dos dados de peso e comprimento das tilápias:**

As análises foram feitas através do programa de software STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc).

Com intuito de se verificar a normalidade e a homogenia de variâncias dos dados, foram aplicados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levine, respectivamente. Posteriormente, foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) para cada um dos três “modelos” testados. Em todos os três modelos a variável independente foi “dia ou concentração”, já as variáveis dependentes foram distintas entre os modelos sendo estas peso, comprimento e relação peso/comprimento. O teste *post hoc* de Turkey foi aplicado para verificar a diferença significativa entre os dias. O mesmo foi feito para variável “concentração de toxina”. Para todos os testes foram utilizados níveis de significância de 5%. Também foi feito o Teste T para verificar as diferenças entre as médias nos respectivos dias entre os animais expostos e não expostos.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

##### **4.1. Quantidade de alimento oferecida aos animais:**

A metodologia proposta por Soares *et al.*(2004) para estabelecer a quantidade de alimento oferecida a cada animal ao longo do experimento foi a mesma utilizada nessa pesquisa. No entanto, em testes realizados antes do início efetivo dos experimentos, pôde-se observar que os animais não ingeriam todo o alimento oferecido (1g), sendo assim cada animal passou a receber metade dessa quantidade (0,5 gramas) de alimento por dia.

No experimento 2, os animais tinham aproximadamente o dobro do tamanho dos animais dos outros experimentos, e por isso achamos que estes poderiam ingerir maiores quantidades de alimento, porém isso não foi constatado, pois ao oferecermos 1 grama de alimento aos animais, estes não ingeriram todo o alimento, então optamos em oferecer a mesma quantidade dos experimentos anteriores (0,5 g). Esse fato não pode ser muito bem explicado, no entanto alguns fatores como, por exemplo, o estresse causado pelo ambiente pode ter influenciado essa rejeição. Outro aspecto, porém pouco provável, seria a presença de agar nos alimentos, porém nos outros pré-experimentos não notou-se rejeição, por parte dos animais, quanto a ingestão desse veículo.

##### **4.2. Estabelecimento do protocolo de extração:**

Em testes realizados antes do início dos experimentos foi verificado a maneira mais eficiente no que diz respeito a extração da toxina nos diferentes tecidos. Saker *et al.* (1999) liofilizaram os tecidos de suas amostras e extraíram a toxina (cilindrospermopsina) com

água destilada, como solvente, e sonicação. Tais amostras foram analisadas por CLAE segundo a metodologia de Eaglesham *et al.* (1999).

Esse mesmo método de extração e análise foi testado, no entanto os resultados ficaram abaixo do limite de detecção do aparelho. A partir desses resultados resolvemos testar a extração com metanol 100% e ultrasonicação utilizada por Saker *et al.* (2004). Esses autores também liofilizaram o material antes de extraí-lo. Ao testar essa metodologia também não detectamos a presença da toxina.

Como os resultados foram sempre abaixo do limite de detecção, resolvemos utilizar uma metodologia de análise com menor limite de detecção (análise por ELISA com limite de detecção de 0,1µg de CYN) e para tanto, a metodologia de extração de Saker *et al.* (1999) escolhida, também foi modificada, como referido anteriormente (metodologia descrita no item 3.9.1), obtendo-se resultados positivos.

#### **4.3 - Semelhanças entre os experimentos apresentados e o meio ambiente.**

O primeiro experimento (1A e 1B) representa uma situação onde as tilápias estariam expostas a uma floração em fase senescente, onde as células estariam rompidas e a toxina estaria mais disponível para a absorção do animal, no entanto, o extrato tóxico ao qual os animais foram expostos não contém tão somente cilindrospermopsina, mas sim outras moléculas e substâncias que podem agir sinergisticamente e potencializar o próprio efeito da toxina, já que há trabalhos na literatura evidenciando que o extrato celular contendo cilindrospermopsina é mais tóxico do que a toxina purificada (Humpage & Falconer, 2003).

O segundo experimento denota um ambiente cuja floração tóxica estaria, também, em fase senescente, no entanto, a fase de depuração desse experimento demonstra uma

situação em que a floração de *Cylindrospermopsis raciborskii* deixa de ocorrer e, portanto o animal teria possibilidade de não ingerir a toxina e possivelmente depurar o que havia ingerido.

O terceiro experimento representa uma situação em que os animais estão expostos a uma floração tóxica dominante de *Cylindrospermopsis raciborskii* e, portanto, ingerindo suas células como uma das fontes de alimento.

Além disso, visou-se verificar uma possível influência da toxina no crescimento (peso e comprimento) dos animais expostos em ambas as situações.

#### **4.4. - Experimento 1A**

##### **4.4.1 - Análise dos dados de peso e comprimento**

Todos os animais foram medidos e pesados no início do experimento e nos seus respectivos dias de coleta. As figuras 6 (A e B) e 7 (A e B) apresentam as variações de crescimento das tilápias ao longo do tempo de exposição.

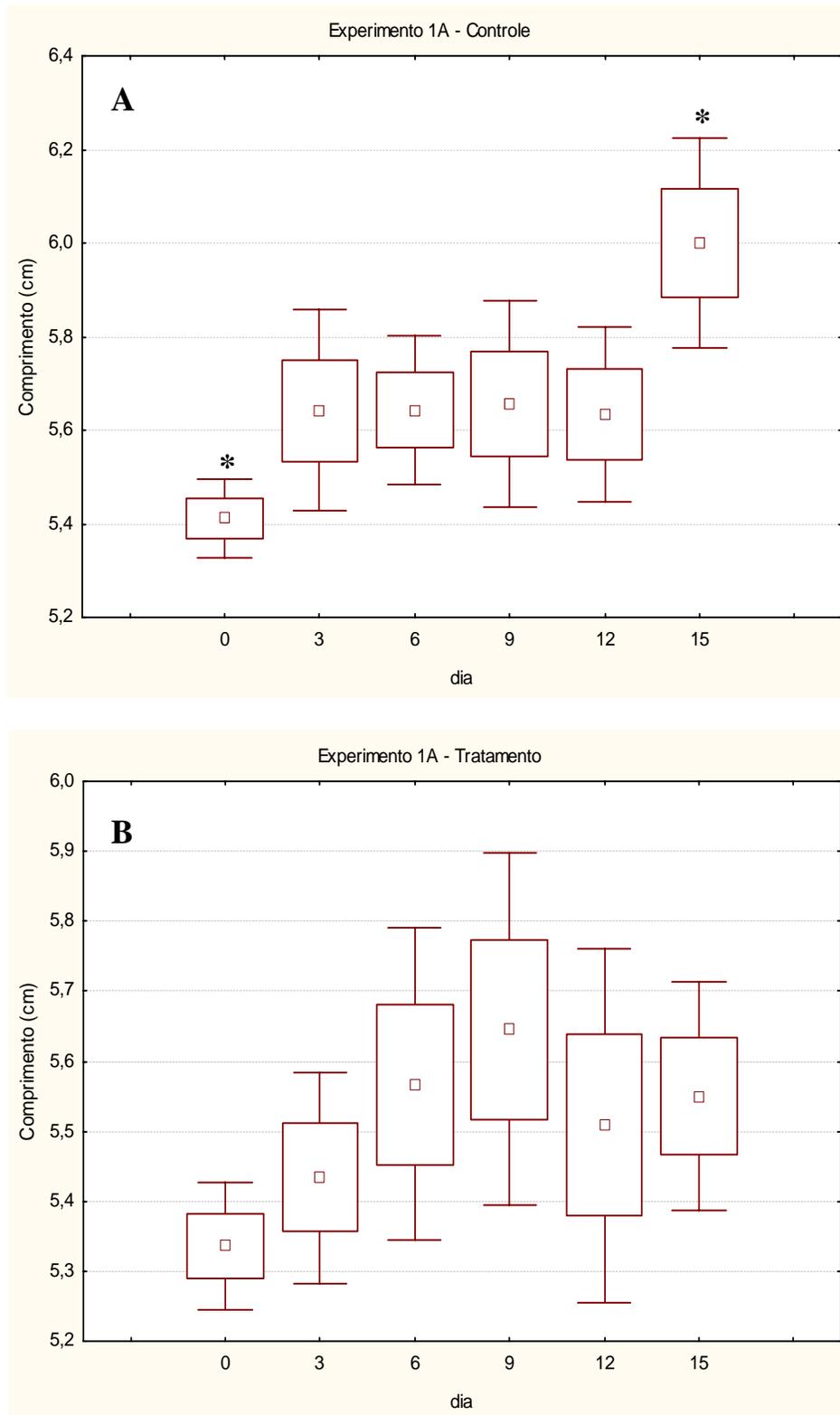


Figura 6: A) Variação do comprimento nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 1A, durante 15 dias de exposição à extrato tóxico (0,15 µg CYN por peixe). O asterisco indica que houve diferença significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

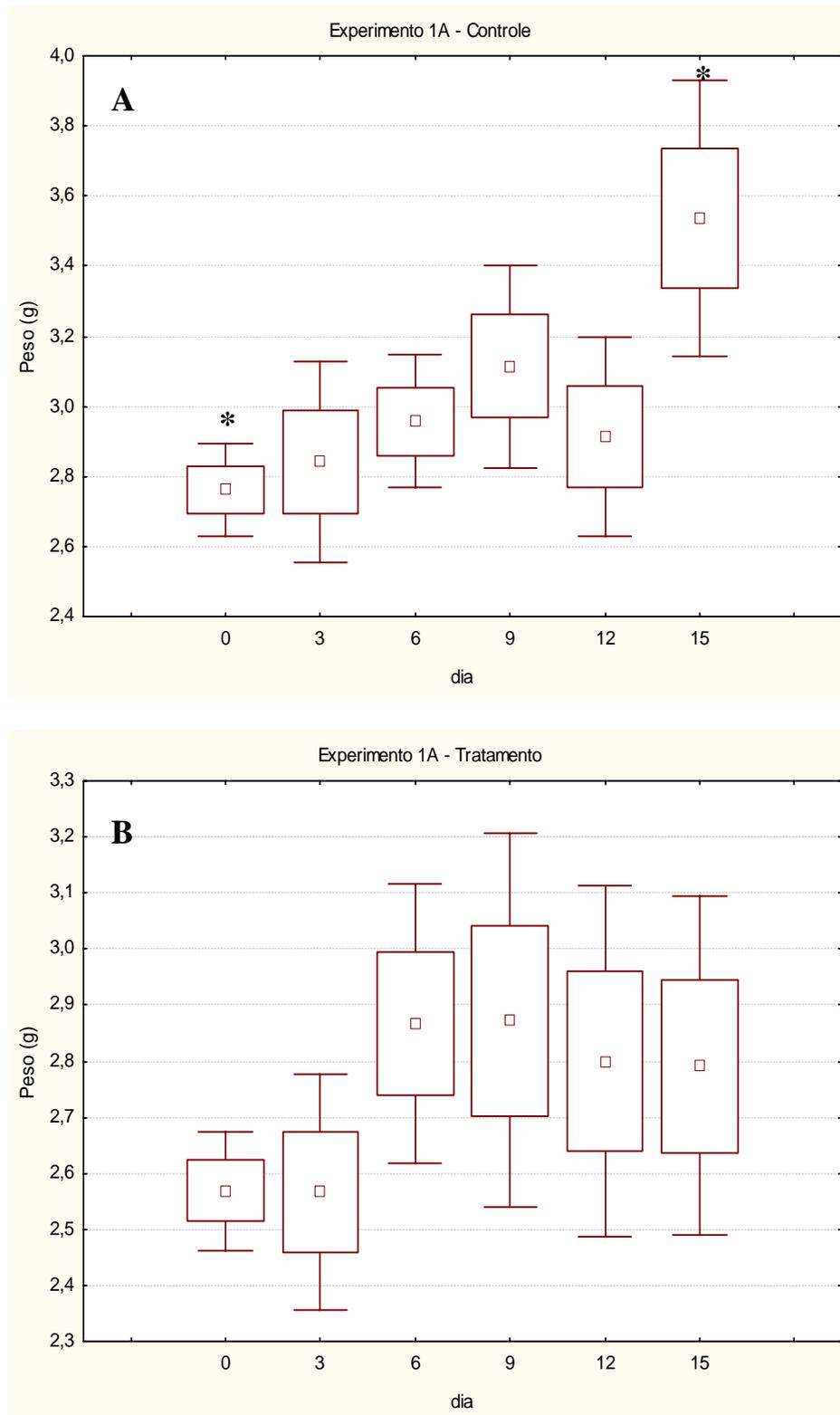


Figura 7: A) Variação do peso nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 1A, durante 15 dias de exposição à extrato tóxico (0,15  $\mu\text{g}$  CYN por peixe). O asterisco indica que houve diferença significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

Testes estatísticos (análise de variância – ANOVA) dos valores de peso e comprimento indicaram que houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente nos animais não-expostos (controle).

Para verificar entre quais dias houve essa diferença, foi realizado um teste de Tukey ao nível de significância de 5%, então, observou-se que houve diferença significativa apenas entre os valores iniciais e finais de peso e comprimento dos animais controle, indicando que houve uma provável influência da cilindrospermopsina no crescimento dos animais expostos à toxina, já que não houve diferença significativa entre os valores de peso e comprimento desses animais ao longo do tempo de exposição à mesma.

Através do teste T, foi verificado que somente no último dia de exposição (15º dia) houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de peso e comprimento comparando-se as médias dos animais expostos com os animais não expostos.

#### **4.4.2 – Relação peso:comprimento.**

Para complementar os resultados obtidos com os dados morfométricos, foi feita uma relação peso:comprimento entre os animais no início do experimento e em seus respectivos dias de coleta. Os gráficos estão apresentados na figura 8 (A e B).

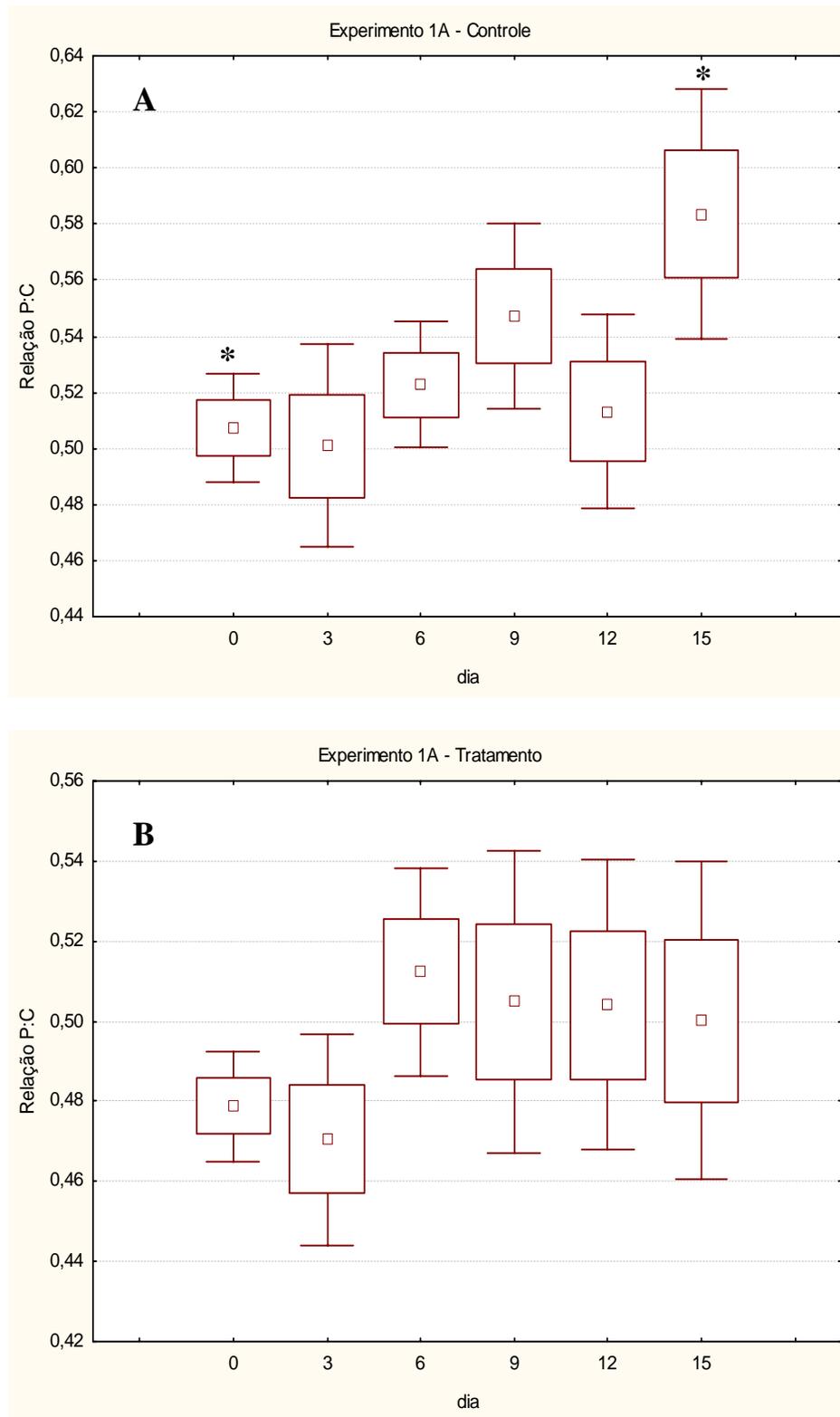


Figura 8: A)Variação da relação peso:comprimento nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 1A, durante 15 dias de exposição à extrato tóxico (0,15  $\mu\text{g}$  CYN por peixe). O asterisco indica que houve diferença significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

Testes estatísticos (análise de variância – ANOVA) dos valores da relação peso:comprimento indicaram que houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente nos peixes não-expostos a toxina (controles). Para verificar entre quais dias amostrais dos animais não-expostos houve essa diferença, foi realizada um teste de Tukey ao nível de significância de 5%. O resultado indicou que a diferença ocorreu entre o dia inicial e o dia final de coleta.

## **4.5 - Experimento 1B**

### **4.5.1 - Análise dos dados de peso e comprimento**

Todos os animais foram medidos e pesados no início do experimento e nos seus respectivos dias de coleta. As figuras 9 (A e B) e 10 (A e B) apresentam as variações de crescimento das tilápias ao longo do tempo de exposição.

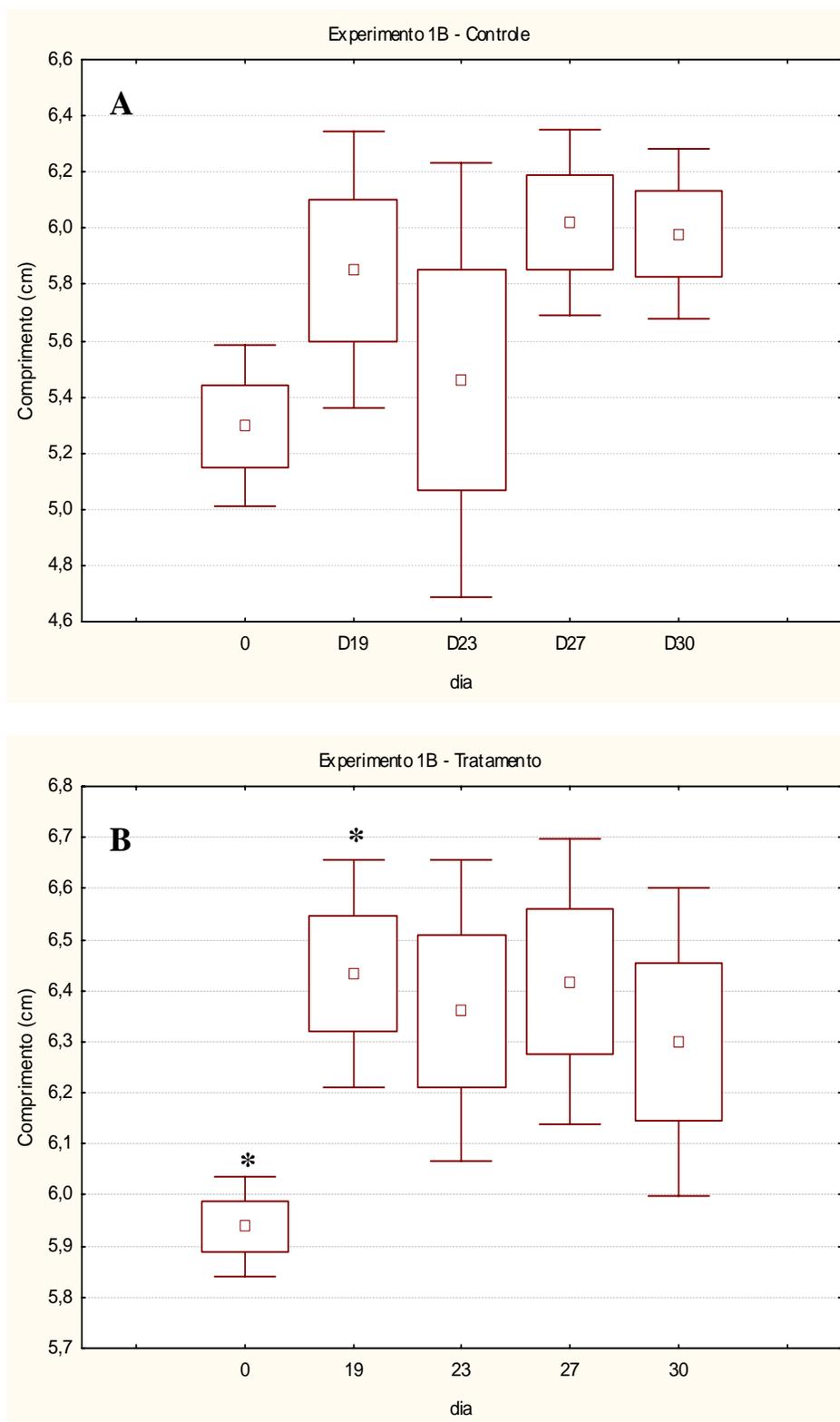


Figura 9: A) Variação do comprimento nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 1B, durante 30 dias de exposição à extrato tóxico (0,17 µg CYN por peixe). O asterisco indica que houve diferença significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

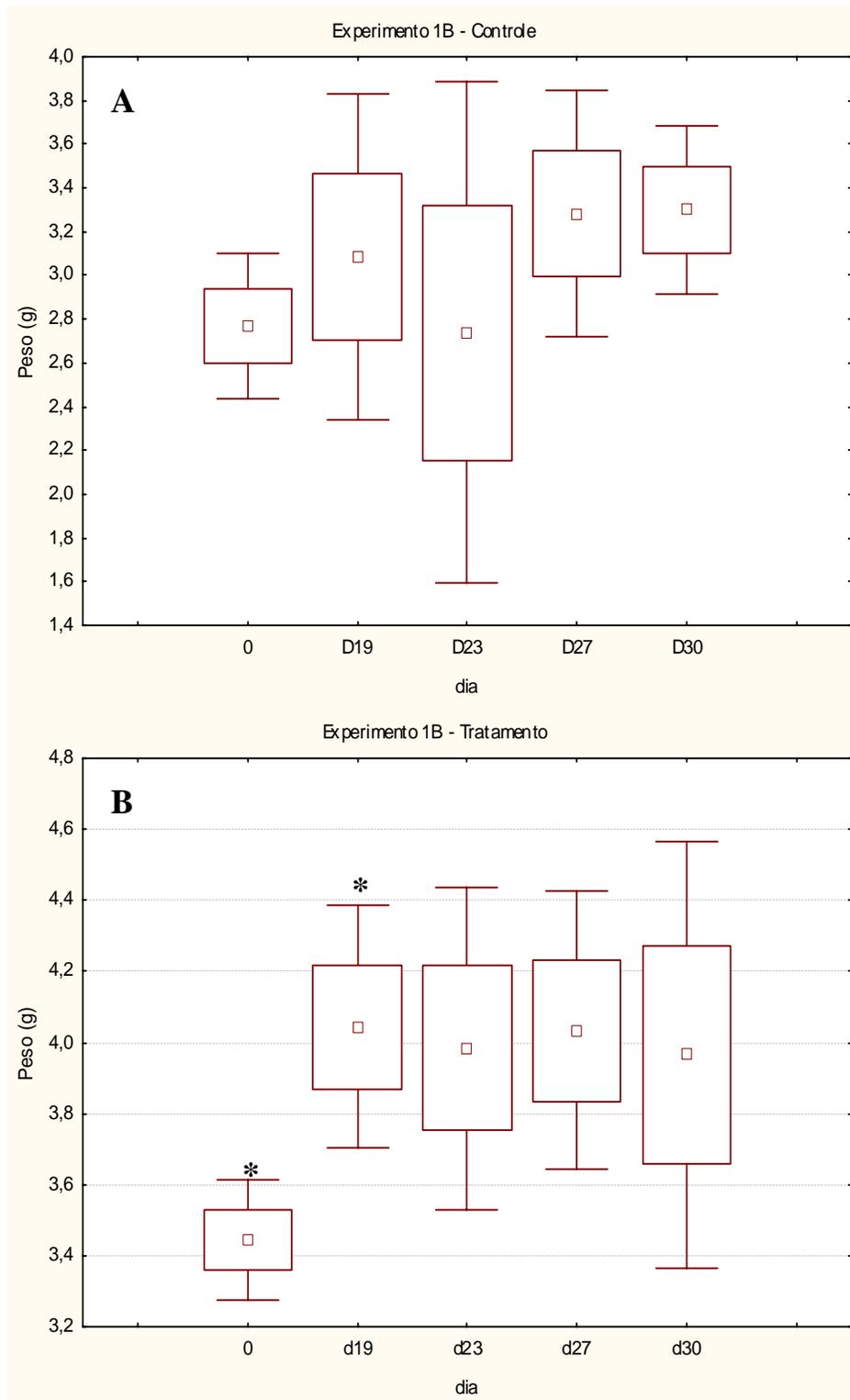


Figura 10: A) Variação do peso nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 1B, durante 30 dias de exposição à extrato tóxico (0,17  $\mu\text{g}$  CYN por peixe). O asterisco indica que houve diferença significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

Testes estatísticos (análise de variância – ANOVA) dos valores de peso e comprimento indicaram que não houve uma diferença significativa entre os peixes não-expostos (controles). No entanto, análise de variância do comprimento e peso dos animais expostos mostrou uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Para verificar entre quais os dias essa diferença foi significativa, realizou-se o teste de Tukey, ao nível de significância de 5% e observou-se que houve diferença significativa entre os valores iniciais e o segundo dia de coleta (19º dia) tanto em relação ao peso quanto ao comprimento dos animais expostos. Isso indica uma possível recuperação do animal com relação ao seu crescimento que havia sido suprimido nos primeiros quinze dias (experimento 1A). Essa hipótese pode ser viável, pois a quantidade de toxina oferecida a cada animal foi praticamente a mesma ( $0,31 \mu\text{g CYN.g}^{-1}$  de alimento no experimento 1A e  $0,35 \mu\text{g CYN.g}^{-1}$  de alimento no experimento 1B).

O teste T mostrou que houve diferença significativa comparando-se as médias dos animais expostos e não expostos no dia zero, somente no parâmetro comprimento ( $p < 0,05$ ), já no 19º dia essa diferença foi significativa tanto para peso quanto para comprimento. No 23º dia, a diferença foi significativa somente para comprimento e no 27º dia somente para peso. E por fim, não houve diferença significativa no último dia de exposição.

#### **4.5.2. - Relação peso:comprimento**

Para complementar os resultados obtidos com os dados morfométricos, foi feita uma relação peso:comprimento entre os animais no início do experimento e em seus respectivos dias de coleta. Os gráficos estão apresentados na figura 11 (A e B).

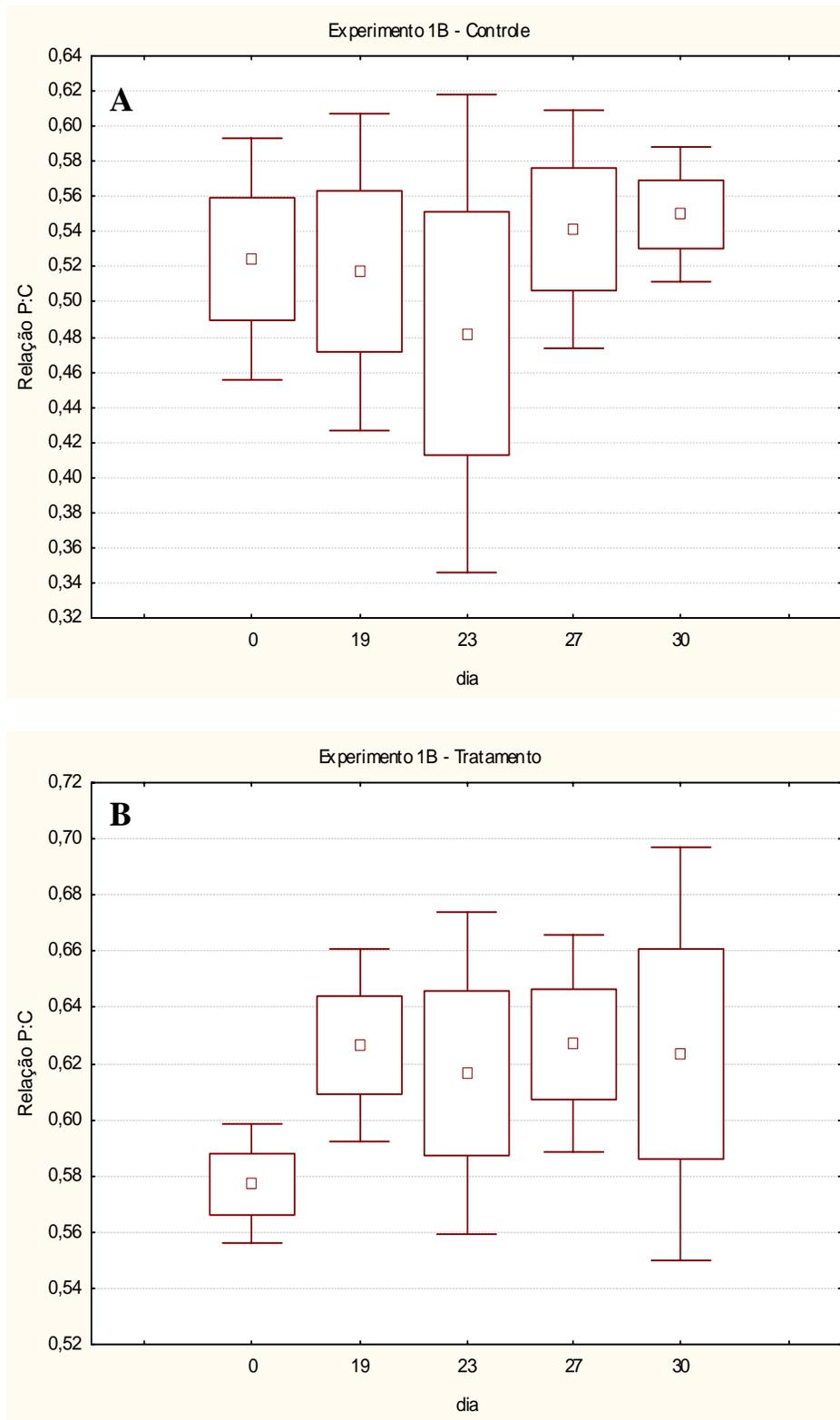


Figura 11: A)Variação da relação peso:comprimento nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 1B, durante 30 dias de exposição à extrato tóxico (0,17  $\mu\text{g}$  CYN por peixe). O asterisco indica que houve diferença significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

Testes estatísticos (análise de variância – ANOVA) dos valores da relação peso:comprimento indicaram que não houve uma diferença significativa nos peixes expostos e não-expostos à CYN (controles). Esse resultado não corrobora os resultados obtidos nos dados morfométricos desse experimento que indicou haver diferenças significativas nos padrões de crescimento dos animais experimentais durante os 19 primeiros dias de exposição, indicando que esses não tiveram seu crescimento influenciado pela toxina durante esse período.

## **4.6. Experimento 2.**

### **4.6.1 - Análise dos dados de peso e comprimento**

As figuras 12 (A e B) e 13 (A e B) mostram os gráficos de crescimento dos animais não-expostos e dos animais expostos à toxina.

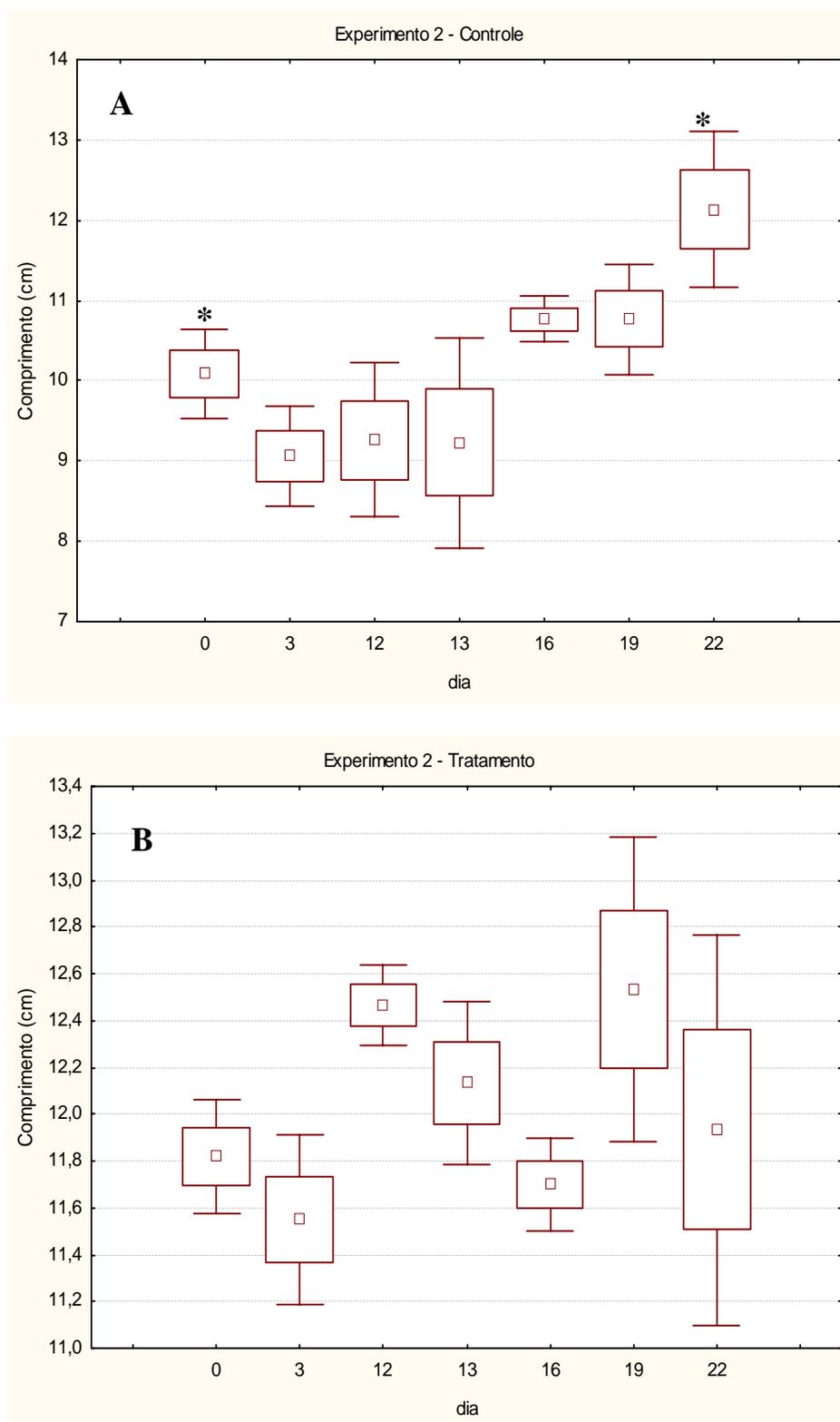


Figura 12: A) Variação do comprimento nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 2, durante 12 dias de exposição (fase de acúmulo) à extrato tóxico (0,4 µg CYN por peixe). O asterisco indica que houve diferença significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

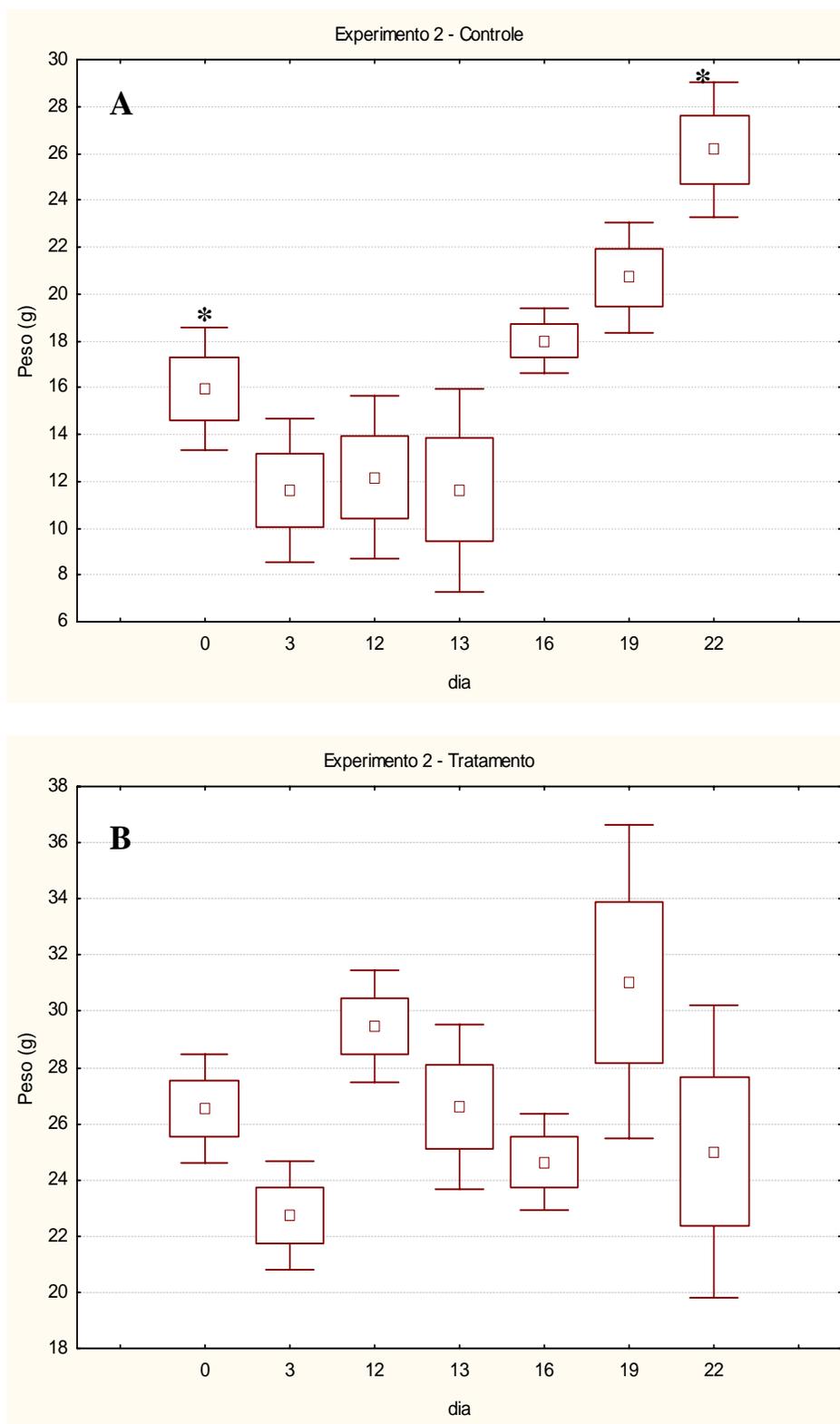


Figura 13: A) Variação do peso nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 2, durante 12 dias de exposição (fase de acúmulo) à extrato tóxico (0,4  $\mu\text{g}$  CYN por peixe). O asterisco indica que houve diferença significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

Testes estatísticos (análise de variância – ANOVA) dos valores de peso e comprimento indicaram que houve uma diferença significativa somente nos peixes não-expostos ( $p < 0,05$ ).

Para verificar entre quais os dias essa diferença foi significativa, realizou-se o teste de Tukey, ao nível de significância de 5% e observou-se que houve diferença significativa entre os valores iniciais (tempo zero) e o último dia de coleta (22º dia) tanto em relação ao peso quanto ao comprimento. Isso indica que os animais expostos à toxina por 12 dias, mesmo após o cessar da oferta de alimento contaminado, não tiveram recuperação no que diz respeito aos parâmetros de peso e comprimento nos 10 dias subsequentes.

Tal resposta pode ter ocorrido pelo fato da toxina ainda estar, de alguma maneira, influenciando no metabolismo do animal. No experimento 1B, pôde-se observar uma possível recuperação do animal mesmo este ingerindo alimento tóxico por 30 dias. Já no experimento 2, mesmo após o cessar do alimento tóxico, não notamos a recuperação do crescimento desses animais. Esse fato não pode ser muito bem explicado, no entanto, vale observar que os desvios-padrão são altos por se tratar de organismos vivos, e a isso, pode estar associado um erro de interpretação dos resultados. Além disso, o número amostral pode não ter sido suficiente para a análise deste tipo de efeito.

Os valores encontrados no teste T, comparando-se as médias entre os animais expostos e não-expostos nos respectivos dias, mostram que no dia zero houve diferença significativa somente no parâmetro de comprimento ( $p < 0,05$ ). Nos dias subsequentes (3º, 12º, 13º, 16 e 19º) houve diferença significativa tanto no peso quanto no comprimento ( $p < 0,05$ ). Já no último dia não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros.

#### **4.6.2. - Relação peso:comprimento**

Os gráficos que estão apresentados na figura 14 (A e B) mostram a relação peso:comprimento entre os animais expostos e não-expostos no início do experimento e em seus respectivos dias de coleta.

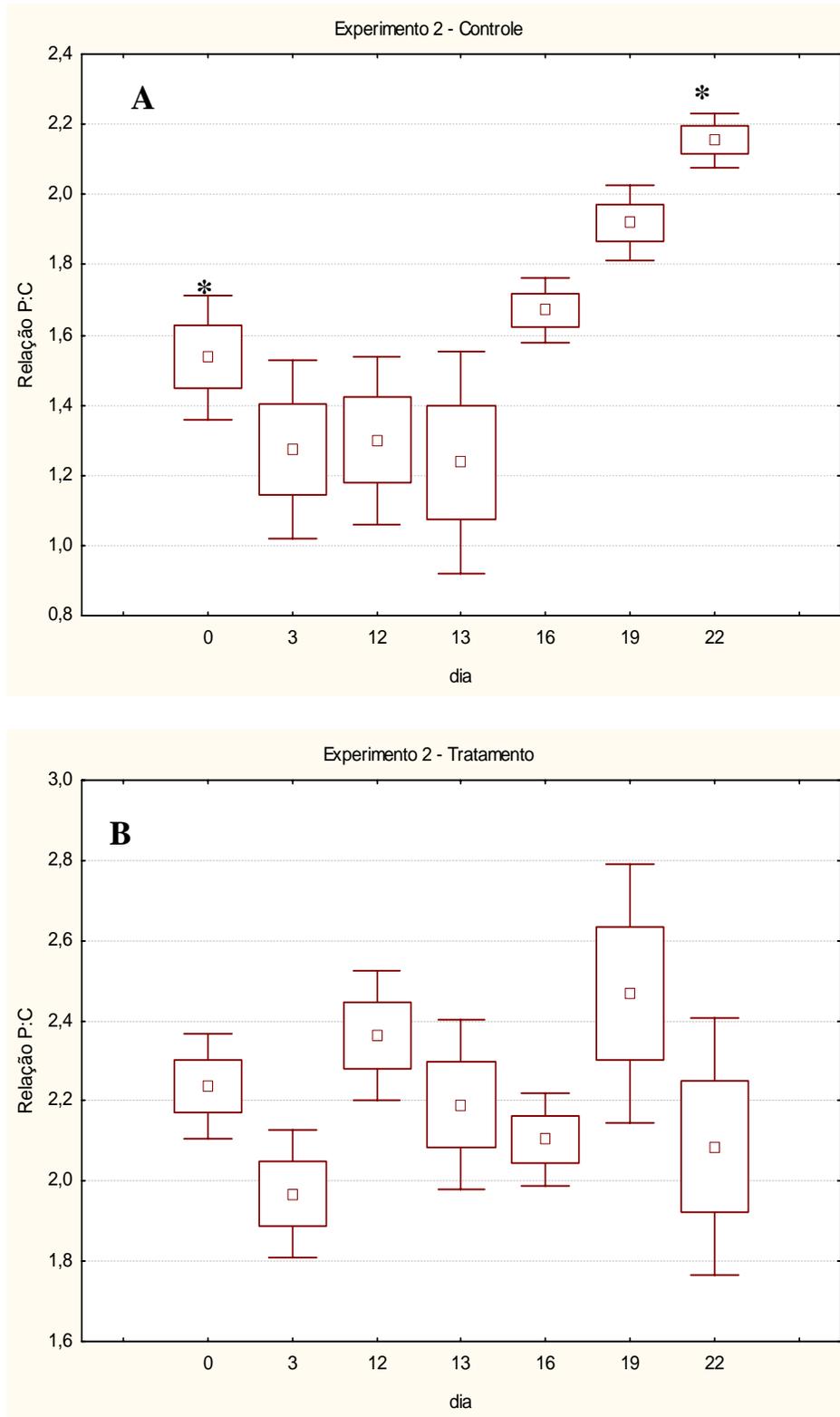


Figura 14: A) Variação da relação peso:comprimento nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 2, durante 12 dias de exposição (fase de acúmulo) à extrato tóxico (0,4 µg CYN por peixe). O asterisco indica que houve diferença significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

Não foram encontradas diferenças significativas na relação peso:comprimento dos animais expostos ao longo do tempo de exposição, entretanto, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dos animais controle, indicando que houve um aumento na biomassa desses animais.

Para verificar entre quais os dias essa diferença foi significativa, realizou-se o teste de Tukey, ao nível de significância de 5% e observou-se que houve diferença significativa entre os valores iniciais (tempo zero) e o último dia de coleta (22º dia).

### **4.7. Experimento 3.**

#### **4.7.1 - Análise dos dados de peso e comprimento**

Assim como nos experimentos anteriores, todos os animais foram medidos e pesados no início do experimento e nos seus respectivos dias de coleta. As figuras 15 (A e B) e 16 (A e B) apresentam as variações de crescimento das tilápias expostas e não-expostas ao longo do tempo de exposição.

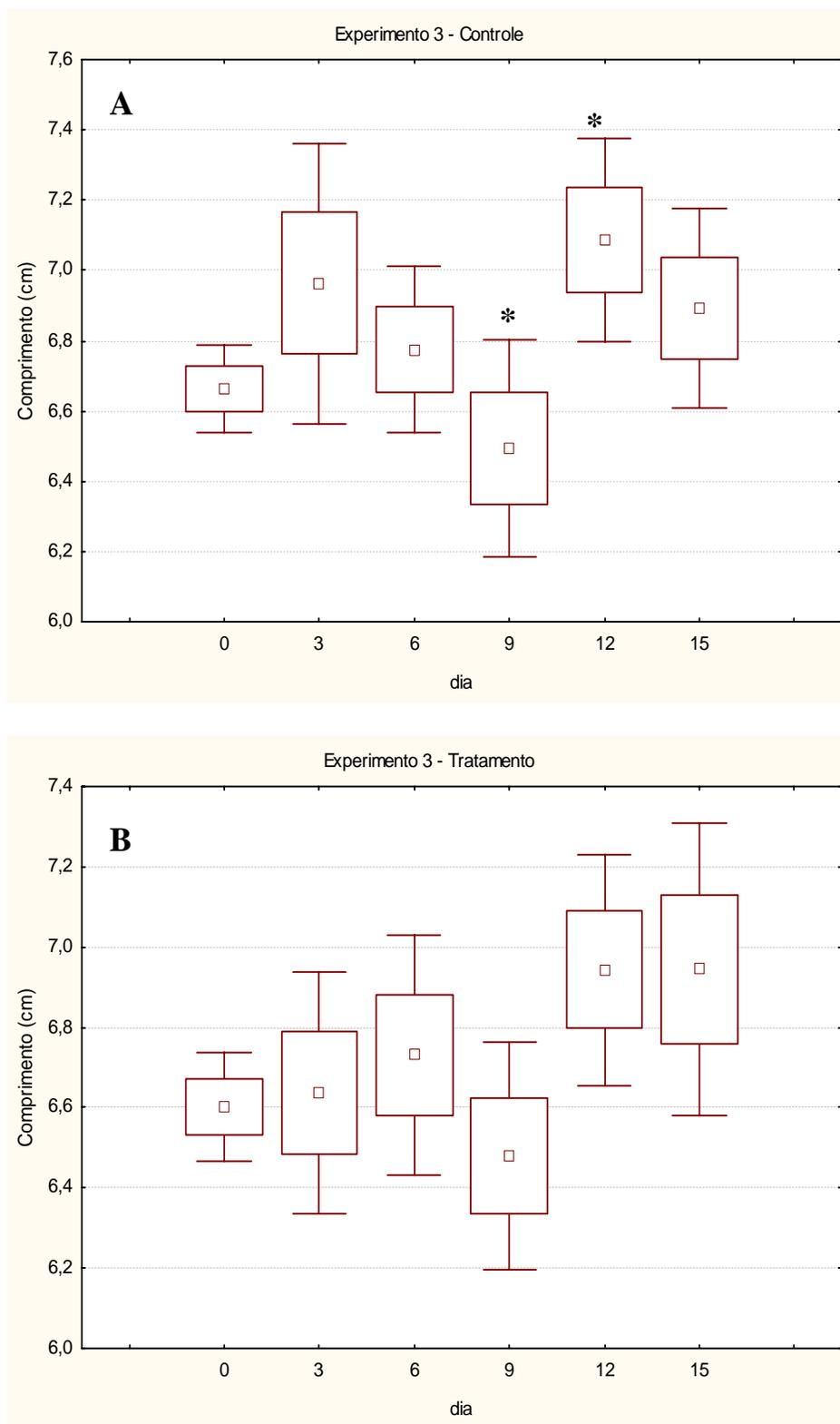


Figura 15: A) Variação do comprimento nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 3, durante 15 dias de exposição à células íntegras de *Cylindrospermopsis raciborskii* (2,7 µg CYN por peixe). O asterisco indica que houve diferença significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

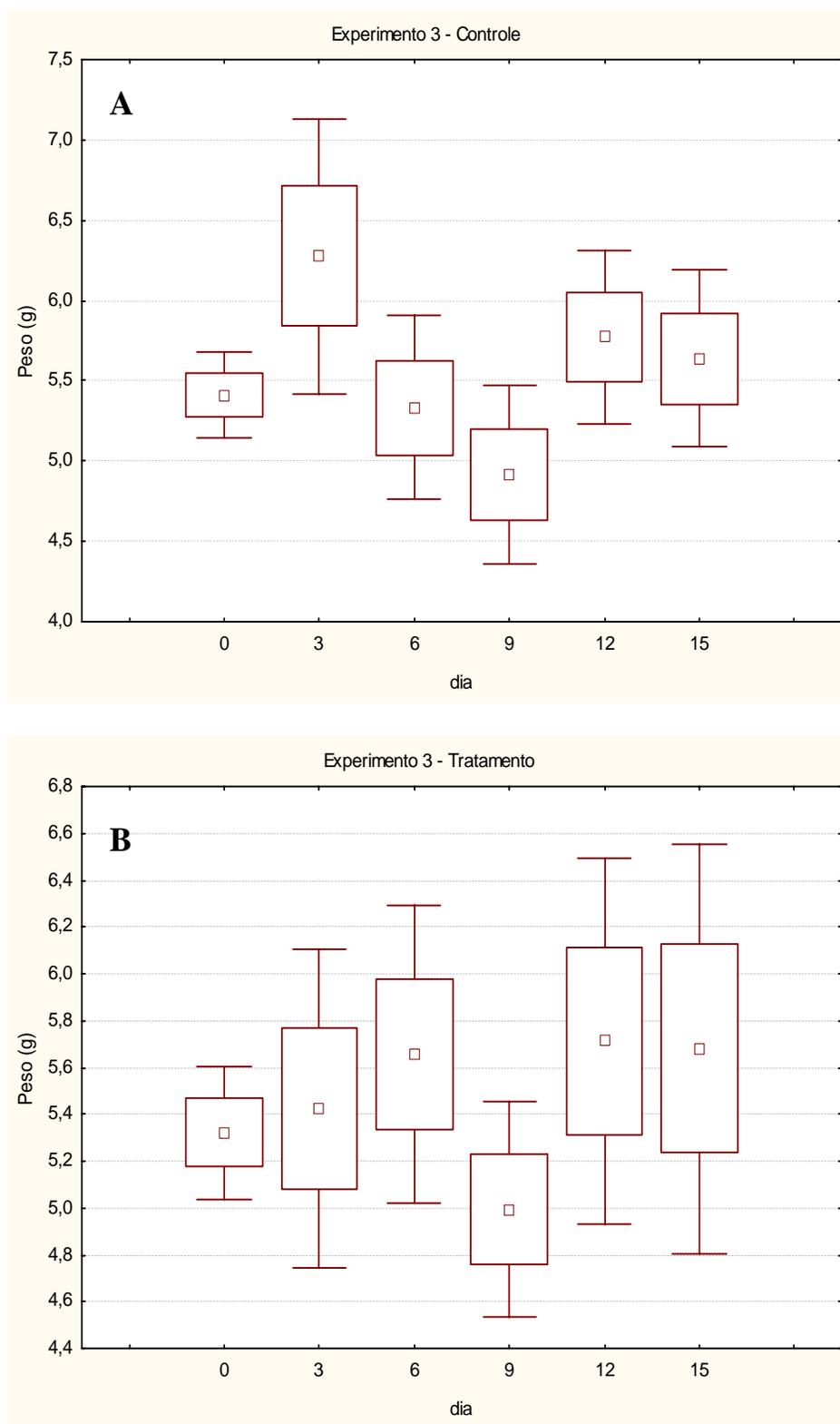


Figura 16: A) Variação do peso nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 3, durante 15 dias de exposição à células íntegras de *Cylindrospermopsis raciborskii* (2,7 µg CYN por peixe). Não houve diferença significativa entre dias amostrados (ANOVA).

A análise de variância entre os dados obtidos nos animais controle demonstraram que houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores referente aos dados de comprimento. A partir do teste de Tukey verificou-se que essa diferença se dava entre os valores do 9º e 12º dias. Os valores de peso e comprimento dos animais expostos não apresentaram diferença significativa, bem como os valores de peso dos animais controle.

Apesar da diferença encontrada entre o 3º e o 9º dias os resultados nos permitem deduzir que os animais expostos a células de *C. raciborskii* não tiveram seu peso e tamanho alterado ao longo do tempo de exposição desse experimento.

#### **4.7.2. - Relação peso:comprimento**

Os gráficos estão apresentados na figura 17 (A e B) mostram a relação peso:comprimento entre os animais expostos e não-expostos no início do experimento e em seus respectivos dias de coleta.

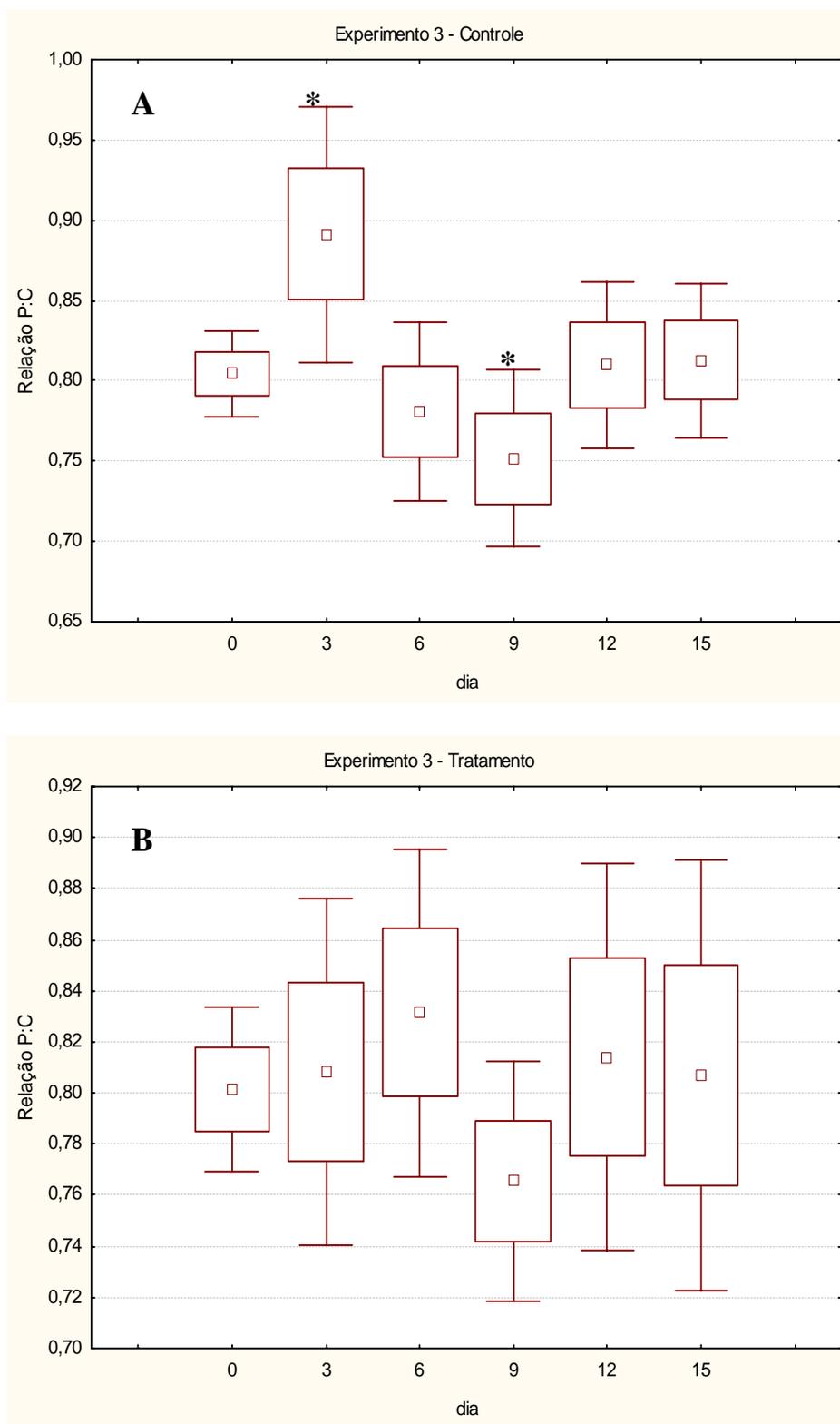


Figura 17: A) Variação do comprimento nos animais controle e B) nos animais experimentais no experimento 3, durante 15 dias de exposição à células íntegras de *Cylindrospermopsis raciborskii* (2,7  $\mu\text{g}$  CYN por peixe). O asterisco indica que houve diferença significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

A análise de variância dos dados relativos a relação peso:comprimento nos animais expostos não apresentaram diferença significativa. Porém, houve diferença significativa entre esses dados nos animais controle ( $p < 0,05$ ). A partir do teste de Tukey constatou-se que essa diferença ocorre entre os 3º e 9º dias. Apesar desse resultado, os dados nos permitem deduzir que os animais expostos não tiveram sua relação peso:comprimento alterada em relação ao controle ao longo do experimento.

O resultado do teste T mostrou que somente no 6º dia de experimento houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e ocorreu no parâmetro de peso.

A influência dos extratos tóxicos de cianobactérias no crescimento de tilápias (*Tilapia rendalli*), já foi observada anteriormente por Soares (1999), que ofereceu 29,2 µg de microcistina por grama de alimento por 42 dias aos peixes. O autor observou uma redução no peso ao longo do tempo de exposição (42 dias), no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre as variações de comprimento. Nesse experimento de exposição à microcistina, a concentração utilizada foi 94 vezes maior do que a oferecida no presente estudo (0,31 µg de CYN por grama de alimento). Além disso, o tempo de exposição também foi quase 3 vezes maior.

Em experimentos realizados por Zhao *et al.* (2006) foi oferecida a tilápias (*Oreochromis niloticus*), uma concentração de 6000 µg de microcistinas. Kg<sup>-1</sup> de peixe por 12 semanas, e verificou-se que não houve diferença significativa no crescimento do animal exposto em relação ao controle. Esta concentração foi 10 vezes maior (600 µg CYN. Kg<sup>-1</sup> de peixe – experimento 1A) do que a concentração de cilindrospermopsina oferecida no presente experimento.

A toxina administrada aos animais dos experimentos explicados anteriormente era diferente (microcistinas e cilindrospermopsina). No entanto é válido ressaltar que as

microcistinas são, para mamíferos, muito mais tóxicas (DL50 (i.p) 50  $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ ) do que a cilindrospermopsina (DL50 (i.p) 2100  $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ ), e, provavelmente também mais tóxicas para organismos aquáticos, e mesmo assim não foram observados resultados evidentes em relação a influência da microscistina no crescimento das tilápias.

White *et al.* (2006) utilizaram como modelo animal girinos de *Bufo marinus* e os expuseram à extrato celular de *C. raciborskii* produtora de cilindrospermopsina com concentrações que variavam de 0-400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , durante 15 dias. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os animais expostos em relação ao controle no que diz respeito ao crescimento e desenvolvimento desses animais. No entanto, nesse mesmo estudo, os autores expuseram esses animais à células vivas de *C. raciborskii* com concentrações de toxina que variaram de 36 – 232  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Os resultados mostraram que os animais expostos às células vivas tiveram seu crescimento relativo diminuído em relação aos animais controle. No presente estudo, os resultados foram diferentes do citado anteriormente, ou seja, ao administrarmos células integras de *C. raciborskii* não notamos diferenças significativas entre os valores de peso e crescimento dos animais expostos.

Em estudos feitos com mamíferos (camundongos), Sukenik *et al.* (2006) ofereceram aos animais extrato celular de *Aphanizomenon ovalisporum* com uma concentração de cilindrospermopsina que variou de 10 - 55  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  ao longo de 42 semanas. Os autores não encontraram diferenças significativas entre os pesos dos animais expostos e dos animais controle, indicando não haver influência da toxina no peso do animal, no entanto, encontraram diferenças significativas no aumento do peso dos rins em relação ao peso corpóreo nos animais expostos. Tal fato pode subestimar a interrupção no ganho de peso corpóreo total em relação à um órgão específico, nesse caso, os rins. O mesmo pode estar ocorrendo no presente estudo, pois o fato de não haver diferenças significativas

(experimentos 1B e 3) entre os valores de peso e comprimento não significa que o animal não esteja sendo afetado da mesma maneira que esses camundongos.

Raisner *et al.* (2004) ofereceram, via oral, uma concentração de 66  $\mu\text{g}$  CYN purificada.  $\text{Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  por 3 semanas à camundongos e não observaram nenhum efeito no peso desses animais. Humpage e Falconer (2003) expuseram, oralmente, camundongos a diversas concentrações de CYN, proveniente de extrato celular, durante 10 semanas e verificaram que somente as concentrações acima de 432  $\mu\text{g}$  CYN.  $\text{Kg}^{-1}$  de peso corpóreo eram capazes de reduzir significativamente (7%) o peso do animal.

Em estudos feitos com fêmeas prenhas e fetos de camundongos, Rogers *et al.* (2007) expuseram (injeção intraperitoneal) fêmeas prenhas à CYN purificada em uma dose que variou de 8 – 32  $\mu\text{g}$ .  $\text{Kg}^{-1}$  e não notaram diferenças significativas em relação ao ganho de peso entre os fetos controle e os fetos expostos. No mesmo estudo, com a exposição de fêmeas grávidas a uma dose de 50  $\mu\text{g}$  CYN. $\text{Kg}^{-1}$  foi observado uma redução no tamanho e peso dos neonatos expostos à toxina em relação aos animais controle.

A comparação entre mamíferos e peixes é, de certa forma, errônea. Entretanto, é válido ressaltar a influência da fonte da toxina administrada no animal, isto é, se a e mesma é purificada, se é um extrato celular ou proveniente de células vivas (íntegras), já que, isso de alguma forma pode interferir tanto na absorção da molécula quanto no efeito desta sobre o organismo.

Alguns autores questionam a forma como essas toxinas são administradas nos ensaios toxicológicos. As vias de ingestão são de extrema importância, visto que a proximidade da realidade deve ser um fator a se levar em consideração. Por exemplo, Bradberry *et al.*, (2003) observam que proteínas injetadas intraperitonealmente são 10 mil vezes mais tóxicas do que se administradas oralmente. Devido, provavelmente, ao fato de

que oralmente estas moléculas sofrem ações de ácidos e enzimas que fazem parte do trato gastro-intestinal. O mesmo pode estar ocorrendo nas tilápias, onde a via de ingestão da toxina foi através da via oral.

Além disso, alguns compostos presentes na parede celular das cianobactérias (lipopolissacarídeos – LPS) são, em muitas vezes, responsáveis pela toxicidade destes microrganismos (Best *et al.*,2002). Entretanto, estudos realizados por Lindsay *et al.*,(2006) mostraram que microcrustáceos (*Artemia salina*) que foram expostos previamente a LPS de cianobactérias, não tiveram a atividade da GST diminuída após exposição a CYN, indicando que estes LPSs, funcionaram, de alguma forma, como proteção para esses organismos, diminuindo a toxicidade da cilindrospermopsina.

Analisando os resultados obtidos nos experimentos realizados, nota-se que diferentes resultados são apresentados. No experimento 1A, observamos que os animais expostos parecem ter seu crescimento anulado pela exposição à toxina, já que há um aumento no peso e comprimento dos animais controle, o que não acontece nos animais expostos. Já no experimento 1B, os animais controle não têm seu crescimento aumentado ao logo dos dias de exposição, ao passo que o animais experimentais, nos 19 primeiros dias tem seu crescimento aumentado. Já no experimento 2, os animais controle crescem em relação aos animais expostos a toxina. E por fim, no experimento 3, nem os animais controle nem os animais expostos têm seu crescimento alterados ao longo dos 15 dias de experimento.

Levando-se em consideração que uma tilápia (*Oreochromis niloticus*) leva, em média, oito meses para chegar no seu peso e comprimento máximos (Centro de Pesquisas Ictiológicas de Pentecostes-CE. Bassanezi & Ferreira, 1988), o tempo em que os animais foram expostos no presente experimento (no máximo de 30 dias) pode ser considerado

demasiadamente curto, e, portanto, o resultado observado não nos permite afirmar que a toxina tem ou não influência no crescimento das tilápias dessa espécie, além disso, o número de amostras pode ter sido insuficiente para tal conclusão. Logo, experimentos com maior tempo de exposição são necessários para elucidar se a cilindropermopsina influencia no crescimento de tilápias dessa espécie.

#### **4.8 – Dados da variação das concentrações de cilindropermopsina em tecidos de tilápias (*Oreochormis niloticus*) em diferentes condições experimentais.**

##### **4.8.1 – Experimento 1A**

Nesse experimento os peixes receberam uma concentração de  $0,31 \mu\text{g CYN.g}^{-1}$  de alimento tóxico e como cada peixe ingeriu apenas 0,5 gramas de alimento, cada peixe recebeu a concentração de  $0,15 \mu\text{g CYN.dia}^{-1}$ . A figura 18 (A e B) apresenta a variação da concentração da toxina no músculo e nas vísceras ao longo dos quinze dias de exposição.

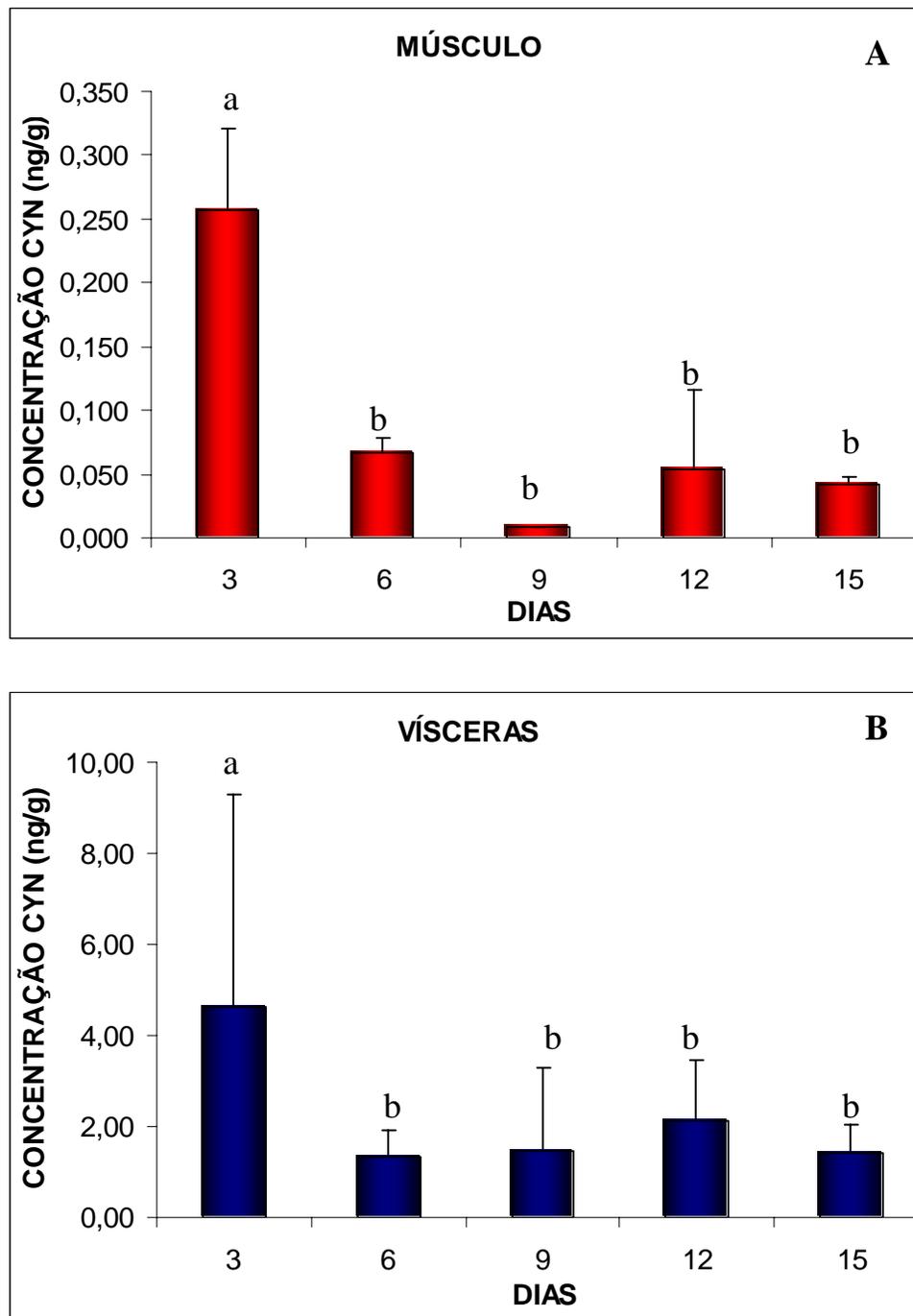


Figura 18: Experimento 1A. A) Variação da concentração de CYN no tecido muscular e B) nas vísceras dos animais expostos, durante 15 dias de exposição à extrato celular tóxico ( $0,15 \mu\text{g}$  CYN por peixe). As letras “a” e “b” indicam a diferença estatística significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

Observando a figura 18 (A), nota-se que no terceiro dia de experimento ocorreu o acúmulo máximo de toxina no tecido muscular dos animais ( $0,257 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ ), esse valor representa um percentual de 0,14 % em relação ao total de toxina oferecida por grama de peixe durante os três primeiros dias ( $0,18 \mu\text{g CYN.g}^{-1}$  de peixe), isto é, se cada animal ingeria  $0,15 \mu\text{g CYN.g}^{-1}\text{alimento.dia}^{-1}$  e os peixes tinham uma média de 2,5 gramas, significa que a dose foi de  $0,06 \mu\text{g CYN.g}^{-1}$  de peixe.dia<sup>-1</sup>.

No sexto dia de experimento a concentração de toxina caiu para  $0,07 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ , o que representa um percentual baixo (0,018%) em relação ao total oferecido durante os seis dias ( $3,6 \mu\text{g CYN.g}^{-1}$ ). Esta concentração da toxina encontrada no músculo continuou baixa até o final do experimento com percentuais de 0,002 % ( $0,009 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ ), 0,007% ( $0,053 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ ) e 0,005% ( $0,043 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ ), nos nono, décimo segundo e décimo quinto dias de experimento, respectivamente.

Na figura 18 (B), observa-se a variação da toxina nas vísceras das tilápias. Nota-se que, assim como no músculo, as maiores concentrações de toxina foram encontradas no terceiro dia de experimento ( $4,64 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ ) correspondendo a 2,58% do total de toxina oferecido ao animal durante os três dias ( $0,18 \mu\text{g CYN.g}^{-1}$ ). A partir de então, igualmente à cinética da toxina no músculo, as concentrações de cilindrospermopsina decaíram, atingindo valores de  $1,34 \text{ ng CYN.g}^{-1}$  (0,37%) no sexto dia,  $1,47 \text{ ng CYN.g}^{-1}$  (0,27%) no nono dia,  $2,11 \text{ ng CYN.g}^{-1}$  (0,29%) no décimo segundo dia e  $1,42 \text{ ng CYN.g}^{-1}$  (0,16%) no décimo quinto dia.

#### **4.8.2 – Experimento 1B**

Neste experimento, os animais expostos à toxina foram alimentados com ração tóxica contendo  $0,35 \mu\text{g CYN.g}^{-1}$  de alimento, e da mesma forma que o experimento anterior, os peixes comeram 0,5 gramas de alimento, ou seja, cada animal ingeriu  $0,175 \mu\text{g CYN.dia}^{-1}$ . A média de peso dos animais era de 3,4 gramas, portanto, a dose foi de  $0,05 \mu\text{g CYN.g}^{-1}$  de peixe.dia<sup>-1</sup>. A diferença em relação ao experimento anterior foi que os animais somente foram coletados a partir do 19º dia, totalizando 30 dias de experimento. A figura 19 (A e B) apresenta as concentrações de CYN, nos músculos e vísceras, ao longo do tempo de exposição.

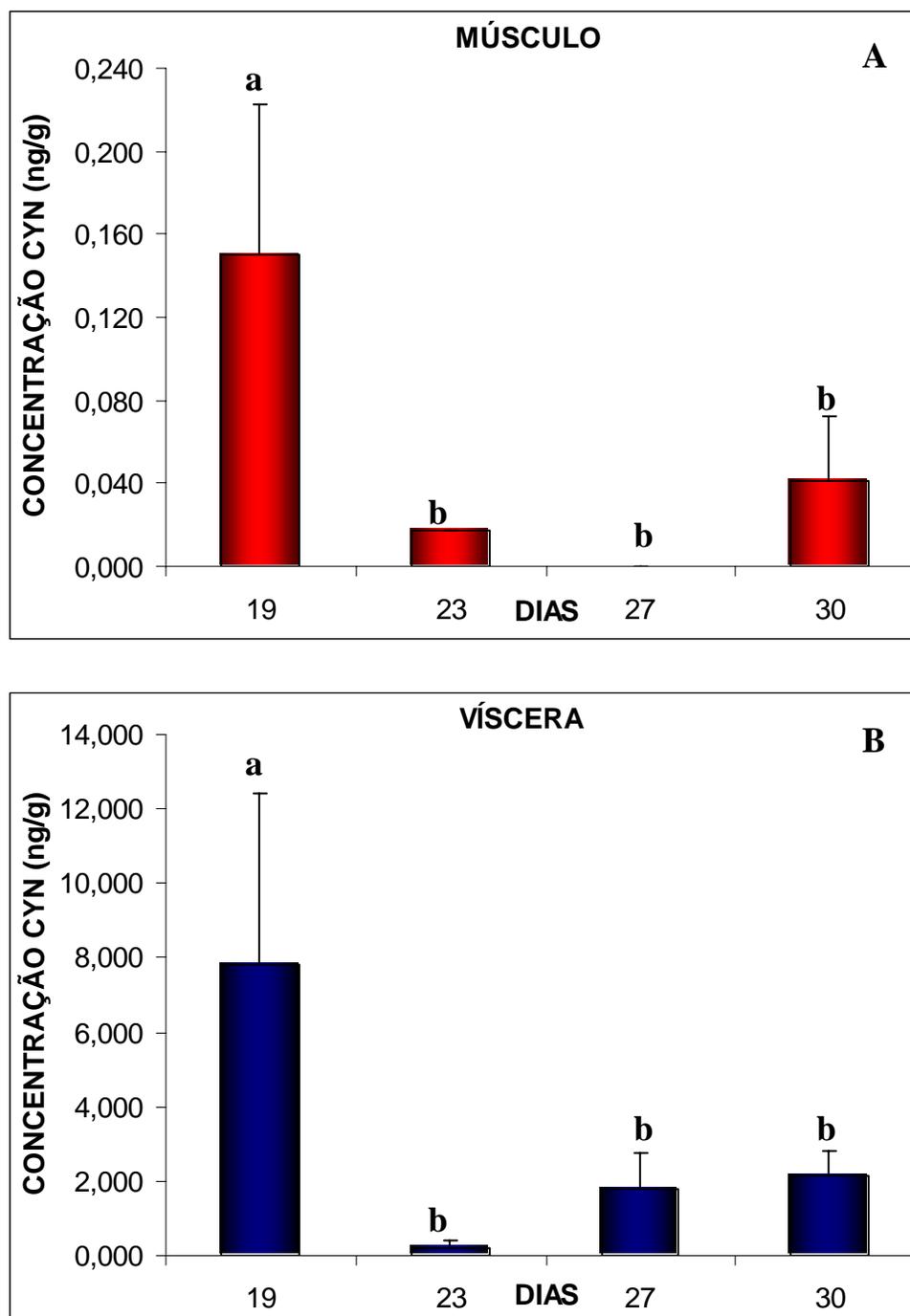


Figura 19: Experimento 1B. A) Variação da concentração de CYN no tecido muscular e B) nas vísceras dos animais expostos, durante 30 dias de exposição à extrato celular tóxico ( $0,17 \mu\text{g}$  CYN por peixe). As letras “a” e “b” indicam a diferença estatística significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

Analisando os dados obtidos nesse experimento, com relação ao acúmulo de cilindrospermopsina nos tecidos do animal, nota-se que o maior acúmulo no tecido muscular ocorreu no décimo nono dia ( $0,15 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ ), o que corresponde à 0,02% do total de toxina oferecido nos dezenove dias ( $0,95 \text{ } \mu\text{g CYN.g}^{-1}$ ). Este percentual decaiu ao longo dos dias restantes, atingindo 0,002% no 23º dia ( $0,018 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ ), período no qual foi oferecido um total de  $1,15 \text{ } \mu\text{g CYN.g}^{-1}$ . No 27º dia, não foi detectada a presença de cilindrospermopsina no tecido muscular dos peixes, isso pode ter ocorrido pelo fato de realmente não haver níveis detectáveis de toxina ou ainda pelo fato de que a massa (quantidade de músculo) não foi suficiente para a identificação da toxina pelo método utilizado. Até o último dia de coleta (30º dia) foi oferecido um total de  $1,5 \text{ } \mu\text{g CYN.g}^{-1}$ , entretanto somente 0,003% ( $0,04 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ ) foi detectado neste tecido ao final deste experimento.

Analisando as concentrações de toxina nas vísceras, observa-se que no 19º dia, assim como no tecido muscular, foi observada a maior concentração de toxina ( $7,83 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ ), que corresponde a 0,8% do total de CYN oferecido ( $0,95 \text{ } \mu\text{g CYN.g}^{-1}$ ) ao longo dos 19 dias. Da mesma forma que ocorreu no músculo, a concentração de toxina nas vísceras decaiu e no 23º dia de coleta foi encontrada a concentração de  $0,2 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ , o que corresponde a 0,02% do total oferecido ( $1,15 \text{ } \mu\text{g CYN.g}^{-1}$ ). Tal concentração voltou a aumentar no 27º dia ( $1,78 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ ), no entanto o percentual continuou baixo (0,1%) em relação ao total oferecido até este dia ( $1,35 \text{ } \mu\text{g CYN.g}^{-1}$ ). E no último dia de coleta (30º dia) essa concentração se manteve baixa ( $2,13 \text{ ng CYN.g}^{-1}$ ) alcançando o valor de 0,14%.

A figura 20 (A e B) representa a junção dos dados do experimento 1A e 1B, já que as concentrações utilizadas foram muito semelhantes ( $0,06 \text{ } \mu\text{g CYN.g}^{-1}$  de peixe. dia<sup>-1</sup> –

Experimento 1A e  $0,05 \mu\text{g CYN}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$  – Experimento 1B). Isso nos permite visualizar a cinética da toxina ao longo de 30 dias exposição.

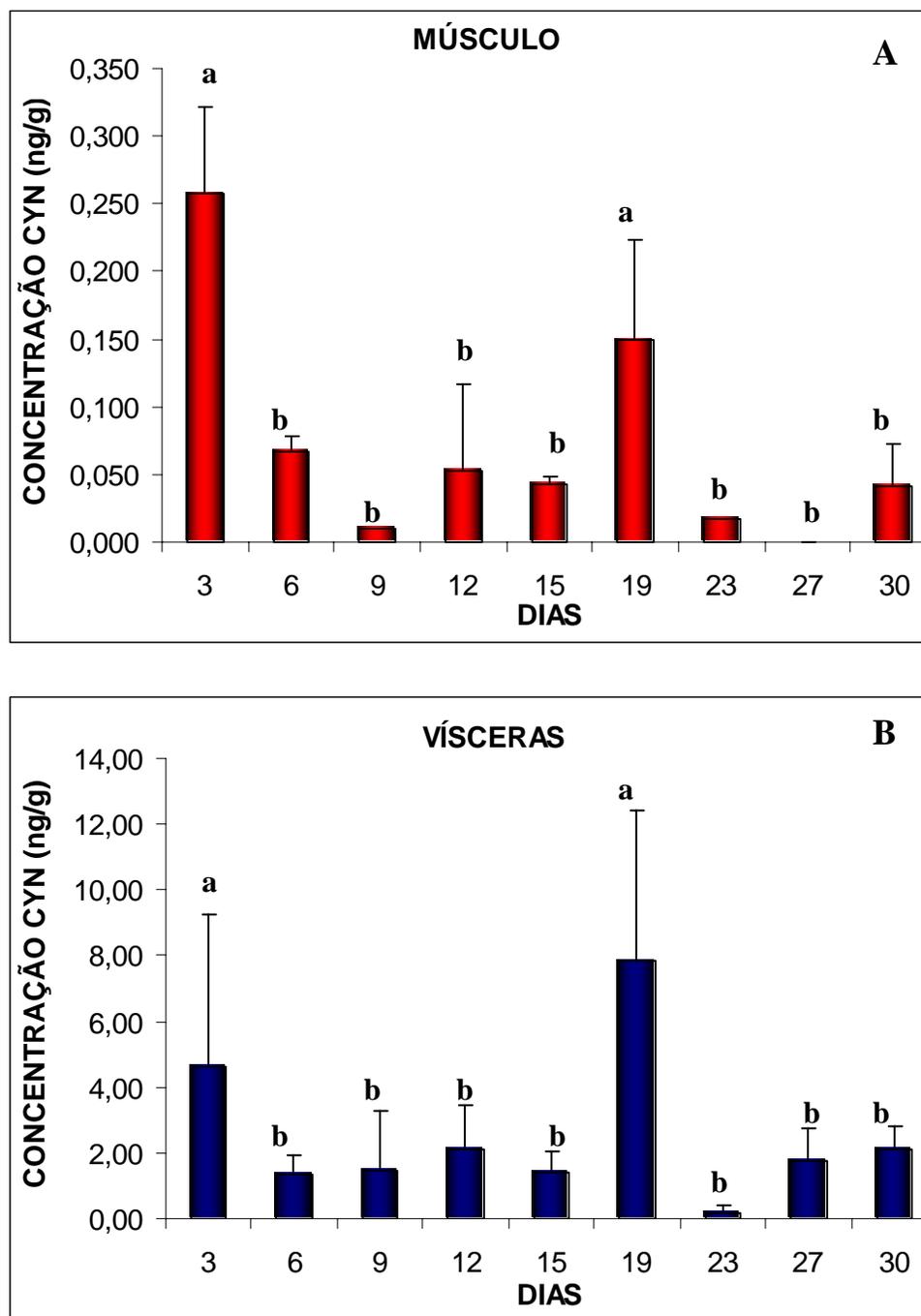


Figura 20: Experimento 1A + 1B. A) Variação da concentração de CYN no tecido muscular e B) nas vísceras dos animais expostos à extrato celular tóxico. As letras “a” e “b” indicam a diferença estatística significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

Na figura acima, pode-se observar um padrão oscilatório da toxina ao longo dos dias de coleta, esse fato não pode ser muito bem explicado, mas pode estar associado ao processo de detoxificação que pode ter sido ativado pela toxina. Testes estatísticos (ANOVA) mostraram que o 3º e o 19º dias foram diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos outros dias de coleta, tanto para o tecido muscular quanto para as vísceras. Para verificar se esse padrão se mantém ao longo do tempo faz-se necessários experimentos com maiores tempos de duração.

#### **4.8.3 – Experimento 2**

Este experimento teve como principal objetivo verificar o processo de acúmulo e depuração de cilindrospermopsina num total de 22 dias. Os animais foram expostos, durante 12 dias, a uma concentração de  $0,8 \mu\text{g CYN. g}^{-1}$  de alimento por dia, como cada peixe comeu 0,5 grama de alimento, os mesmo ingeriram  $0,4 \mu\text{g CYN}$  por dia. A média de peso dos animais era de 26,5 gramas, fazendo a correlação com a quantidade de toxina à que foram expostos, pode-se dizer que os animais foram expostos à  $0,02 \mu\text{g CYN. g}^{-1}$  de peixe.  $\text{dia}^{-1}$ . A figuras 21 (A e B) mostra a variação da concentração de toxina no músculo e nas vísceras ao longo do tempo de acúmulo e depuração da toxina.

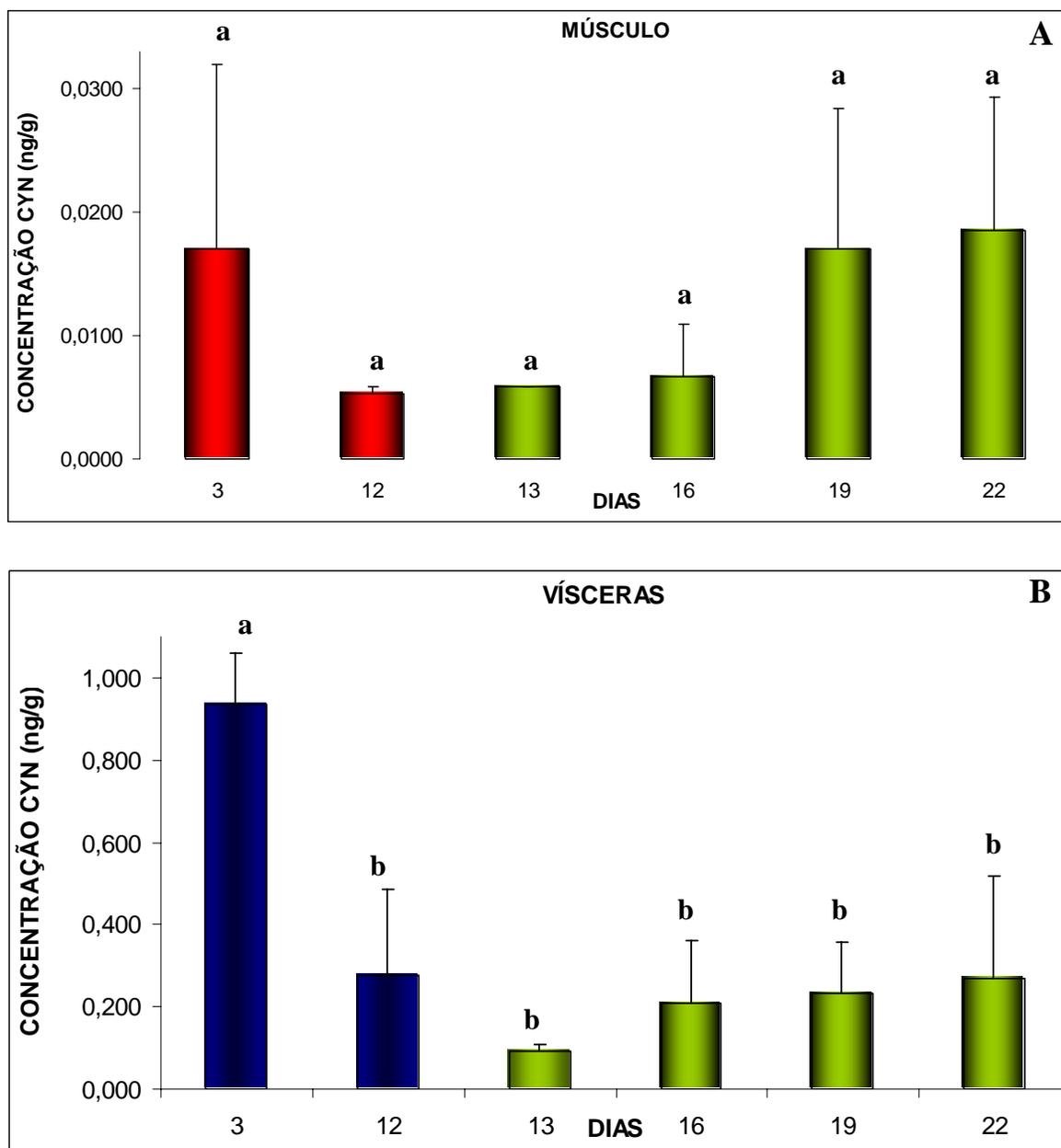


Figura 21: Experimento 2. A) Variação da concentração de CYN no tecido muscular e B) nas vísceras dos animais expostos durante 12 dias à extrato celular tóxico ( $0,4 \mu\text{g}$  CYN por peixe). As barras verdes correspondem as concentrações de toxina detectadas na fase de depuração. As letras “a” e “b” indicam a diferença estatística significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

Assim com nos outros experimentos, a concentração de cilindrospermopsina, variou ao longo do tempo de exposição. Nesse experimento, apesar dos animais terem sido de maior tamanho, a concentração de toxina oferecida por grama de peixe foi menor que a dos experimentos anteriores.

No tecido muscular dos animais expostos foi encontrada, no 3º dia de exposição, a concentração de 0,017 ng CYN. g<sup>-1</sup> o que corresponde a 0,03% do total de toxina oferecida (0,06 µg CYN. g<sup>-1</sup>). Ocorre, então, um decréscimo na concentração no 12º dia (0,005 ng CYN. g<sup>-1</sup>) alcançando o valor de 0,002% do total de toxinas oferecido. Estes valores se mantiveram, mesmo na fase de depuração. No 13º dia o valor encontrado no músculo foi de 0,006 ng CYN. g<sup>-1</sup> (0,002% do total oferecido até o 12º dia), no 16º dia um valor de 0,007 ng CYN. g<sup>-1</sup> (0,003% do total oferecido até o 12º dia), e a partir do 19º dia (0,02 ng CYN. g<sup>-1</sup> – 0,007% do total oferecido até o 12º dia), esses valores tiveram um aumento, e no último dia de depuração o valores foram de 0,018 ng CYN. g<sup>-1</sup> (0,01% do total oferecido até o 12º dia). Os percentuais de acúmulo encontrados foram muito baixos em relação à quantidade de toxina oferecida, no entanto, é importante ressaltar que os valores de toxina encontrados no último dia de depuração são semelhantes aos valores encontrados no 3º dia de acúmulo.

Nas vísceras, as quantidades de toxina encontradas foram de uma ordem de grandeza maiores que as encontradas nos músculos, chegando a ultrapassar esse valor em alguns momentos. No terceiro dia da fase de acúmulo encontrou-se o valor de 0,93 ng CYN. g<sup>-1</sup> (1,6 % do total) este valor decaiu, assim como no músculo, para 0,28 ng CYN. g<sup>-1</sup> no 12º dia (0,12 % do total). Já na fase de depuração, no 13º dia a concentração de toxina alcançou o menor valor, 0,09 ng CYN. g<sup>-1</sup>. Entretanto, esse valor voltou a subir para 0,21

ng CYN. g<sup>-1</sup> no 16º dia e se manteve quase homogêneo até o final do experimento, no 19º dia com valores de 0,23 ng CYN. g<sup>-1</sup> e no 22º dia com valores de 0,27 ng CYN. g<sup>-1</sup>.

A análise dos dados estatísticos (ANOVA) mostrou que não houve diferença significativa entre os valores de toxina encontrados no tecido muscular nos dias amostrados. Ao passo que, nas vísceras, o 3º dia foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) dos outros dias de coleta.

Foram realizadas análises de fezes e da água dos aquários nos dias correspondentes à fase de depuração para verificar se a toxina estava sendo eliminada pelas fezes e/ou urina dos animais. Entretanto, através do método de detecção utilizado (imunoensaio enzimático do tipo ELISA) não foi possível analisar a quantidade de toxina nessas frações, pois o valor de falso-positivo nos aquários controle foi muito alto chegando, na maioria das vezes, a ultrapassar os valores encontrados nos aquários experimentais e, portanto invalidando o nosso método de detecção para essas frações. Esse fato não pode ser muito bem explicado, mas uma hipótese é que a toxina que talvez estivesse presente nos excretas estaria na forma de conjugados que não são reconhecidos pelos anticorpos.

#### **4.8.4 – Experimento 3**

Como dito anteriormente, nesse experimento, foram usadas células íntegras de *C. raciborskii* produtora de cilindrospermopsina. Foi oferecida a quantidade de 5,4 µg CYN. g<sup>-1</sup> de alimento.dia<sup>-1</sup> e cada animal ingeria apenas 0,5 gramas de alimento, portanto 2,7 µg CYN.dia<sup>-1</sup>. A média de peso dos peixes foi de 5,3 gramas, sendo assim, a concentração oferecida por grama de peixe foi de 0,5 µg CYN. g<sup>-1</sup> de peixe.dia<sup>-1</sup>, ou seja, uma ordem de

grandeza maior que nos experimentos anteriores. A figura 22 (A e B) apresenta as variações de toxina ao longo dos 15 dias de experimento.

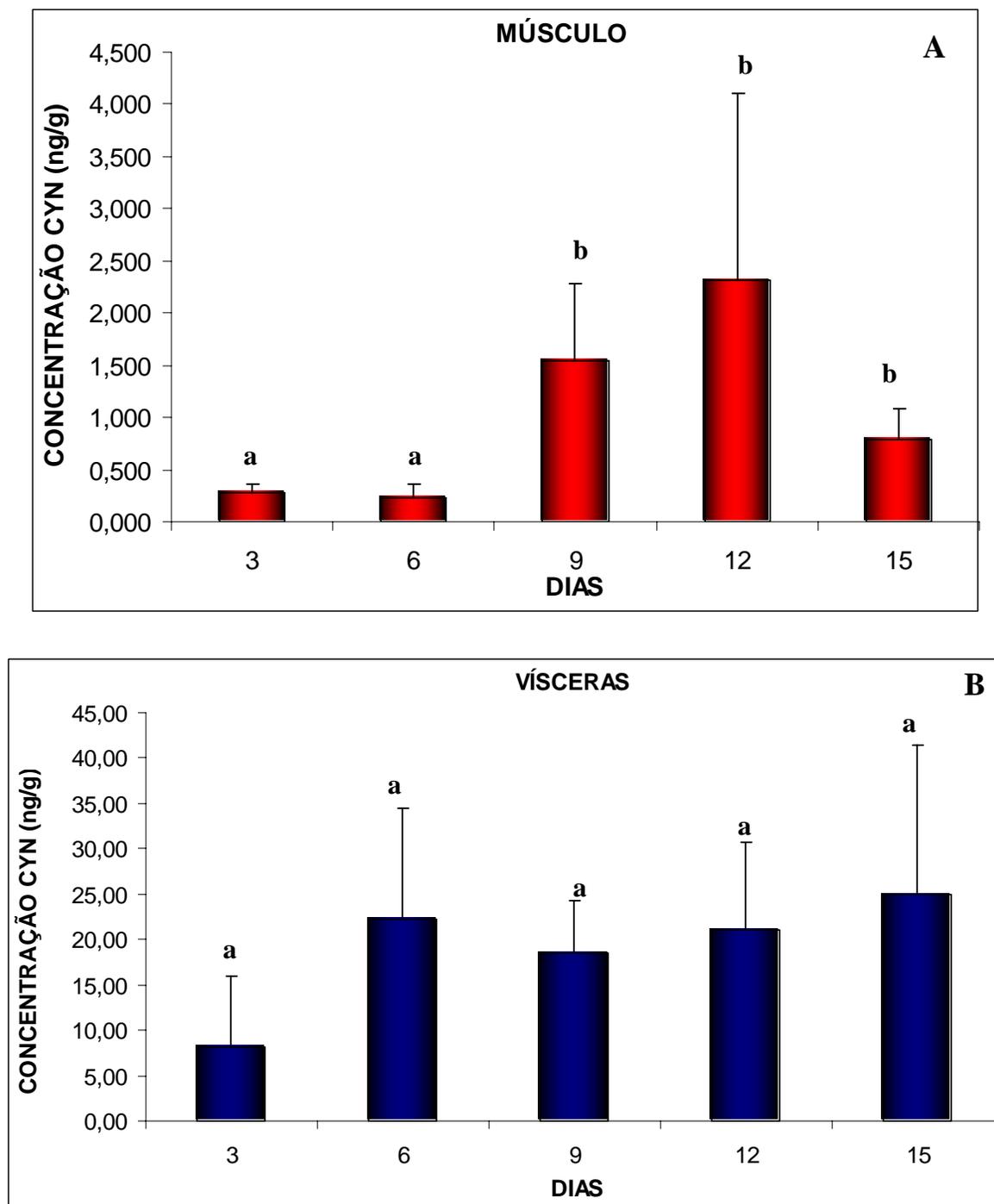


Figura 22: Experimento 3. A) Variação da concentração de CYN no tecido muscular e B) nas vísceras dos animais expostos, durante 15 dias de exposição à células íntegras de *C. raciborskii* (2,7 µg CYN por peixe). As letras “a” e “b” indicam a diferença estatística significativa entre os respectivos dados (ANOVA –  $p < 0,05$ ).

Apesar da quantidade de CYN oferecida às tilápias ter sido 10 vezes maior que no experimento 1B, por exemplo, o percentual de acúmulo no tecido muscular e nas vísceras não foi proporcional ao valor oferecido.

No músculo, as concentrações no 3º dia (0,28 ng CYN. g<sup>-1</sup> correspondente à 0,02% do total oferecido – 1,5 µg CYN. g<sup>-1</sup> de peixe) e no 6º dia (0,22 ng CYN. g<sup>-1</sup> correspondendo à 0,008% do total oferecido até esse dia) foram as mais baixas encontradas durante todo o experimento. No 9º dia, esses valores aumentaram (1,56 ng CYN. g<sup>-1</sup> correspondente à 0,03%) e chegaram ao máximo encontrado no 12º dia (2,3 ng CYN. g<sup>-1</sup> com um percentual de acúmulo de 0,04% em relação ao total oferecido até aquele dia (6,0 µg CYN. g<sup>-1</sup> de peixe). A concentração de toxina tornou a cair no último dia de experimento, chegando ao valor de 0,78 ng CYN. g<sup>-1</sup> (corresponde à 0,01% do total oferecido).

Nas vísceras, o comportamento foi semelhante ao músculo, já que no 3º dia de experimento a concentração encontrada foi a mais baixa (8,23 ng CYN. g<sup>-1</sup>), no entanto, o percentual de acúmulo foi de 0,55% em relação ao total oferecido até o 3º dia de experimento. A concentração de toxina aumentou no 6º dia (22,2 ng CYN. g<sup>-1</sup>) bem como o percentual de acúmulo que chegou ao máximo durante todo o experimento (0,74%). No 9º dia houve um decréscimo na concentração (18,6 ng CYN. g<sup>-1</sup>) bem como no percentual de acúmulo (0,41% em relação ao total oferecido – 4,5 µg CYN. g<sup>-1</sup> de peixe). As concentrações no 12º dia voltaram a aumentar (21,1 ng CYN. g<sup>-1</sup>) no entanto, o percentual ainda assim diminuiu (0,35%). No último dia, as concentrações voltaram a aumentar, mas, o percentual continuou praticamente o mesmo (0,33%).

A análise estatística (ANOVA) dos dados obtidos nos mostrou que a concentração de toxina encontrada no 12º dia, no tecido muscular, foi significativamente diferente ( $p <$

0,05) somente em relação as concentrações encontradas no 3º dia de coleta. Já nas vísceras, não houve diferenças significativas entres as concentrações obtidas ao longo do experimento.

Até o momento poucos estudos foram realizados no que diz respeito ao acúmulo de cilindrospermopsina em diferentes organismos. Saker *et al.*, (1999) foram os pioneiros a investigar esse assunto. Os autores encontraram nas vísceras de peixes (*Melanotaenia eachamensis*) coletados de um tanque de criação de lagostas com constante floração de *C. raciborskii*, uma concentração de 1,2 µg CYN.g<sup>-1</sup>, sendo que o valor máximo de toxina encontrado na água foi de 598 µg CYN.L<sup>-1</sup> (concentração de CYN total – frações intracelular e extracelular). Já nos tecidos de lagostas (*Cherax quadricarinatus*) coletadas no mesmo tanque, foi observada uma concentração de 4,3 µg CYN.g<sup>-1</sup> no hepatopâncreas e 0,9 µg CYN.g<sup>-1</sup> no tecido muscular. No mesmo estudo, lagostas daquele tanque foram expostas durante 14 dias, à diferentes concentrações de extrato celular (máximo de 568 µg CYN.L<sup>-1</sup>) da cepa de *C. raciborskii* isolada daquele tanque, e foi observado que o acúmulo de toxina tanto no hepatopâncreas, quanto no tecido muscular do animal, eram dose-dependentes sendo que as maiores concentrações de toxina no hepatopâncreas (1,0 µg CYN.g<sup>-1</sup>) foram aproximadamente cinco vezes maior do que as maiores concentrações de CYN encontradas no tecido muscular (0,2 µg CYN.g<sup>-1</sup>). Entretanto, quando as lagostas foram expostas à culturas vivas de células (2 x 10<sup>6</sup> células/mL - 128 µg CYN.L<sup>-1</sup>), também por 14 dias, o acúmulo da toxina foi, proporcionalmente, maior tanto no tecido muscular (0,12 µg CYN.g<sup>-1</sup>) quanto no hepatopâncreas (0,54 µg CYN.g<sup>-1</sup>) em relação aos animais expostos ao extrato celular. Esse resultado indica que os animais expostos a células vivas acumularam mais toxina do que os animais expostos ao extrato celular.

Resultados diferentes ocorreram no presente estudo, já que as tilápias expostas ao extrato celular contendo cilindrospermopsina, tiveram um acúmulo de toxina, proporcionalmente, maior do que os animais expostos a células íntegras de *C. raciborskii*. Entretanto, as lagostas foram expostas ao extrato celular dissolvido na água, diferentemente das tilápias que tiveram de ingerir a toxina através do alimento, e esse pode ter sido um fator preponderante na absorção da toxina. Outro fator que pode ser considerado importante é o fato de que as tilápias ingeriam a toxina, tanto extrato celular quanto células íntegras, juntamente com a ração, diferentemente das lagostas que não tinham outra fonte alimentar. Isso também pode ter influenciado, de alguma forma, a absorção da toxina.

Soares *et al.*, (2004) expuseram tilápias a microcistinas em alimentos contendo ração e também sem a ração, e verificaram que a maior absorção da toxina ocorreu no tecido muscular dos animais expostos a toxina sem ração. Os autores indicam que, provavelmente, deve ter havido competição pela absorção entre a toxina e os nutrientes presentes na ração, sendo que os nutrientes, de alguma forma, foram favorecidos.

Em teoria, o extrato celular torna a toxina mais disponível para a absorção, entretanto, no caso dos peixes que ingeriram a toxina oralmente, essa toxina também se torna mais disponível à ação dos ácidos e enzimas presentes no trato gastro-intestinal dos animais, possibilitando a degradação da toxina. No entanto a ração presente nesse alimento, possivelmente, auxiliou na absorção da toxina, o que não ocorreu nas lagostas expostas ao extrato celular.

Os baixos percentuais de acúmulo observados no presente estudo corroboram alguns estudos da literatura. Soares *et al.*, (2004) estudaram o acúmulo e a depuração de microcistinas em tecidos de *Tilapia rendalli* expostas a condições semelhantes. Os autores observaram que, tanto no músculo quanto nas vísceras, os percentuais de acúmulo da toxina

foram extremamente baixos, não chegando a ultrapassar o valor de 3% em relação ao valor máximo de toxina oferecido ( $29,2 \mu\text{g}$  microcistina  $\cdot\text{g}^{-1}$  peixe.dia<sup>-1</sup>). O mesmo pode-se observar com as tilápias do presente estudo (*Oreochromis niloticus*) expostas à cilindropermopsina, onde o percentual de acúmulo não foi superior a 1,6% nas vísceras e não chegando a 1% nos músculos em relação ao total oferecido ( $2,7 \mu\text{g}$  CYN.g<sup>-1</sup> peixe.dia<sup>-1</sup>). Em estudos com *Daphnia magna*, Nogueira *et al.* (2004), verificaram que do total de cilindropermopsina a que os organismos foram expostas ( $0,28 \mu\text{g}$  CYN.L<sup>-1</sup>) somente 0,02 ng CYN.animal<sup>-1</sup> foram encontrados.

Alguns estudos com microcistinas (Pflugmacher *et al.*, 1998) explicam que esse fato ocorre devido ao rápido e eficiente processo de detoxificação, mediado pelas enzimas da fase II desse processo (Glutathione S-transferase – sGST) que parecem ser o primeiro passo no processo de eliminação destas toxinas. Além disso, esse mesmo fato pode explicar a oscilação da toxina ao longo dos dias de exposição. Trabalhos com diferentes organismos demonstram que há um significativo aumento na expressão dessas enzimas quando um organismo é exposto a microcistina (Bulera *et al.*, 2001; Gehring *et al.*, 2004).

Outros estudos (Runnegar *et al.* (1994); (1995) indicam que as enzimas do complexo Citocromo P450 (CYP450 -fase I) também são responsáveis pelos processos de eliminação dessas toxinas, entretanto, Wang *et al.*, (2006) verificaram que a exposição a microcistina não altera a expressão das enzimas desse complexo, indicando a fase II (GST) como a principal via de detoxificação de cianotoxinas em tilápias (*Oreochromis niloticus*). Esse fato, ainda não foi bem elucidado para a cilindropermopsina, visto que, em estudos feitos com camundongos (Runnegar *et al.*, 1994; 1995) mostram que esses animais quando expostos a essa toxina, têm a expressão de sGST diminuída. Além disso, essa toxina tem sua toxicidade aumentada quando em contato com as enzimas do complexo CYP450 (fase I

do processo de detoxificação) (Runnegar *et al.*, 1995; Shaw *et al.*, 2000). Portanto, mais estudos são necessários para elucidar os processos de biotransformação da CYN pela CYP450 e a participação das enzimas GST nos possíveis processos de detoxificação desses metabólitos. Outro fator a ser levado em consideração é que por se tratar de ser uma molécula extremamente hidrossolúvel, a cilindrospermopsina pode ser facilmente eliminada através da urina.

Em outro estudo, Saker *et al.*, (2004) estudaram o acúmulo e depuração de CYN em tecidos de mexilhões por 32 dias (16 dias de acúmulo e 16 dias de depuração). Os autores expuseram os animais à células vivas de *C. raciborskii* produtora de cilindrospermopsina com concentrações de toxina que variaram de 14 a 90  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Os valores encontrados na hemolinfa (408  $\mu\text{g} \cdot \text{CYN} \cdot \text{L}^{-1}$ ) foram muito superiores às concentrações oferecidas, indicando a bioacumulação dessa toxina. Além disso, no final do período de depuração desse experimento, 50% da toxina ainda permanecia nos tecidos do animal. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo com as tilápias, visto que os valores encontrados na fase de depuração são muito parecidos com os valores encontrados na fase de acúmulo. Esse fato não é muito bem entendido, já que não se sabe ao certo quais as enzimas são responsáveis pelo processo de detoxificação dessa toxina (item discutido anteriormente).

A detecção destas cianotoxinas pode ser, muitas vezes, subestimada pelo método de ELISA, já que toxinas detectáveis por essa metodologia são as toxinas livres, isto é, não conjugadas, fato este, que pode estar ocorrendo nesse experimento.

Estudos envolvendo exposição a extratos tóxicos ou células vivas têm sido feitos para tentar elucidar de que maneira a forma como a toxina é disponibilizada ao animal pode influenciar na sua absorção. White *et al.*, (2006) avaliaram a bioacumulação de CYN

provenientes de extrato tóxico (contendo CYN) e células vivas, em tecidos de caramujos (*Melanoides tuberculata*) ao longo de 14 dias de exposição. Os autores observaram que a bioacumulação foi bem evidente tanto no extrato tóxico quanto na exposição à células vivas e, além disso, os animais que foram expostos ao extrato celular tóxico apresentaram concentrações de toxinas nos tecidos muito menores que os animais que foram expostos a células vivas.

Em outro estudo (White *et al.*, 2007), os autores avaliaram a exposição de girinos de *Bufo marinus* a extrato celular tóxico contendo CYN (tempo de exposição de 15 dias) em concentrações que variaram de 0 – 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , além de células vivas de cianobactérias produtoras de CYN em concentrações que variaram de 0 – 232  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (tempo de exposição de 8 dias). Os resultados mostraram que os animais expostos ao extrato tóxico não tiveram mortalidade ao longo do experimento ao passo que os que foram expostos a células vivas apresentaram 66% em taxa de mortalidade. Com relação ao acúmulo da toxina nos tecidos, os autores observaram que os animais expostos às células vivas tiveram em 15 vezes a concentração aumentada nos tecidos em relação aos animais expostos ao extrato tóxico, apesar da concentração de toxina ter sido quase a metade da oferecida no extrato celular.

Resultados diferentes da pesquisa apresentada acima foram observados no presente estudo, onde as tilápias que foram expostas a células de *C. raciborkii* tóxicas tiveram um acúmulo menor do que os animais os quais foram expostos ao extrato celular.

Em teoria, como discutido anteriormente, o extrato celular torna a toxina mais disponível para o animal, entretanto, mais susceptível para a ação dos ácidos e enzimas digestivas dos seus consumidores. Além disso, a velocidade de absorção da toxina presente no extrato tóxico é maior do que a toxina que está presente no meio intracelular, já que a parede celular das células precisar ser digerida para que a toxina se torne disponível, isso

pode explicar o fato de que as maiores concentrações encontradas na exposição das tilápias ao extrato celular são as do primeiro dia de coleta (3º dia de exposição) ao passo que na exposição a células íntegras as maiores concentrações encontradas estão a partir do 3º dia de coleta (9º dia de exposição).

De alguma forma, a toxina que foi disponibilizada para as tilápias através do extrato celular foi absorvida de maneira mais eficiente do que as toxinas que foram disponibilizadas através de células íntegras. Além dos fatores citados anteriormente, essa absorção pode ter sido facilitada pelo fato da molécula de CYN ter um baixo peso molecular e, portanto, ser facilmente carregada por difusão simples (Chong *et al.*, 2002).

#### **4.9 – Avaliação do potencial de risco para o consumo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) contaminadas com cilindrospermopsina**

O consumo de pescado contaminado por cilindrospermopsina torna-se um risco para a população humana já que essas toxinas causam danos ao DNA e possuem um potencial carcinogênico e mutagênico (Humpage *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002).

Os resultados dos experimentos anteriores demonstram que há, embora em um percentual bastante baixo, um acúmulo de toxina no músculo desses animais. Como explanado na introdução desta dissertação, o consumo desse pescado vem aumentando no Brasil, portanto, avaliações desse tipo são de extrema importância para se verificar o possível papel deste animal como vetor de transferência da cilindrospermopsina para outros níveis da cadeia trófica, já que as concentrações utilizadas nesses experimentos são iguais ou menores que as concentrações encontradas nos ambientes naturais (Saker & Eaglesham, 1999).

Através de valores pré-estabelecidos de concentrações de efeito não-observável – CENO, Humpage & Falconer (2003) estabeleceram um valor diário de ingestão tolerável (IDT) para cilindropermopsina de  $0,03 \mu\text{g CYN.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  para uma pessoa de 60 Kg.

As tabelas III, IV, V e VI mostram os valores de IDT para três tipos de consumidores diferentes. O primeiro refere-se a uma pessoa adulta com mais de 60 quilos (um grupo crítico onde os consumidores ingerem 300 gramas de filé de peixe por dia), a segunda, é uma criança com 20 quilos e a terceira trata-se de uma ave (2 quilos) que consuma esse pescado contaminado. Vale ressaltar que o valor de IDT é proveniente de cálculos feitos com mamíferos, para aves não há nenhum estudo feito nesse sentido.

Tabela III: Valores de IDT referentes ao experimento 1A. A marcação em cor refere-se o potencial risco do consumidor para com o pescado contaminado.

MÚSCULO						
DIAS	Média conc. CYN (ng/g)	ng/300g	$\mu\text{g}/300\text{g}$	TDI (0,03 x 60 Kg) Adultos	TDI (0,03 x 20Kg) Crianças	TDI (0,03 x 2Kg) Aves
3	0,257	77,11	0,077	1,8	0,6	0,06
6	0,066	19,85	0,020	1,8	0,6	0,06
9	0,009	2,77	0,003	1,8	0,6	0,06
12	0,053	15,97	0,016	1,8	0,6	0,06
15	0,043	12,76	0,013	1,8	0,6	0,06

VÍSCERAS						
DIAS	Média conc. CYN (ng/g)	ng/300g	$\mu\text{g}/300\text{g}$	TDI (0,03 x 60 Kg) Adultos	TDI (0,03 x 20Kg) Crianças	TDI (0,03 x 2Kg) Aves
3	4,64	1391,21	1,39	1,8	0,6	0,06
6	1,33	400,48	0,40	1,8	0,6	0,06
9	1,47	440,86	0,44	1,8	0,6	0,06
12	2,12	634,77	0,63	1,8	0,6	0,06
15	1,42	426,13	0,43	1,8	0,6	0,06

Tabela IV: Valores de IDT referentes ao experimento 1B. A marcação em cor refere-se o potencial risco do consumidor para com o pescado contaminado.

MÚSCULO						
DIAS	Média conc. CYN (ng/g)	ng/300g	$\mu\text{g}/300\text{g}$	TDI (0,03 x 60 Kg) Adultos	TDI (0,03 x 20Kg) Crianças	TDI (0,03 x 2Kg) Aves
19	0,150	45,01	0,045	1,8	0,6	0,06
23	0,018	5,25	0,005	1,8	0,6	0,06
27	0,000	0,00	0,000	1,8	0,6	0,06
30	0,041	12,44	0,012	1,8	0,6	0,06

VÍSCERAS						
DIAS	Média conc. CYN (ng/g)	ng/300g	µg/300g	TDI (0,03 x 60 Kg) Adultos	TDI (0,03 x 20Kg) Crianças	TDI (0,03 x 2Kg) Aves
19	7,834	2350,07	2,35	1,8	0,6	0,06
23	0,198	59,54	0,06	1,8	0,6	0,06
27	1,771	531,25	0,53	1,8	0,6	0,06
30	2,126	637,73	0,64	1,8	0,6	0,06

Tabela V: Valores de IDT referentes ao experimento 2. A marcação em cor refere-se o potencial risco do consumidor para com o pescado contaminado.

MÚSCULO						
DIAS	Média conc. CYN (ng/g)	ng/300g	µg/300g	TDI (0,03 x 60 Kg) Adultos	TDI (0,03 x 20Kg) Crianças	TDI (0,03 x 2Kg) Aves
3	0,0170	5,09	0,0051	1,8	0,6	0,06
12	0,0053	1,59	0,0016	1,8	0,6	0,06
13	0,0059	1,76	0,0018	1,8	0,6	0,06
16	0,0066	1,99	0,0020	1,8	0,6	0,06
19	0,0170	5,09	0,0051	1,8	0,6	0,06
22	0,0185	5,55	0,0055	1,8	0,6	0,06

VÍSCERAS						
DIAS	Média conc. CYN (ng/g)	ng/300g	µg/300g	TDI (0,03 x 60 Kg) Adultos	TDI (0,03 x 20Kg) Crianças	TDI (0,03 x 2Kg) Aves
3	0,934	280,33	0,280	1,8	0,6	0,06
12	0,278	83,54	0,084	1,8	0,6	0,06
13	0,092	27,69	0,028	1,8	0,6	0,06
16	0,207	62,16	0,062	1,8	0,6	0,06
19	0,232	69,72	0,070	1,8	0,6	0,06
22	0,268	80,50	0,080	1,8	0,6	0,06

Tabela VI: Valores de IDT referentes ao experimento 3. A marcação em cor refere-se o potencial risco do consumidor para com o pescado contaminado.

MÚSCULO						
DIAS	Média conc. CYN (ng/g)	ng/300g	µg/300g	TDI (0,03 x 60 Kg) Adultos	TDI (0,03 x 20Kg) Crianças	TDI (0,03 x 2Kg) Aves
3	0,276	82,72	0,083	1,8	0,6	0,06
6	0,225	67,64	0,068	1,8	0,6	0,06
9	1,547	464,13	0,464	1,8	0,6	0,06
12	2,311	693,30	0,693	1,8	0,6	0,06
15	0,783	234,98	0,235	1,8	0,6	0,06

VÍSCERAS						
DIAS	Média conc. CYN (ng/g)	ng/300g	µg/300g	TDI (0,03 x 60 Kg) Adultos	TDI (0,03 x 20Kg) Crianças	TDI (0,03 x 2Kg) Aves
3	8,23	2469,0607	2,469	1,8	0,6	0,06
6	22,23	6669,1473	6,669	1,8	0,6	0,06
9	18,57	5570,5111	5,571	1,8	0,6	0,06
12	21,10	6329,6922	6,330	1,8	0,6	0,06
15	24,92	7476,4347	7,476	1,8	0,6	0,06

Pode-se observar que em nenhum dos três experimentos, foram encontrados valores de toxina no tecido muscular acima dos níveis aceitáveis para seres humanos ( $0,03 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ ), o que, teoricamente, não oferece risco à população consumidora. Porém, os efeitos dessa toxina em longo prazo ainda são pouco conhecidos e, além disso, não se sabe ao certo

qual a cinética desta molécula (CYN), que possui efeitos carcinogênicos, no que diz respeito aos processos de bioacumulação em seres humanos (Ibelings e Chorus, 2007).

O presente estudo teve como um dos objetivos, verificar o acúmulo de cilindropermopsina, em tilápias, proveniente de cultura de células, entretanto, sabe-se que outros organismos, por exemplo, em moluscos (Saker *et al.*, 2004), que fazem parte da dieta de peixes onívoros (Ciclídeos, por exemplo), são capazes de acumular toxinas em valores muito mais altos dos que os valores encontrados nesses experimentos, aumentando a possibilidade de acúmulo dessas toxinas nesses animais (peixes) que consomem esses organismos e potencializando a transferência para níveis superiores da cadeia trófica.

Os níveis encontrados nas vísceras estão, em muitas vezes, acima desse valor de IDT para adultos, crianças e aves. É válido lembrar que apesar das vísceras não serem consumidas por seres humanos, já que o produto principal de consumo é o filé do pescado, esse conjunto de órgãos é, de fato, fonte de alimento de outros seres, como por exemplo, as aves, representando um risco para a saúde desses animais e para outros níveis da cadeia trófica.

Apesar dos resultados dos experimentos não apresentarem, em sua grande maioria, valores de IDT, no tecido muscular, acima do recomendado, é válido ressaltar que, em condições naturais de florações, os peixes ficam expostos por muito mais tempo a essas toxinas. Além disso, o resultado do experimento de depuração da toxina (experimento 2) nos mostra que mesmo após o cessar de ingestão de toxina, as concentrações desta molécula no tecido muscular se mantém, não se sabendo por quanto tempo. Por isso são fundamentais estudos que elucidem o tempo de permanência dessa toxina nos tecidos do animal, além de outros fatores relacionados com o processo de detoxificação dessa toxina e seus efeitos em organismos aquáticos, principalmente em peixes adultos.

## **5. CONCLUSÕES:**

1. As tilápias juvenis (*Oreochromis niloticus*), parecem ter seu crescimento anulado quando expostas, por 15 dias, a baixas concentrações de extrato celular contendo cilindrospermopsina. Quando esses animais são expostos por mais tempo (30 dias) à concentrações semelhantes de toxina, a mesma parece não influenciar nesse crescimento.
2. No entanto, quando expostas a células íntegras de *C. raciborskii* tóxica à baixas concentrações de toxina as tilápias parecem não ter seu crescimento suprimido ou aumentado. Apesar desses resultados, não nos permitimos concluir que a cilindrospermopsina seja ela proveniente de extrato celular ou células íntegras, tenha algum tipo de influência no crescimento de tilápias em nossas condições experimentais.
3. Os animais, ao ingerirem extrato celular de *C. raciborskii* tóxica, acumulam a toxina nos músculos e nas vísceras, mesmo que em baixos percentuais, sendo detectáveis desde o terceiro dia de exposição.
4. A concentração de toxina oscila ao longo do tempo de exposição e isso pode estar relacionado com o processo de detoxificação do animal.
5. Nos experimentos com extrato celular tóxico, as tilápias tiveram seu maior acúmulo, tanto no tecido muscular quanto nas vísceras, no terceiro dia de

- experimento, com exceção das vísceras no experimento 1B, que teve seu maior acúmulo no décimo nono dia de experimento.
6. Mesmo após o cessar da oferta de toxina aos animais, essas permanecem nos tecidos das tilápias por, pelo menos, dez dias após a interrupção da ingestão de cilindrospermopsina.
  7. Os animais expostos à células íntegras de *C. raciborskii* são capazes de acumular cilindrospermopsina em seus tecido muscular e nas vísceras.
  8. Apesar das concentrações de toxina nos tecidos (músculo e vísceras) terem sido mais altas nos experimentos com ingestão de células íntegras, os animais expostos ao extrato celular tóxico acumulam uma concentração de toxina, proporcionalmente maior do que os animais expostos a células de *C. raciborskii*.
  9. A ingestão de toxina tanto em extrato tóxico quanto em células íntegras, não causou mortalidade dos animais ao longo dos tempos de exposição.
  10. Apesar das tilápias juvenis não acumularem cilindrospermopsina em seus tecidos acima dos valores permitidos para consumo humano, esses animais podem ser vetores dessa toxina para cadeia trófica.
  11. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de acúmulo, detoxificação e efeitos dessa toxina, principalmente, em organismos aquáticos.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

Banker, R., S. Carmeli, et al. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology*, v.33, n.4, Aug, p.613-616. 1997.

Bernard, C., M. Harvey, et al. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C-raciborskii* strain. *Environmental Toxicology*, v.18, n.3, Jun, p.176-186. 2003.

Bessanezi, R.C.; Ferreira Jr, W.C. Equações diferenciais com Aplicações. Editora HARBRA, 1988.

Best, J. H., S. Pflugmacher, et al. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v.60, n.3-4, Oct, p.223-231. 2002.

Beveridge, M. C. M., D. J. Baird, et al. Grazing Rates on Toxic and Nontoxic Strains of Cyanobacteria by *Hypophthalmichthys-Molitrix* and *Oreochromis-Niloticus*. *Journal of Fish Biology*, v.43, n.6, Dec, p.901-907. 1993.

Bourke, A.T.C.; Hawes, R.B.; Neilson, A.; Stalman, N.D. An outbreak of hepato enteritis (the palm Island Mystery disease) possibly caused by algal intoxicatio. *Toxicon*, v.3, p.45-48, 1983.

Bouvy, M.; Molica, R.; Oliveira, S.; Marinho, M.; Becker, B. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquatic Microbil. Ecol.* 20:285-297, 1999.

Bradberry, S.M.; Dickers, K.J.; Rice, P., Griffiths, G.D.; Vale, J.A. 2003. Ricin poisoning. *Toxicol. Ver.* 22, 65-70.

Branco, C.W.C.; Senna, P.A. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* the Paranoá reservoir, Brasília, Brasil. *Algological studies*, v. 75, p.85-96, 1994.

Brilhante, O. M. e L. Q. D. A. Caldas. Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental. Rio de Janeiro - RJ: Editora Fiocruz. 1999. 155 p.

Bulera. RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays (vol 33, pg 1239, 2001). *Hepatology*, v.34, n.4, Oct, p.853-853. 2001.

Byth, S. Palm Island Mystery Disease. *Medical Journal of Australia*, v.2, n.1, p.40-42. 1980.

Carbis, C. R., G. T. Rawlin, et al. 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*, v.20, n.2, Mar, p.81-91. 1997.

Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – The cyanotoxins. *Journal Applied Bacteriology* 72: 445-459.

Carmichael, W.W. 1994. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*, 270 (1): 64-72.

Carmichael, W. W., S. Azevedo, et al. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, v.109, n.7, Jul, p.663-668. 2001.

Cazenave, J., D. A. Wunderlin, et al. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis* - A field and laboratory study. *Aquatic Toxicology*, v.75, n.2, Oct, p.178-190. 2005.

Chen, J. e P. Xie. Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic Lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. *Environmental Toxicology*, v.20, n.6, Dec, p.572-584. 2005.

\_\_\_\_\_. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon*, v.45, n.5, Apr, p.615-625. 2005.

Chen, J., P. Xie, et al. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in a freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Environmental Pollution*, v.134, n.3, Apr, p.423-430. 2005.

Chiswell, R. K., G. R. Shaw, et al. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environmental Toxicology*, v.14, n.1, Feb, p.155-161. 1999.

Chong, M. W. K., B. S. F. Wong, et al. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophytomin in primary rat hepatocytes. *Toxicon*, v.40, n.2, Feb, p.205-211. 2002.

Chorus, I. & Bartram, J. (1999). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, E & FN Spon, London.

Costa, S. M. D., V. Huszar, et al. First occurrence of cyanotoxins in fish ponds from Rio de Janeiro. *International Conference on Toxic Cyanobacteria*. Angra dos Reis, RJ. 5-10 august, 2007. 142 p.

Eaglesham, G. K., R. L. Norris, et al. Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, for public health purposes. *Environmental Toxicology*, v.14, n.1, Feb, p.151-154. 1999.

Falconer, I.R. Algal toxins and Human Health. In: Hrubec J, editor. *The handbook of Environmental Chemistry – Vol. 5 – Part C – Quality and Treatment of drinking water II*. Springer-Verlag. Berlin; 1998. p.53-82.

Falconer, I. R., S. J. Hardy, et al. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environmental Toxicology*, v.14, n.1, Feb, p.143-150. 1999.

Fischer, W. J. e D. R. Dietrich. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.164, n.1, Apr, p.73-81. 2000.

Fitzsimmons, K. 2000. TILAPIA : The most important aquaculture species of the 21st Century. Pp. 3-8. In: *Tilapia in the 21st Century: Proceedings of the Fifth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Editor, Fitzsimmons, K. 2000. Ministry of Agriculture, Brazil. Rio de Janeiro.

Freitas, J. V. F.; Gurgel, J. J. S. Estudos experimentais sobre a conservação da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L., 1766) Trewavas, armazenada no gelo. *Boletim Técnico do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca*, v. 42, n.2, p.153-178, 1984.

Fryer, G. e T. D. Iles. *The cichlid fishes of the Great Lakes of Africa: Their biology and evolution*. . UK. 1972. 656 p.

Galvão, J, et al. Investigation on the Bioaccumulation of Paralytic Shellfish Poisoning toxins in tilapia *Oreochromis niloticus* to the human consumption. International conference on toxic cyanobacteria. Angra dos Reis, RJ. 5 -10 august, 2007. 142 p.

Gehringer, M. M., E. G. Shephard, et al. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.36, n.5, May, p.931-941. 2004.

Gomes, A. M. D. A. Impacto da atividade de piscicultura intensiva e da adição de nutrientes inorgânicos (N e P) na qualidade do reservatório de Ribeirão das Lages - RJ. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005. 81 p.

Gomes, A. M. D. A., M. M. Marinho, et al. The success of *Cylindrospermopsis* at Brazilian aquatic system. International Conference on Toxic Cyanobacteria. Angra dos Reis, RJ. 5-10 august, 2007. 142 p.

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.

Griffiths, D. J. e M. L. Saker. The palm island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*, v.18, n.2, Apr, p.78-93. 2003.

Gurgel, J.J.S & Fernando, C.H. Fisheries in semi-arid Northeast Brazil with special reference to the role of tilapias. *Int. Rev. Gesmat. Hydrobiol.* Vol. 79, no. 1. 1994.

Harada, K., I. Ohtani, et al. Isolation of Cylindrospermopsin from a Cyanobacterium Umezakia Natans and Its Screening Method. *Toxicon*, v.32, n.1, Jan, p.73-84. 1994.

Hawkins, P. R., M. T. C. Runnegar, et al. Severe Hepatotoxicity Caused by the Tropical Cyanobacterium (Blue-Green-Alga) Cylindrospermopsis-Raciborskii (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju Isolated from a Domestic Water-Supply Reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, v.50, n.5, p.1292-1295. 1985.

Hooser, S. B., V. R. Beasley, et al. Actin Filament Alterations in Rat Hepatocytes Induced In vivo and In vitro by Microcystin-Lr, a Hepatotoxin from the Blue-Green-Alga, *Microcystis aeruginosa*. *Veterinary Pathology*, v.28, n.4, Jul, p.259-266. 1991.

Huet, M. Tratado de piscicultura. 2ª. Ed. Madrid: Edicione, Mundi-Prensa, 1973. 728 p.

Humpage, A. R. e I. R. Falconer. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology*, v.18, n.2, Apr, p.94-103. 2003.

Humpage, A. R., M. Fenech, et al. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v.472, n.1-2, Dec, p.155-161. 2000.

Huszar, V.L.M.; Silva, L.H.S. Marinho, M.; Domingos, P.; Sant'anna, C.L. Cyanoprokariote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiologia*, v.424, p. 66-77, 2000.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais, 2004. Estatística da Pesca – Ano de 2002. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursospesqueiros/downloads/estati2002.zip>. Acesso em outubro de 2007.

Ibelings, B. W. e I. Chorus. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, v.150, n.1, Nov, p.177-192. 2007.

Jang, M. H., K. Ha, et al. Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. *Aquatic Toxicology*, v.68, n.1, May, p.51-59. 2004.

Jardim, F.A.; Fonseca, Y.M.F.; Azevedo, S.F.M.O. A ocorrência de *Microcystis viridis* e *Cylindrospermopsis raciborskii* tóxicas em um manancial da COPASA – MG: VII Reunião Brasileira de Ficologia. Porto de Galinhas, PE, p. 167, 1999.

Kaebnick M. & Neilan B.A., Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production, *FEMS Microbiology Ecology* 35 (2001), pp. 1–9.

Kankaanpaa, H. T., J. Holliday, et al. Cyanobacteria and prawn fanning in northern New South Wales, Australia - a case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.203, n.3, Mar, p.243-256. 2005.

Kinnear, S. H. W., L. J. Duivenvoorden, et al. Sublethal responses in *Melanoides tuberculata* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* containing cylindrospermopsin. *Harmful Algae*, v.6, n.5, Oct, p.642-650. 2007.

Kennish, M.J. 1990. *Ecology of estuaries: Anthropogenic Effects*. CRC Press, Boca Raton. 494p.

Kiss, T., A. Vehovszky, et al. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, v.131, n.2, Feb, p.167-176. 2002.

Kómarkóva, J.; Laudares-Silva, R.; Senna, P.A.C. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. *Algological Studies* 94: 207-222, 1999.

Li, R. H., W. W. Carmichael, et al. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, v.37, n.6, Dec, p.1121-1126. 2001.

Li, X. Y., I. K. Chung, et al. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon*, v.44, n.8, Dec, p.821-827. 2004.

Lindsay, J., J. S. Metcalf, et al. Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia* spp. by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon*, v.48, n.8, Dec, p.995-1001. 2006.

Lovshin, L.L.; Cyrino, J.E.P. Status of commercial fresh waterfish culture in Brazil. In: simpósio sobre manejo e nutrição de peixes, 2., 1998, Piracicaba. *Anais...Piracicaba: CBNA*, 1998. p.1-20.

Magalhaes, V.F.; Soares, R.M. & Azevedo, S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk, *Toxicon* 39 (2001), pp. 1077–1085.

Magalhaes, V.F.; Marinho, M.M.; Domingos, P.; Oliveira, A.C.; Costa, S.M.; Azevedo, L.O. & Azevedo, S.M.F.O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ), *Toxicon* 42 (2003), pp. 289–295.

Malbrouck, C. e P. Kestemont. Effects of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.25, n.1, Jan, p.72-86. 2006.

Malbrouck, C., G. Trausch, et al. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, v.135, n.1, May, p.39-48. 2003.

- Metcalf, J. S., J. Lindsay, et al. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon*, v.40, n.8, Aug, p.1115-1120. 2002.
- Mohamed, Z.A.; Carmichael, W.W. & Hussein,A.A. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom, *Environmental Toxicology* 18 (2003), pp. 137–141.
- Moreira, A. A. e R. Bizi. Analysis of cylindrospermopsin in water with liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS/MS). International Conference on Toxic Cyanobacteria. Angra do Reis, Rio de Janeiro. 5-10 august, 2007. 142 p.
- Nogueira, I. C. G., A. Lobo-Da-Cunha, et al. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium. *Aquatic Toxicology*, v.80, n.2, Nov, p.194-203. 2006.
- Nogueira, I. C. G., M. L. Saker, et al. Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis radborskii* to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology*, v.19, n.5, Oct, p.453-459. 2004.
- Norris, R. L. G., A. A. Seawright, et al. Distribution of C-14 Cylindrospermopsin in vivo in the mouse. *Environmental Toxicology*, v.16, n.6, Dec, p.498-505. 2001.
- Ohta, T., E. Sueoka, et al. Nodularin, a Potent Inhibitor of Protein Phosphatase-1 and Phosphatase-2a, Is a New Environmental Carcinogen in Male F344 Rat-Liver. *Cancer Research*, v.54, n.24, Dec, p.6402-6406. 1994.
- Ohtani, I., R. E. Moore, et al. Cylindrospermopsin - a Potent Hepatotoxin from the Blue-Green-Alga *Cylindrospermopsis-Raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*, v.114, n.20, Sep, p.7941-7942. 1992.
- Pflugmacher, S., C. Wiegand, et al. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, v.1425, n.3, Nov, p.527-533. 1998.
- Preussel, K., A. Stuken, et al. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon*, v.47, n.2, Feb, p.156-162. 2006.
- Reynolds, C.S. 1984. *The Ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge, Cambridge University press. 384p.
- Reisner, M., S. Carmeli, et al. The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice. *Toxicological Sciences*, v.82, n.2, Dec, p.620-627. 2004.
- Rinehart, K.L. Namikoshi, M., Choi, B.M. Structure and Biosynthesis of toxins of blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of applied Phycology*, 1994. 6:159.

Rinehart, K. L., K. Harada, et al. Nodularin, Microcystin, and the Configuration of Adda. *Journal of the American Chemical Society*, v.110, n.25, Dec, p.8557-8558. 1988.

Roche, K. F. e O. Rocha. *Ecologia trófica de peixes (com ênfase na plactivoria em ambientes lênticos de água doce do Brasil)*. São Carlos - SP: Editora Rima. 2005. 146 p.

Rogers, E. H., R. D. Zehr, et al. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicon*, v.49, n.6, May, p.855-864. 2007.

Runnegar, M. T., S. M. Kong, et al. The Role of Glutathione in the Toxicity of a Novel Cyanobacterial Alkaloid Cylindrospermopsin in Cultured Rat Hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.201, n.1, May, p.235-241. 1994.

\_\_\_\_\_. Inhibition of Reduced Glutathione Synthesis by Cyanobacterial Alkaloid Cylindrospermopsin in Cultured Rat Hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, v.49, n.2, Jan, p.219-225. 1995.

Saker, M. L. e G. K. Eaglesham. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon*, v.37, n.7, Jul, p.1065-1077. 1999.

Saker, M. L., J. S. Metcalf, et al. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon*, v.43, n.2, Feb, p.185-194. 2004.

Sant'anna, C.L. & Azevedo, M.T.P. 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71 (3-4): 359-385.

Schembri, M. A., B. A. Neilan, et al. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*, v.16, n.5, Oct, p.413-421. 2001.

Seawright, A. A., C. C. Nolan, et al. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environmental Toxicology*, v.14, n.1, Feb, p.135-142. 1999.

Seifert, M., G. McGregor, et al. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gornont) *Speziale and Dyck. Harmful Algae*, v.6, n.1, Jan, p.73-80. 2007.

Shaw, G. R., A. A. Seawright, et al. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: Evaluation of its toxicologic activity. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.22, n.1, Feb, p.89-92. 2000.

Shaw, G. R., A. Sukenik, et al. Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environmental Toxicology*, v.14, n.1, Feb, p.167-177. 1999.

Shen, Q., J. Hu, et al. Investigation on intake, accumulation and toxicity of microcystins to silver carp. *Fresenius Environmental Bulletin*, v.14, n.12A, p.1124-1128. 2005.

Shen, X. Y., P. K. S. Lam, et al. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon*, v.40, n.10, Oct, p.1499-1501. 2002.

Siqueira, Alessandra Aparecida Zilo Cozzo de. Efeitos da Irradiação e Refrigeração na Qualidade e no Valor Nutritivo da Tilápia (*Oreochromis niloticus*). 2001. 137p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2001.

Sipia, V. O., O. Sjøvall, et al. Analysis of nodularin-R in eider (*Somateria mollissima*), roach (*Rutilus rutilus* L.), and flounder (*Platichthys flesus* L.) liver and muscle samples from the western Gulf of Finland, northern Baltic Sea. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.25, n.11, Nov, p.2834-2839. 2006.

Soares, R. A., V. F. Magalhaes, et al. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, v.70, n.1, Oct, p.1-10. 2004.

Soares, R. M. Acúmulo, depuração e efeito de microcistinas (hepatotoxinas de cianobactérias) em *Tilapia rendalii* (Cichlidae). Departamento de Ecologia, UFRJ, Rio de Janeiro, 1999. 76 p.

Starling, F. L. R. M. 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). *Acata Limnologica Brasiliensia* VI: 144-156 (1993).

Sukenik, A., M. Reisner, et al. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: Long-term exposure to low doses. *Environmental Toxicology*, v.21, n.6, Dec, p.575-582. 2006.

Terao, K., S. Ohmori, et al. Electron-Microscopic Studies on Experimental Poisoning in Mice Induced by Cylindrospermopsin Isolated from Blue-Green-Alga *Umezakia Natans*. *Toxicon*, v.32, n.7, Jul, p.833-843. 1994.

Tundisi, J.G. & Matsumura-Tundisi, T. Eutrophication of lakes and reservoirs: a comparative analysis, case studies, perspectives. In: M. Cordeiro-Marinho, M.T.P. Azevedo, C.L. Santana, N.Y. Tomita and E.M. Plastino, Editors, *Algae and Environment: A General Approach*, Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo (1992), pp. 1–33.

Van Buynder, P. G., T. Oughtred, et al. Nodularin uptake by seafood during a cyanobacterial bloom. *Environmental Toxicology*, v.16, n.6, Dec, p.468-471. 2001.

Von Sperling, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. DESA-UFMG. 1996.

Wang, L., X. F. Liang, et al. Structural and functional characterization of microcystin detoxification-related liver genes in a phytoplanktivorous fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, v.144, n.3, Nov, p.216-227. 2006.

Welker, M., H. Bickel, et al. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin - opportunities and limits. *Water Research*, v.36, n.18, Nov, p.4659-4663. 2002.

White, S. H., L. J. Duivenvoorden, et al. Influence of intracellular toxin concentrations on cylindrospermopsin bioaccumulation in a freshwater gastropod (*Melanoides tuberculata*). *Toxicon*, v.47, n.5, Apr, p.497-509. 2006.

\_\_\_\_\_. Mortality and toxin bioaccumulation in *Bufo marinus* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* cell extracts and live cultures. *Environmental Pollution*, v.147, n.1, May, p.158-167. 2007.

Wood, S. A., L. R. Briggs, et al. Changes in concentrations of microcystins in rainbow trout, freshwater mussels, and cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu. *Environmental Toxicology*, v.21, n.3, Jun, p.205-222. 2006.

Xie, L. Q., et al.. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environmental Pollution*, v.127, n.3, p.431-439. 2004.

Xie, L. Q., P. Xie, et al. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environmental Toxicology*, v.20, n.3, Jun, p.293-300. 2005.

\_\_\_\_\_. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environmental Pollution*, v.127, n.3, p.431-439. 2004.

Yokoyama, A. e H. D. Park. Depuration kinetics and persistence of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in the freshwater bivalve *Unio douglasiae*. *Environmental Toxicology*, v.18, n.1, Feb, p.61-67. 2003.

Yoo, R.S.; Carmichael, W.W.; Hoehn, R.C & Hrudey, S.E. Health Effects and Risk Assessment, In: AWWA Research Foundation and American Water Works Association, Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: a resource guide, Denver (1995) pp. 61–92.

Zhao, M., S. Q. Xie, et al. Effect of dietary cyanobacteria on growth and accumulation of microcystins in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.261, n.3, Dec, p.960-966. 2006.