

Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI
Instituto de Recursos Naturais – IRN
Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Letícia Lisboa Santiago

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E DE ACUMULAÇÃO INDUZIDOS
PELA CILINDROSPERMOPSINA (CIANOTOXINA) EM CHIRONOMUS
XANTHUS (DIPTERA - CHIRONOMIDAE)**

Itajubá, 2012

Letícia Lisboa Santiago

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E DE ACUMULAÇÃO INDUZIDOS
PELA CILINDROSPERMOPSINA (CIANOTOXINA) EM CHIRONOMUS
XANTHUS (DIPTERA - CHIRONOMIDAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Meio Ambiente e Recursos Hídricos, para obtenção do grau de mestre em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, sob a orientação do(a) Prof.(a) Ana Lucia Fonseca.

Itajubá, 2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Mauá –
Bibliotecária Margareth Ribeiro- CRB_6/1700

S594a

Santiago, Letícia Lisboa

Avaliação dos efeitos genotóxicos e de acumulação induzidos pela cilindrospermopsina (cianotoxina) em *Chironomus xanthus* (Diptera - Chironomidae) / Letícia Lisboa Santiago. -- Itajubá, (MG) : [s.n.], 2012.

67 p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Fonseca.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Genetoxicidade. 2. Ensaio cometa. 3. Cilindrospermopsina.
I. Fonseca, Ana Lúcia, orient. II. Universidade Federal de Itajubá.
III. Título.

Dedico esse trabalho ao meu pai, formador do meu caráter e responsável por me ensinar que a educação sempre foi o melhor caminho, você sempre estará presente na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu guia diário e por proporcionar as alegrias que alcanço.

A minha orientadora Ana Lucia Fonseca pelos ensinamentos, conselhos, amizade construída nesses anos e pelas inúmeras hospedagens oferecidas.

A Raquel Soares, minha co-orientadora e também amiga, pelos conhecimentos, disponibilidade, preocupação e pelas várias caronas.

As professoras Valéria Freitas de Magalhães e Eliane Guimarães Pereira Melloni por aceitarem o convite de participar da banca de defesa.

Aos alunos dos Laboratórios de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) e de Radioisótopos Eduardo Penna Franca (LREPF) da UFRJ/RJ e as alunas do Laboratório de Genética Toxicológica da ULBRA/RS, pela valiosa ajuda prestada.

Aos técnicos dos laboratórios da UNIFEI, Elaine, Paulo, João Vitor e João Luís pela contribuição a pesquisa.

Agradeço as amigas construídas durante o mestrado e que ficarão para sempre. Valeska e Nancy vocês tornaram divertidas as horas mais difíceis de estudo.

Agradeço ao Roberto de Mattos pela compreensão, oportunidade e aprendizado durante todos esses anos de convivência e a todos os colegas do Nicatec – FUNDAÇÃO ROGE.

A minha família que mesmo de longe me apoio e entendeu minha distância, amo muito vocês.

Ao meu marido Carlos, por me fazer acreditar e pela amizade, carinho, companheirismo e paciência demonstrados ao longo desses anos, e por ter me ensinado que no final tudo dá certo!

E a todos que de certa forma me ajudaram ou fizeram parte desse trabalho, muito obrigada.

As nuvens mudam sempre de posição, mas
são sempre nuvens no céu.
Assim devemos ser todo dia, mutantes,
porém leais com o que pensamos e sonhamos;
lembre-se, tudo se desmancha no ar,
menos o pensamento.

Paulo Baleki

RESUMO

A presença de florações de cianobactérias tóxicas nos ambientes aquáticos eutrofizados restringe o uso das águas, reduz a qualidade das mesmas e, conseqüentemente, afeta à biota aquática, incluindo os organismos bentônicos. O conhecimento dos efeitos de cianotoxinas nestes organismos e seus indicadores fisiológicos e celulares ainda são reduzidos. Atualmente, a cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, com distribuição nos ambientes aquáticos brasileiros tem sido investigada também pelo potencial em produzir cianotoxinas, incluindo cilindrospermopsina (CYN). Assim, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos genotóxicos e de acumulação de CYN em larvas do organismo bentônico *Chironomus xanthus* expostos a células de *C. raciborskii* produtora desta toxina. Foram avaliados os efeitos de acumulação de CYN nos organismos em um ensaio de exposição crônica (duração de 8 dias) à concentração equivalente à 10^6 cels.ml⁻¹ (condição de floração). Igualmente foram avaliados danos ao DNA, por meio de ensaio cometa nos organismos expostos a quatro tratamentos distintos durante 8 dias: Controle negativo (água de manutenção), Controle positivo (água de manutenção e 0,3 mg.L⁻¹ de cádmio), Tratamento A (água de manutenção e extrato celular de *C. raciborskii* equivalente a 10^3 cels.ml⁻¹) e Tratamento B (água de manutenção e extrato celular de *C. raciborskii* equivalente a $3,3 \times 10^4$ cels.ml⁻¹ – pré-floração). Os resultados indicaram que o acúmulo máximo de toxina nos organismos ocorreu nas primeiras 24 horas de exposição. Para o ensaio cometa foram avaliados os índices e frequência de danos, observando-se que os resultados foram significativamente maiores para o controle positivo (ID=223 ± 18 e FD=100 ± 0,45), tratamento A (ID=175 ± 4 e FD=94 ± 3) e tratamento B (ID=239 ± 22 e FD=100 ± 0,82), quando comparados ao controle negativo (ID=48 ± 4 e FD=41 ± 3), determinados pelo teste Post Hoc de Dunnet (p<0,05). Os resultados demonstraram a capacidade de acumulação de CYN com conseqüente dano ao DNA para os organismos-teste desde a concentração mais baixa, condição de pré-floração, o que pode a partir daí comprometer toda a população destes organismos bentônicos. Trata-se dos primeiros resultados da aplicação do ensaio cometa, bem como de acumulação de uma cianotoxina em larvas de *C. xanthus*, os quais poderão ser aplicados em outros estudos de avaliação de contaminantes ambientais, com ênfase para o compartimento sedimento.

Palavras-chave: Genotoxicidade; Ensaio Cometa; Cilindrospermopsina.

ABSTRACT

The presence of toxic cyanobacterial blooms in eutrophic freshwater ecosystems restricts the use of water, reduces their quality and therefore affect the aquatic biota, including benthic organisms. Knowledge of the effects of cyanotoxins in these organisms and their physiological and cellular indicators are still low. Currently, the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, with wide distribution in Brazilian aquatic environments has been investigated also by the potential to produce cyanotoxins, including cilindrospermopsin (CYN). Thus, this study aimed to evaluate the genotoxic effects and accumulation of CYN on larvae of benthic organism *Chironomus xanthus* cells exposed to *C. raciborskii* producing this toxin. The effects of accumulation of the test organisms CYN a chronic test (lasting eight days) of exposure to concentrations equivalent to 10^6 cels.ml⁻¹ (condition of flowering). Also DNA damage were evaluated, by the comet assay organisms exposed to four treatments during 8 days: negative control (water maintenance), a positive control (water maintenance and 0.3 mg.L⁻¹ cadmium), Treatment A (water and maintenance of *C. raciborskii* cell extract equivalent to 10^3 cels.ml⁻¹) and treatment B (water and maintenance cell extract *C. raciborskii* equivalent to $3,3 \times 10^4$ cels.ml⁻¹ initial bloom). The results indicated that the maximum accumulation of toxin in organisms occurred in the first 24 hours of exposure. For the comet assay were evaluated indices and frequency of damage, noting that the results were significantly higher for the positive control (ID = 223 ± 18 and FD = 100 ± 0.45), treatment A (ID = 175 ± 4 and DF = 94 ± 3), and treatment B (ID = 239 ± 22 and FD = 100 ± 0.82) compared to negative control (ID = 48 ± 4 and FD = 41 ± 3) determined by the test Post hoc Dunnett ($p < 0.05$). The results demonstrated the ability accumulation of CYN with consequent of DNA damage to the test organisms from the lower concentration, under pre-flowering, which thereafter can compromise the entire population of benthic organisms. This is the first results of applying the alkaline comet assay, as well as accumulation of a cyanotoxin larvae of *C. xanthus*, which can be applied in other studies assessing environmental contaminants, with emphasis on the sediment compartment.

Keywords: Genotoxicity; Comet assay; Cylindrospermopsin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema simplificado ilustrando os principais fatores envolvidos no processo de eutrofização (Fonte: Adaptado de NEMP, 2002).	17
Figura 2- Formas de organização de cianobactérias: (A) Colônia – <i>Microcystis aeruginosa</i> (1000x); (B) Unicelular – <i>Chroococcus</i> sp. (1000x) (C) Filamento – <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (1000x), a seta indica heterócito terminal (Fonte: SANT’ANNA <i>et al.</i> , 2006).	19
Figura 3- Esquema ilustrativo dos principais impactos de florações de cianobactéria. (Fonte: Adaptado de NEMP, 2002).	20
Figura 4 - Aspecto de floração de <i>Cylindrospermopsis</i> sp. (Fonte: BRASIL, 2003).....	21
Figura 5- Estrutura química da molécula de cilindrospermopsina (Fonte: SILVA, 2008).	23
Figura 6- Demonstração da classificação de danos em células de sangue de <i>Ctenomys torquatus</i> (A) Classe 0, sem dano; (B) Classe 1; (C)Classe 2; (D),Classe 3; (E)Classe 4, dano máximo; (F),Célula com apoptose. (Fonte: SILVA <i>et al.</i> , 2000).	28
Figura 7- Ciclo de vida de <i>Chironomus xanthus</i> . (A) Desova - ± 15mm de comprimento; (B) Larvas recém-nascidas – 0,099±0,005mm de largura da cápsula cefálica; (C) Larva no 2º ínstar – 0,150±0,161mm de largura da cápsula cefálica; (D) Estágio de pupa – 5,0-6,0mm; (E) Indivíduo adulto, fêmea – 4,4-5,2mm de comprimento total (Fonte: FONSECA, 1997).....	30
Figura 8- Cultivo de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Fonte: RESTANI, 2010).....	33
Figura 9- Bandeja de cultivo de <i>C. xanthus</i> . (A) Destaque para as gaiolas de contenção dos adultos; (B) Destaque para aeração e substrato (Fonte: SANTIAGO, 2012).....	34
Figura 10 - Representação esquemática do ensaio crônico realizado para avaliação de acumulação de CYN.....	35
Figura 11- Representação esquemática do ensaio crônico realizado para verificação de danos ao DNA.....	37
Figura 12- Cuba e fonte de eletroforese (Fonte: Letícia Lisboa Santiago).	38
Figura 13- Cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas (Fonte: Letícia Lisboa Santiago).	41
Figura 14 – Porcentagem de acumulação de CYN nos tecidos dos organismos expostos ao extrato celular tóxico e concentração de CYN na solução. Não houve diferença significativa entre os dados de acumulação (Kruskal-Wallis – $p < 0,05$).	45

Figura 15 – Valor médio de Índice de Dano (ID) do controle positivo e dos valores médios das concentrações de 10^3 e $3,3 \times 10^4$ cels.ml-1 CYN (**Valores significativamente diferentes em relação ao controle negativo ($P < 0,05$ – Dunnett’s Test)).	48
Figura 16 – Valor médio de Frequência de Dano (FD) do controle positivo e dos valores médios das concentrações de 10^3 e $3,3 \times 10^4$ cels.ml-1 CYN (**Valores significativamente diferentes em relação ao controle negativo ($P < 0,05$ – Dunnett’s Test)).	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características gerais das toxinas produzidas por cianobactérias, gêneros em que foram encontradas e mecanismos de ação.....	21
Tabela 2 – Granulometria do substrato utilizado no cultivo de <i>C. xanthus</i>	33
Tabela 3 - Programa de temperatura usado para determinação das concentrações de cádmio em água.....	42
Tabela 4 - Condições de operação para determinação de cádmio no espectrômetro de absorção atômica Analytik Jena ZEE nit 60.....	43
Tabela 5 – Valores de concentração de CYN ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) oferecida às larvas de <i>C. xanthus</i> ; peso seco das larvas tomados após liofilização (mg); concentração de CYN nas larvas após ensaios ($\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$) e porcentagem (%) de acúmulo de toxina, durante ensaio de exposição crônica.	44
Tabela 6 – Valores de concentração de CYN ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) oferecida às larvas de <i>C. xanthus</i> durante o ensaio crônico para detecção de danos ao DNA.	51
Tabela 7 - Concentração de cádmio ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) oferecida às larvas durante o ensaio crônico....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	GERAL	16
2.2	ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	EUTROFIZAÇÃO, CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS.....	17
3.1.1	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	21
3.1.2	<i>Efeitos de CYN em organismos aquáticos</i>	24
3.2	GENOTOXICIDADE	26
3.2.1	<i>Ensaio Cometa</i>	27
3.3	<i>CHIRONOMUS XANTHUS</i>	29
4	MATERIAL E MÉTODO	32
4.1	CULTIVO DE CEPAS DE <i>CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII</i> E EXTRAÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA (CYN)	32
4.2	CULTIVO DE <i>CHIRONOMUS XANTHUS</i>	33
4.3	ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA PARA AVALIAÇÃO DA ACUMULAÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA	34
4.4	ENSAIOS PRELIMINARES PARA DE VALIDAÇÃO DO ENSAIO COMETA - CÁDMIO E CILINDROSPERMOPSINA	36
4.5	ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA PARA DETECÇÃO DE DANOS AO DNA	36
4.6	ENSAIO COMETA	38
4.7	QUANTIFICAÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA (CYN) NO EXTRATO CELULAR E NOS ORGANISMOS	40
4.8	ANÁLISE DE CÁDMIO NA SOLUÇÃO UTILIZADA	41
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	ACUMULAÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA (CYN) NOS ORGANISMOS	44
5.2	ENSAIO COMETA	47
5.3	ANÁLISE DE CYN NAS SOLUÇÕES- ENSAIO COMETA.....	51

5.4	ANÁLISE DE CÁDMIO NAS SOLUÇÕES – ENSAIO COMETA.....	52
6	CONCLUSÕES.....	53
7	RECOMENDAÇÕES.....	54
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
10	ANEXOS	65
	ANEXO A: RESULTADOS ESTATÍSTICOS PARA O ENSAIO COMETA	65
	ANEXO B: CÉLULAS COM DANOS OBSERVADAS PARA OS TRATAMENTOS REALIZADOS.....	66
	ANEXO C: RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE CÁDMIO ANALISADAS E CURVA DE CALIBRAÇÃO.	67

1 INTRODUÇÃO

A degradação dos ambientes aquáticos decorrentes de ações humanas reduz a qualidade e restringe o uso das águas e, conseqüentemente, impede a utilização para determinados fins, entre eles o abastecimento público e a recreação. O fenômeno mais frequente nesses ambientes ligado principalmente às cargas poluidoras formadas por compostos nitrogenados e polifosfatados, são as florações de cianobactérias (BITTENCOURT-OLIVEIRA e MOLICA, 2003).

A alteração do equilíbrio ecológico nos ambientes aquáticos, provocado pelas florações destes microrganismos de ampla distribuição geográfica, em parte está relacionado ao fato de produzirem metabólitos secundários, denominados cianotoxinas (Oliveira, 2005). Tais compostos constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com diferentes propriedades toxicológicas. Pertencem a três classes químicas distintas: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos e, de acordo com sua ação farmacológica, são caracterizados como hepatotoxinas, neurotoxinas, dermatotoxinas e citotoxinas (CHORUS E BARTRAM, 1999; KAEBERNICK e NEILAN, 2001).

No Brasil, já foi registrada a ocorrência de 32 espécies de cianobactérias tóxicas, sendo 14 na região tropical e 27 na subtropical, com predominância dos gêneros *Microcystis* e *Cylindrospermopsis*. Esses gêneros são potencialmente produtores de hepatoxinas e ou neurotoxinas, respectivamente (SANT'ANNA *et. al*, 2008).

Atualmente *Cylindrospermopsis raciborskii* tem sido objeto de grande interesse para os pesquisadores, devido ao seu potencial em produzir toxinas, sendo no Brasil especialmente produtora de saxitoxina, e por ser um dos gêneros de ampla distribuição (SANT'ANNA *et. al*, 2008, GOMES *et al*, 2008, BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al*, 2011).

A maioria das cepas tóxicas de *C. raciborskii* isoladas de ecossistemas brasileiros, demonstrou ser produtora de saxitoxinas (MOLICA *et al.*, 2002; ZAGATTO *et al.*, 2012), o grupo das neurotoxinas, porém, nos ecossistemas de regiões temperadas tem sido registradas como produtoras de cilindrospermopsina (CYN) (SANT'ANNA *et al*, 2008). No Brasil, Bittencourt-Oliveira *et al.* (2011), demonstraram a presença de CYN em três reservatórios de abastecimento público de água do Nordeste: Jacazinho, Duas Unas e Arcoverde, entretanto, não foi possível determinar se a espécie responsável pela produção de CYN foi *C. raciborskii* ou *Aphanizomenoides haerospermopsis* (anteriormente denominada *Aphanizomenon aphanizomenoides* Forti).

Muitos organismos aquáticos (zooplâncton, macrófitas, macroinvertebrados bentônicos, peixes), entram em contato com cianotoxinas dissolvidas após lise celular, por ingestão de água ou por alimento contaminado (KINNEAR, 2010). Nestas duas situações os organismos bentônicos estão vulneráveis, acrescentado pelo fato de viverem parte do ciclo de vida, no sedimento, considerado como o compartimento de maior acúmulo de substâncias tóxicas (SILVANO, 2003).

A espécie bentônica nativa *Chironomus xanthus* foi estudada por Fonseca e Rocha (2004) como um potencial organismo a ser utilizado em ensaios de toxicidade com amostras de sedimento (DORNFELD, 2006, MORAIS *et. al.*, 2010 e NOVELLI, 2010). No entanto, poucas são as informações sobre os efeitos de cianotoxinas em organismos bentônicos (HUMPAGE, 2008).

Neste sentido, o estudo desenvolvido por Emygdio (2011) demonstrou que a exposição à concentração de microcistina (MCYST) e cilindrospermopsina (CYN) contida em 10^6 cels.ml⁻¹, equivalente a uma condição de floração normalmente encontrada nos ambientes eutrofizados, não provocou efeitos agudos e crônicos em larvas de *C. xanthus*, analisados pelos parâmetros sobrevivência e crescimento do corpo (largura da cápsula cefálica). Diante de tal resposta, um dos objetivos da presente dissertação foi avaliar se a concentração de CYN equivalente a 10^6 cels.ml⁻¹ provocaria efeitos em nível celular nas larvas de *C. xanthus*. Neste sentido, os ensaios de acumulação e posterior avaliação de dano do DNA (ensaio cometa) foram adotados para verificação destes efeitos após exposição crônica.

A utilização de estudos de genotoxicidade envolvendo cianotoxinas visa conhecer melhor o efeito de toxicidade crônica provocados por estas substâncias. Tais estudos são recentes, quando comparados aos já conhecidos efeitos agudos em mamíferos (LANKOFF e CARMICHAEL, 2006). Dentre os testes de genotoxicidade, o ensaio cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) é um ensaio capaz de detectar danos no DNA passíveis de reparo e possui como vantagem, a necessidade de um pequeno número de células, não necessariamente em divisão, e pode ser executado com qualquer organismo eucarioto (VILELLA *et al.*, 2003).

Cabe ressaltar que a escolha desta toxina deve-se ao fato da mesma ter um efeito citotóxico, como já observado em trabalhos com mamíferos (HUMPAGE *et al.*, 2000), e de haver maior necessidade de informações sobre essa molécula.

O principal desafio do uso de larvas de insetos no ensaio cometa foi o rompimento da camada de quitina, bem como o estabelecimento do número exato de organismos a serem expostos, visando à obtenção do número compatível de células.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a acumulação e os efeitos genotóxicos em *Chironomus xanthus* (Diptera-Chironomidae) expostos a células de *Cylindrospermopsis raciborskii* produtora de cilindrospermopsina - CYN (cianotoxina).

2.2 Específicos

- Desenvolver a metodologia do ensaio cometa com larvas de *C. xanthus*, utilizando o cádmio como controle positivo;
- Avaliar a acumulação da CYN na concentração equivalente a 10^6 cels.ml⁻¹ (condição de floração), após exposição crônica na solução utilizada e nas larvas de *C. xanthus*;
- Avaliar danos ao DNA (ensaio cometa) da CYN nas concentrações equivalentes a $3,3 \times 10^4$ cels.ml⁻¹ (início de floração) e de 10^3 cels.ml (pré-floração), após exposição crônica em larvas de *C. xanthus*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Eutrofização, cianobactérias e cianotoxinas

A partir da Revolução Industrial no século XVIII, a expansão da indústria contribuiu com os problemas de contaminação ambiental e esta alcançou um espaço importante nas pesquisas e discussões da sociedade. Além dos processos industriais, o constante crescimento da descarga de efluentes domésticos sem nenhum tratamento, devido à alta taxa de urbanização e a falta de saneamento básico (TUNDISI e TUNDISI, 1992 apud BRANDÃO e DOMINGOS, 2006), e a extensa utilização de fertilizantes na agricultura (COSTA, 2003), contribuem para o processo de eutrofização de rios, lagos, mananciais e represas.

A eutrofização é o processo de enriquecimento de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, nos ecossistemas aquáticos ultrapassando sua capacidade de assimilação (NEMP, 2002). A Figura 1 mostra os principais fatores envolvidos neste processo.

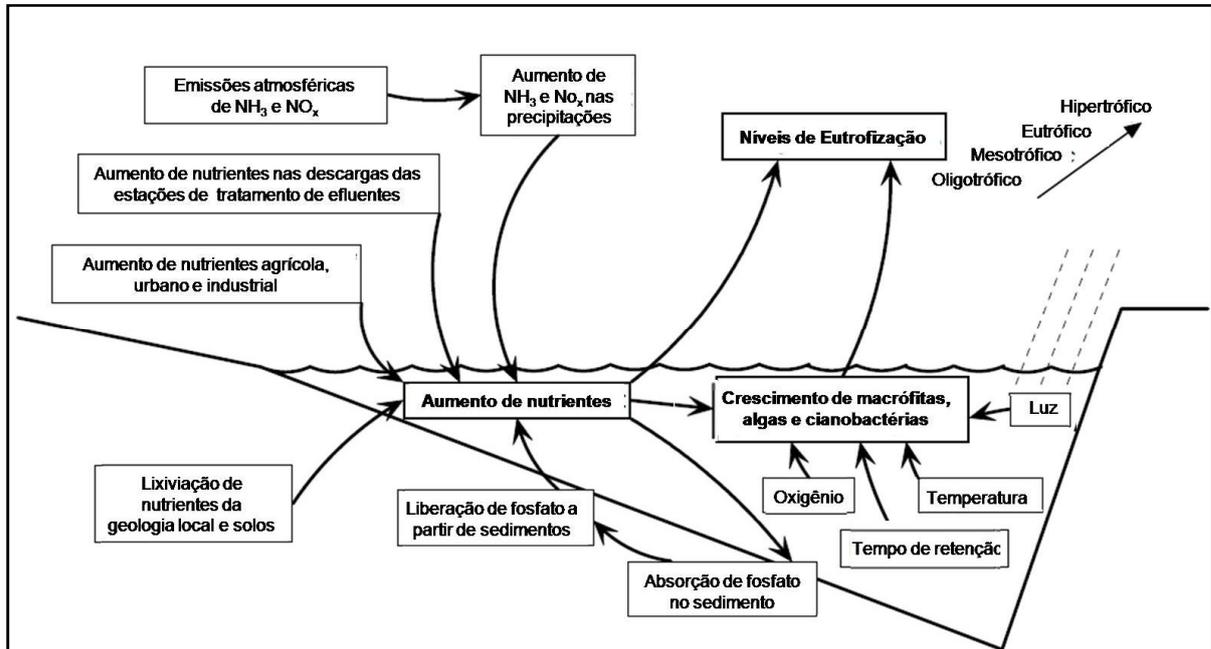


Figura 1- Esquema simplificado ilustrando os principais fatores envolvidos no processo de eutrofização (Fonte: Adaptado de NEMP, 2002).

Como consequência, a eutrofização produz alterações na qualidade da água, incluindo a redução de oxigênio dissolvido, aumento de custo de tratamento de água para abastecimento, morte de organismos aquáticos e aumento da incidência de florações de

microalgas e cianobactérias (CHORUS e BARTRAM, 1999; FERNANDES, 2001). As florações de cianobactérias ocorrem preferencialmente em água doce, em pH entre 6 e 9, em altas concentrações de nutrientes e temperaturas entre 15° e 30°C (SANTOS e BRACARENSE, 2008).

As cianobactérias têm sua origem a cerca de 3,5 bilhões de anos, sendo organismos pioneiros na Terra (AZEVEDO, 1998), e provavelmente os primeiros produtores primários a liberar oxigênio na atmosfera primitiva (CHORUS, 2000; CALIJURI *et al.*, 2006). Os relatos sobre os impactos relacionados às microalgas têm amplo registro histórico, a exemplo as marés vermelhas (“redtides”) registradas na Bíblia Sagrada:

Eis aqui, pois o que diz o Senhor: nisto conhecerás tu que eu sou o Senhor: eis que ferirei eu a água do rio com a vara, que tenho na minha mão, e essa água se converterá em sangue. Os peixes também, que estão no rio, morrerão; as águas se corromperão; e os egípcios, que beberem, serão atormentados (Moisés, Velho Testamento, Êxodo apud ROCHA *et al.*, 2004).

As cianobactérias são classificadas como microrganismos aeróbicos, fotoautotróficos, unicelulares e procariontes (SMITH, 1987 apud BRANDÃO, 2006). Além da clorofila *a*, possuem outros pigmentos acessórios, como a ficocianina que auxilia na fotossíntese. A combinação do efeito visual do verde-azulado da ficocianina e o verde da clorofila *a* resultou na sinonímia de “algas azuis” (CALIJURI *et al.*, 2006). A fotossíntese é o seu principal modo de obtenção de energia para o metabolismo (AZEVEDO, 1994; CHORUS, 2000). E, segundo Chorus e Bartram (1999), as cianobactérias contribuem para a fertilidade do solo e da água por meio da fixação de nitrogênio atmosférico.

Possuem distribuição geográfica ampla e podem ser encontradas em diversos habitats como, por exemplo, lagos antártico, fossas termais, desertos áridos e solos tropicais ácidos, podendo ser bentônicas ou planctônicas, como também viver em simbiose com plantas e fungos (CHORUS e BARTRAM, 1999). Porém, são predominantes no fitoplâncton de ambientes marinhos e de água doce podendo se organizar em colônias (*Microcystis* sp., *Gomphosphaeria* sp. e *Merismopedia* sp.), filamentos (*Cylindrospermopsis* sp., *Nostoc* sp., *Anaebaena* sp., *Oscillatoria* sp., *Planktothrix* sp.) ou de modo unicelular (*Chroococcus* sp.), devido às adaptações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas adquiridas durante sua evolução (BITTENCOURT-OLIVEIRA e MOLICA, 2003; CALIJURI *et al.*, 2006). Na Figura 2 estão ilustrados exemplos de organização de cianobactérias.

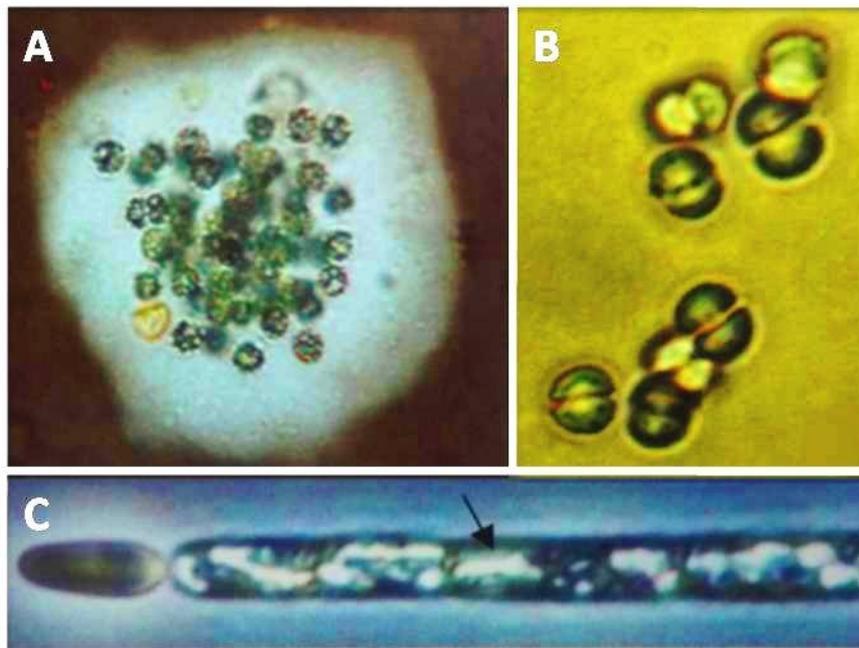


Figura 2- Formas de organização de cianobactérias: (A) Colônia – *Microcystis aeruginosa* (1000x); (B) Unicelular – *Chroococcus* sp. (1000x) (C) Filamento – *Cylindrospermopsis raciborskii* (1000x), a seta indica heterócito terminal (Fonte: SANT’ANNA *et al.*, 2006).

Seu sucesso adaptativo é muito influenciado pelo desenvolvimento de estruturas especiais vantajosas, tais como a bainha de mucilagem e a formação de aerótopos em algumas espécies, que lhes permite a flutuabilidade. Estas adaptações fazem as células migrarem verticalmente na coluna d’água, e com isso, elas se mantêm a uma profundidade em que a oferta de luz e de nutrientes se torna favorável para seu crescimento (CALIJURI *et al.*, 2006). São essas estruturas que possibilitam em florações a formação de “natas” na superfície e podem mudar a coloração da água. Porém, algumas espécies de cianobactérias que possuem aerótopos não produzem esse fenômeno em virtude de não possuírem bainhas de mucilagem que agregam e mantêm os organismos juntos (SANT’ANNA *et al.*, 2006).

Sabe-se que, o aumento massivo e florações desses microrganismos resultam em alterações no equilíbrio ecológico, como a perda de biodiversidade, problemas estéticos como a produção de compostos que modificam o odor e o sabor da água, bem com o aumento no custo do tratamento da água e danos a saúde humana, principalmente por meio da produção de metabólitos secundários, as cianotoxinas (FREITAS, 2008). Os principais impactos causados pelas florações de cianobactérias são apresentados na Figura 3.

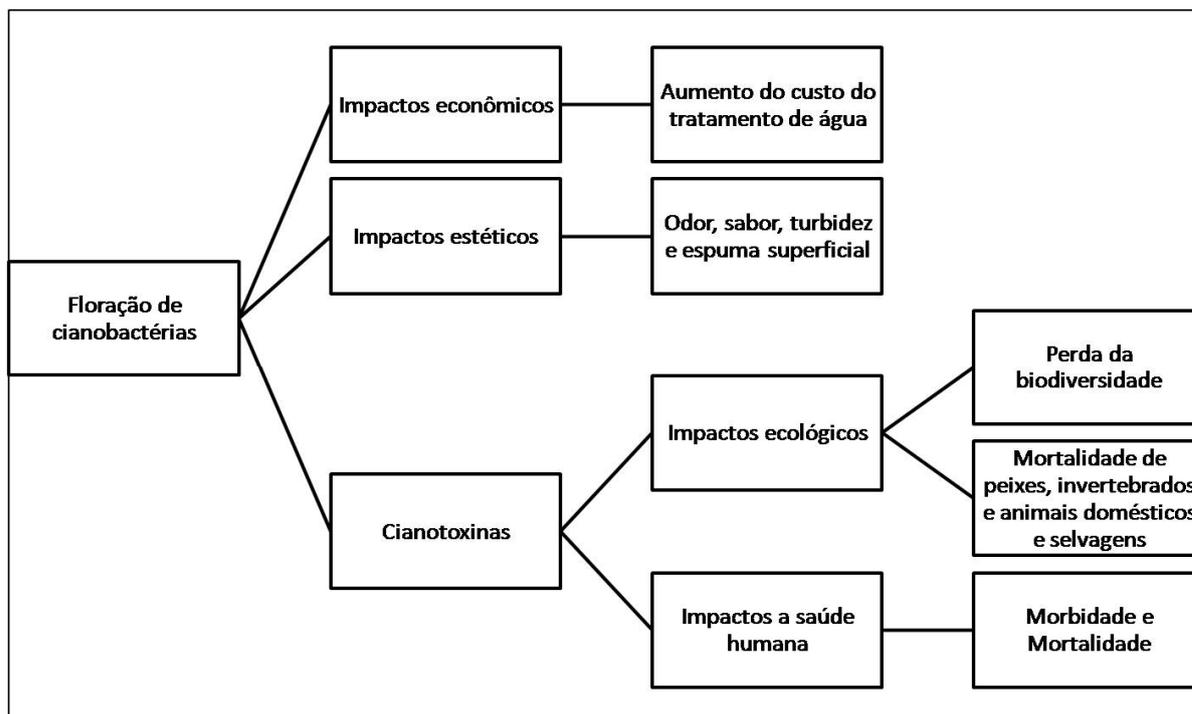


Figura 3- Esquema ilustrativo dos principais impactos de florações de cianobactéria. (Fonte: Adaptado de NEMP, 2002).

As cianobactérias, em condições normais, podem liberar toxinas para água e os fatores que levam à formação da toxina ainda não são bem conhecidos. Duas importantes hipóteses são que a produção e a liberação delas estejam relacionadas com a competição entre os organismos fitoplanctônicos e que possam também atuar inibindo a predação por consumidores primários (larvas de peixes, moluscos, microcrustáceos, dentre outros) (BRASIL, 2003).

Um levantamento realizado em 1998 mostrou que aproximadamente 75% das cepas isoladas apresentavam-se tóxicas (AZEVEDO, 1998). Os registros brasileiros das florações de cianobactérias indicam que os eventos de florações tóxicas são significativamente maiores do que as florações de cepas não tóxicas (AZEVEDO, 1998).

As cianotoxinas são classificadas de acordo com sua estrutura química em peptídeos cíclicos (microcistinas e nodularina), alcalóides (anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxinas, cilindropermospinas, aplysiatoxina e lyngbyatoxina-a) e lipopolissacarídeos (LPS). De acordo com sua toxicidade, são consideradas como dermatotoxinas (aplysiatoxina e lyngbyatoxina-a), hepatotoxinas (microcistinas e nodularina), citotoxinas (cilindropermopsina) e neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas) (KAEBERNICK e NEILAN, 2001; SANTOS e BRACARENSE, 2008). As hepatotoxinas são as mais comuns. As ações e os gêneros produtores destas toxinas estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Características gerais das toxinas produzidas por cianobactérias, gêneros em que foram encontradas e mecanismos de ação.

Toxina	Como e onde age	Gênero
^a Microcistina	Inibidora das enzimas fosfatases1 e 2A – Fígado (hepatócitos) principalmente e outros órgãos	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Nostoc, Hepalosiphon e Anabaenopsis</i>
^a Nodularina	Inibidora das enzimas fosfatases1 e 2A - Fígado (hepatócitos)	<i>Nodularina</i>
^a Cilindrospermopsina	Inibidora de síntese protéica	<i>Cylindrospermopsis, Umezakia, Aphanizomenon e Raphidiopsis</i>
^a Saxitoxina	Liga-se aos canais de sódio - Membrana do axônio	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya e Cylindrospermopsis</i>
^a Anatoxina-a	Liga-se ao receptor da acetilcolina – sinapse nervosa	<i>Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon e Raphidiopsis</i>
Anatoxina-a(s)	Inibidora de acetilcolinesterase - sinapse nervosa	<i>Anabaena</i>

^a Existem variantes estruturais com diferentes toxicidades.

Fonte: Adaptado de Ferrão-Filho e Kozlowsky-Suzuki, 2011; Bittencourt-Oliveira e Molica, 2003.

3.1.1 *Cylindrospermopsis raciborskii*

A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* é considerada uma espécie invasora e pode representar 10% do total de biomassa fitoplanctônica dependendo das condições ambientais (GOMES *et al.*, 2008). Apesar de serem dominantes por todo o ano, se proliferam com maior intensidade quando há baixa pluviosidade e tempo seco (OLIVEIRA, 2005). O estudo de Carvalho *et al.* (1999) em um reservatório de Pernambuco observou que o sertão é a região com maior intensidade e duração de florações de *C. raciborskii*. A Figura 4 ilustra a floração desta espécie.



Figura 4 - Aspecto de floração de *Cylindrospermopsis* sp. (Fonte: BRASIL, 2003).

C. raciborskii foi inicialmente identificada em regiões tropicais e subtropicais, estando sua ocorrência usualmente associada à baixa disponibilidade de luz e alta afinidade por nutrientes (N e P). Entretanto, nas últimas décadas sua ocorrência em regiões temperadas tem aumentado o que tem sido atribuído à eutrofização e ao aquecimento global. Além disso, sua alta capacidade de adaptação, como a formação de acineto e tolerância a baixos níveis de fósforo e nitrogênio e, conseqüente vantagem competitiva possibilitou sua rápida expansão e sobrevivência em condições desfavoráveis (SINHA *et al.*, 2012). Fatores antrópicos, como a dispersão através do lastro de navios ou de transferência inadequada de amostras científicas, e a dispersão por aves também têm sido sugeridos como potenciais mecanismos de contribuição para a disseminação de *C. raciborskii* (MOREIRA *et al.*, 2011).

Entre suas estratégias adaptativas estão a resistência a herbivoria, tolerância às baixas irradiações, possibilidade de migração para posicionamento na coluna d'água a procura de melhores condições de nutrientes e luz, tolerância às altas concentrações iônicas, armazenamento e utilização de reservas intracelulares de fósforo, alta afinidade pela amônia ionizada (NH_4^+), que é a forma energeticamente mais acessível de nitrogênio (ou na sua falta, podem fixar o nitrogênio atmosférico) e flexibilidade às grandes variações de condutividade elétrica (BITTENCOURT-OLIVEIRA e MOLICA, 2003).

Como mencionado na introdução, entre as toxinas produzidas pela *C. raciborskii* estão a cilindrospermopsina (CYN), um alcalóide, e as toxinas do tipo STXs (saxitoxinas) ou PSP (Paralytic Shellfish Poisons), que agem no sistema neuromuscular e causam a paralisia (CHORUS E BARTRAM, 1999).

A CYN é um alcalóide que possui uma guanina cíclica ligada a um grupo hidroximetiluracil, sendo a fração uracil responsável pela toxicidade (HUMPAGE, 2008) (Figura 5). Essa molécula foi identificada em espécies do gênero *Cylindrospermopsis* (HAWKINS *et al.* 1985; OHTANI *et al.*, 1992), *Umezakia natans* (HARADA *et al.*, 1994), *Anabaena bergii* (SCHEMBRI *et al.*, 2001), *Raphidiopsis curvata* (LI *et al.*, 2001), *Aphanizomenon ovalisporum* (BANKER *et al.*, 1997; SHAW *et al.* 1999), *Aphanizomenon flos-aquae* (PREUSSEL *et al.*, 2006) e *Lyngbya wollei* (SEIFERT *et al.*, 2007).

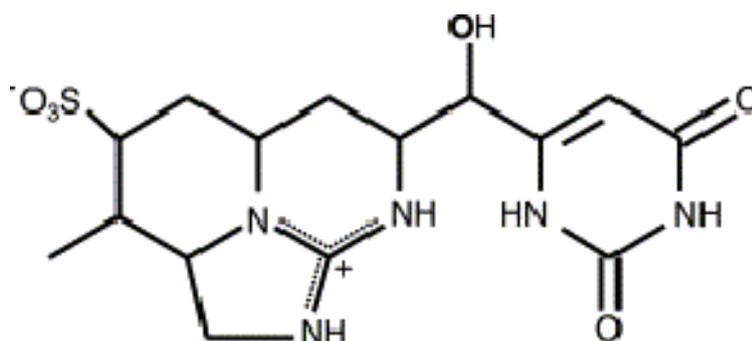


Figura 5- Estrutura química da molécula de cilindrospermopsina (Fonte: SILVA, 2008).

Entre os principais mecanismos de ação é a inibição da síntese protéica (TERAO *et al.*, 1994) e, estudos *in vitro* (HUMPAGE *et al.*, 2000, 2005) e *in vivo* (SHEN *et al.* 2002) têm mostrado que CYN pode também causar danos ao DNA, induzindo genotoxicidade. Além disso, efeitos carcinogênicos (FALCONER e HUMPAGE, 2001) e mutagênicos (SEDMAK, 2012) já foram relatados.

A caracterização inicial ocorreu após intoxicações provocadas em 148 pessoas nativas de uma ilha da costa australiana (Queensland) em 1979, onde o principal sintoma era hepatoenterites (FALCONER, 1994). Posteriormente, foi detectado que a água do reservatório que abastecia a ilha continha florações tóxicas de *C. raciborskii*, porém o relato deste episódio não atribui os sintomas aos efeitos da CYN (HAWKINS *et al.*, 1985).

A referida cianobactéria já foi relacionada com uma série de danos a saúde, sendo o fígado seu principal alvo em vertebrados. Portanto, inicialmente foi considerada como uma hepatotóxina, porém observou-se também que induzem alterações nos rins, glândulas supra-renais, timo, coração, trato intestinal e pulmões (WORMER *et al.*, 2009), sendo assim, recentemente classificada como citotóxina.

A ocorrência de CYN com maior destaque foi observada no carvão ativado do sistema de tratamento de água da clínica de hemodiálise em Caruaru/PE, no episódio conhecido como Síndrome de Caruaru, que resultou na intoxicação de 130 pessoas e morte de 54 (CARMICHAEL *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2002).

Bittencourt-Oliveira *et al.* (2011), também encontraram CYN em três reservatórios de abastecimento público de água do Nordeste: Jacazinho, Duas Unas e Arcoverde. Entretanto, não foi possível determinar se a responsável pela produção de cilindrospermopsina foi a cepa de *C. raciborskii* ou de *Aphanizomenoides sphaerospermopsis* (anteriormente denominada *Aphanizomenon aphanizomenoides* Forti).

Diante de tais fatos, foi incluída a análise de cianotoxinas no monitoramento da qualidade de água para consumo humano no manancial de captação e na água tratada, na qual

é objeto da Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). Esta legislação recomenda o limite de $1\mu\text{g.L}^{-1}$ de CYN na água tratada, como limite permitido dentro dos padrões de potabilidade, quando detectada a presença da mesma em amostras de água

3.1.2 Efeitos de CYN em organismos aquáticos

Embora um grande número de pesquisas tem sido dedicado aos efeitos das cianotoxinas em animais terrestres (particularmente mamíferos), o papel ecológico dessas toxinas no ambiente aquático ainda permanece em debate (FERRÃO-FILHO e KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011). As rotas de exposição dos organismos aquáticos à estas toxinas são pela ingestão direta de células vivas ou pelo contato e absorção de toxinas disponíveis no ambiente (FOURNIE *et al.*, 2008).

Saker e Eaglesham (1999) avaliaram a acumulação de CYN proveniente de *C. raciborskii* em tecidos de *Cherax quadricarinatus* (Decapoda) em viveiros de aquicultura e em condições de laboratório. Os autores observaram que ambos organismos acumulam CYN em maiores concentrações no hepatopâncreas. Saker *et al.* (2004) encontraram concentrações de CYN de 2,9 e 5,9 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em todo o corpo e vísceras, respectivamente, do bivalve *Anodonta cygnea*. Mas os valores mais elevados foram detectados na hemolinfa, correspondendo a 408 $\mu\text{g CYN.L}^{-1}$, quando a concentração no meio era de 34 $\mu\text{g CYN.L}^{-1}$, obtendo um fator de bioacumulação (FBA) de 12. Porém, em ambos os estudos, não foram observados efeitos adversos.

No estudo desenvolvido por Nogueira *et al.* (2004), organismos de *Daphnia magna* foram expostos a cepas produtoras e não produtoras de CYN e ambas as cepas reduziram a sobrevivência e crescimento dos organismos, porém não foi evidenciada bioacumulação. Em outra investigação, duas cepas produtoras de CYN (*C. raciborskii* e *Aphanizomenon ovalisporum*) causaram redução na sobrevivência e crescimento de *D. magna*, mas apenas a cepa de *C. raciborskii* causou danos no epitélio do intestino e divertículos. Este resultado sugeriu que nem todos os efeitos adversos sobre *D. magna* pode ser atribuído a CYN. (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

Metcalf *et al.* (2002), investigando a influência do extrato celular de CYN e da toxina pura sobre a sobrevivência de *Artemia salina* constataram maior mortalidade para os organismos expostos ao extrato celular em comparação aos expostos à toxina pura.

Kinnear *et al.* (2007) pesquisaram possíveis efeitos sub-letais no caracol aquático *Melanoides tuberculata* expostos a extrato celular e células íntegras de *C. raciborskii*

contendo CYN. A exposição às duas formas não resultou em mudanças significativas no comportamento ou crescimento dos animais. No entanto, foram detectadas alterações na liberação de filhotes a partir dos tratamentos contendo $\geq 200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de CYN. White *et al.* (2005), em estudo com *Melanoides tuberculata* avaliaram o potencial dos organismos em bioconcentrar e bioacumular CYN nos tecidos expostos ao extrato e à células intactas de *C. raciborskii*. Foram observadas tanto bioconcentração (absorção de toxina a partir de uma fonte exclusivamente extracelular) quanto bioacumulação (absorção de toxinas a partir de ambas as fontes intracelular e extracelular), porém, a contaminação dos tecidos através da exposição ao extrato celular foi menor do que quando expostos a cultura de células inteiras. Quando a concha dos organismos foi avaliada não foi evidenciado bioconcentração, sendo a média do fator de bioconcentração (FBC) 0,12.

Silva (2008) expôs tilápias juvenis (*Oreochromis niloticus*) à células íntegras de *C. raciborskii* e ao extrato celular contendo CYN e observou que os organismos expostos ao primeiro tratamento parecem não ter tido seu crescimento suprimido ou aumentado. No entanto, os peixes tiveram seu crescimento diminuído quando expostos por 15 dias a baixas concentrações de extrato celular contendo CYN. Porém, quando os animais foram expostos por 30 dias às mesmas concentrações não houve influência no crescimento, o que provavelmente está relacionado com o processo de detoxificação do animal. Observou-se também que os peixes acumularam toxina nos tecidos (vísceras e músculo) durante a ingestão tanto do extrato tóxico quanto em células íntegras, mas não houve mortalidade dos animais ao longo dos tempos de exposição.

Em seu trabalho Puerto *et al.* (2011) utilizaram análise proteômica e bioquímica para estudar os efeitos da exposição de duas espécies de bivalves, *Mytilus galloprovincialis* e *Corbicula fluminea* à cianobactéria *C. raciborskii* produtora e não produtora de CYN com objetivo de avaliar o estado fisiológico dos organismos. Foram relatadas alterações nas atividades das enzimas glutathione S-transferase (GST), assim como na glutathione peroxidase (GPx), nas brânquias, no trato digestivo dos bivalves e em proteínas do citoesqueleto dos animais, quando expostos a ambas as células. A toxina foi capaz de afetar as diferentes vias bioquímicas relacionadas com a produção de energia, função mitocondrial e transporte de metal.

Emygdio (2011) avaliou os efeitos de cianotoxinas CYN e MCYST sobre o ciclo de vida de *Chironomus xanthus*, expondo os organismos a extratos celulares de cepas tóxicas e não tóxicas de cada cianotoxina. Para os ensaios agudos e crônicos, foi adotado a mortalidade e crescimento do corpo, mensurados pela largura da cápsula cefálica, como

parâmetros de avaliação final. Os resultados indicaram que o extrato de 10^6 cels.ml⁻¹ contendo cianotoxina não provocou efeitos agudos e crônicos em larvas de *C. xanthus*, independente do ínstar, quando avaliados pelo atributo mortalidade. No entanto, quando avaliado pela largura da cápsula cefálica, a exposição crônica provocou um estímulo no crescimento das larvas de *C. xanthus* para ambos os extratos celulares *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* independente da presença ou não de toxinas.

Além disso, pode-se observar que houve tendência de acumulação de CYN nos organismos após o ensaio agudo, e que o acúmulo mostrou-se ser inversamente proporcional ao peso seco das larvas, uma vez que larvas maiores (ínstar III) acumularam menos toxina do que larvas menores (ínstar II). Entretanto, estes dados necessitavam ser confirmados, principalmente por haver poucas informações disponíveis sobre o acúmulo de CYN em animais aquáticos, especialmente em invertebrados bentônicos.

3.2 Genotoxicidade

Genotoxicidade ou toxicologia genética é a área da ciência que estuda os processos que alteram a base genética da vida, alterando a estrutura físico-química do DNA, processo conhecido como mutagênese, ou alterando o determinismo genético ao nível celular podendo gerar carcinogênese ou orgânico podendo gerar teratogênese. Ou seja, “a genotoxicidade estuda, sob o aspecto genético, o que perturba a vida ou induz a morte tanto em nível de célula como de organismo” (ERDTMANN, 2003). Efeitos genotóxicos podem afetar a reprodução, a vida embrionária, desenvolvimento, crescimento e sobrevivência de organismos (DIPAULO, 2006). O que mantém a estabilidade genética, a estrutura físico-química do DNA, são os mecanismos celulares de replicação e de reparo das lesões.

Dessa forma, surgiram os ensaios de genotoxicidade entre os anos 50 e 60, firmando-se na década de 1980, a fim de detectar e quantificar danos genéticos por meio da utilização de células ou organismos para a investigação do potencial de agentes contaminantes induzirem mutações nas células somáticas ou germinativas (VILLELA *et al.*, 2003).

A genotoxicidade pode ser avaliada por diversos ensaios: com microrganismos existem o teste de Ames, o Induteste e o Cromoteste; ou com células de organismos eucariotos existem o teste de micronúcleos e o ensaio Cometa, entre outros (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Na presente dissertação utilizou-se o ensaio cometa como ferramenta para avaliação da genotoxicidade de extratos de *C. raciborskii* produtora de CYN. Trata-se de um

teste capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (VILLELA *et al.*, 2003) por meio de uma eletroforese em microgel, em que se combinam técnicas bioquímicas simples com a abordagem de células individuais dos testes citogenéticos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

3.2.1 *Ensaio Cometa*

O Ensaio Cometa ou *Single Cell Gel (SCG) Assay* é amplamente utilizado para a detecção de genotoxicidade, e pode ser útil na avaliação de risco (MOLLER, 2006). Como já mencionado, é um método de eletroforese em microgel, utilizado para a detecção e quantificação de lesões e efeitos de reparo no DNA, podendo ser observado quebras em fitas simples ou duplas de DNA, danos álcali-lábeis, ligações cruzadas e quebras resultantes de reparo por excisões não concluídas. Todos esses processos são avaliados usando microscopia óptica (SINGH *et al.*, 1988).

Em comparação com outros ensaios de genotoxicidade, as vantagens desta técnica incluem a sensibilidade para detectar danos no DNA, possibilidade de pequeno número de células por amostra que não necessariamente precisam estar em divisão, a coleta de dados em nível de célula individual, os custos baixos, facilidade de aplicação, utilização de quantidades relativamente pequenas de uma substância teste, a possibilidade de aplicação em qualquer população de células eucarióticas e principalmente o período de tempo curto (de alguns dias) para a obtenção dos resultados (TICE *et al.*, 2000).

Determinados parâmetros como, a concentração de agarose no gel, pH, temperatura e duração do desenrolamento alcalino, voltagem, amperagem e duração da eletroforese, influenciam na detecção do dano ao DNA (HARTMANN *et al.*, 2003), que pode ser realizada de diferentes maneiras como, por exemplo, medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular de medidas, ou classificar visualmente, em diferentes níveis de dano, as células analisadas (Figura 6) (SILVA, 2007), ou ainda por meio de ferramentas computacionais, a exemplo o programa CASP (PEREIRA, 2006).

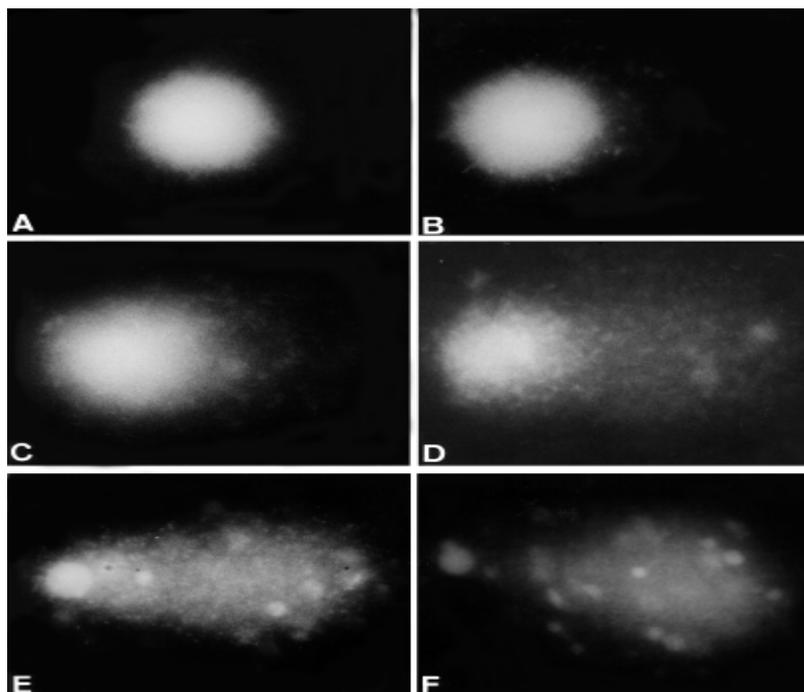


Figura 6- Demonstração da classificação de danos em células de sangue de *Ctenomys torquatus* (A) Classe 0, sem dano; (B) Classe 1; (C)Classe 2; (D),Classe 3; (E)Classe 4, dano máximo; (F),Célula com apoptose. (Fonte: SILVA *et al.*, 2000).

A coloração de lâminas do ensaio cometa pode ser realizada com brometo de etídio, que apresenta alguns fatores negativos, como a necessidade de equipamentos específicos, além dos efeitos adversos que podem ser causados pela à ação mutagênica do corante e a curta durabilidade da coloração (DIPAULO, 2006), ou a coloração com nitrato de prata, que demonstrou alta sensibilidade quando comparada à coloração por brometo de etídio (REINHARDT-POULIN *et al.*, 2000). Dentre suas vantagens está a possibilidade de analisar em microscópio óptico comum, o baixo custo e a duração da coloração (PEREIRA, 2006).

Enquanto as orientações relativas à utilização do ensaio cometa foram publicados para genotoxicologia de mamíferos (TICE *et al.*, 2000), não existe nenhum protocolo padronizado atualmente para organismos aquáticos. Porém, alguns trabalhos, a exemplo o de Andrade *et al.*, (2004), provaram que o ensaio cometa é uma ferramenta poderosa para garantir a relação entre danos ao DNA e a exposição dos organismos aquáticos a poluentes genotóxicos.

A padronização da técnica do ensaio cometa está inserida desde 2008 no Test Guidelines Programme: WORK PLAN FOR THE TEST GUIDELINES PROGRAMME (TGP), na seção 4 de projetos relacionados com orientações de ensaio sobre efeitos na saúde da Organisation for Economic Co-operation and Development– OECD (OECD, 2011).

Neste sentido, a presente dissertação se propôs aplicar o ensaio cometa num organismo bentônico nativo (*Chironomus xanthus*), com a finalidade de estabelecer este parâmetro de avaliação (dano ao DNA) em organismos que vivem no sedimento dos ecossistemas aquáticos, considerado como compartimento acumulador de contaminantes.

3.3 *Chironomus xanthus*

Os insetos da família Chironomidae são de fácil adaptação em ambientes variados, e apresentam uma ampla riqueza de espécies, distribuição geográfica e abundância. Ocorrem em ambientes lânticos e lóticos, de águas frias ou quentes, ricas ou pobres em oxigênio, pois possuem hemoglobina o que os torna capazes de tolerar baixos teores de oxigênio (ALMEIDA, 2007).

A espécie *Chironomus xanthus* (Diptera – Chironomidae) foi escolhida como organismo-teste porque, além do fato de executarem um papel importante na cadeia alimentar, é de fácil cultivo em laboratório, curto ciclo de vida, nativa e bëntonica, bem como por já ter sido utilizada em estudos ecotoxicológicos anteriores (FONSECA e ROCHA, 2004; DORNFELD, 2006; ZORATTO, 2007; COSTA, 2007; CAVALCANTI, 2010).

C. xanthus foi descrito por Rempel (1939) e possui sinonímia com *Chironomus domizzi* (PAGGI, 1977) e *Chironomus sancticaroli* (STRIXINO e STRIXINO, 1981). Até o momento sua distribuição geográfica se restringe ao Brasil e Argentina (FONSECA e ROCHA, 2004).

A metodologia para sua manutenção em laboratório foi primeiramente desenvolvida por Strixino (1980) e posteriormente adaptada por Fonseca (1997) e Almeida (2002), visando o uso em ensaios ecotoxicológicos, e posterior padronização desta espécie como um organismo-teste (FONSECA e ROCHA, 2004; ALMEIDA, 2007).

O ciclo de vida dos *C. xanthus* consiste de quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 7). Os dois últimos estágios são muito curtos. A fase adulta requer apenas um abrigo de acasalamento e posterior deposição dos ovos. Sendo assim, a maior parte do ciclo de vida do organismo ocorre no período larval, composto por quatro ínstares ou estádios larvais, e é nesta fase que a energia necessária para o desenvolvimento é adquirida, já que os adultos não se alimentam (FONSECA e ROCHA, 2004).

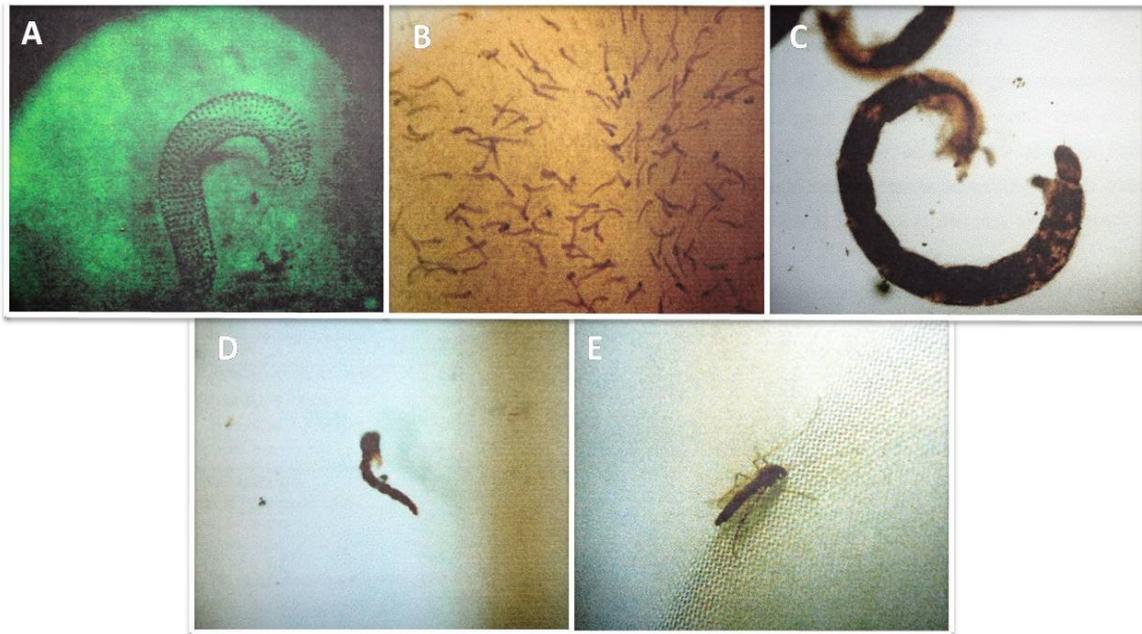


Figura 7- Ciclo de vida de *Chironomus xanthus*. (A) Desova - ± 15 mm de comprimento; (B) Larvas recém-nascidas - $0,099\pm 0,005$ mm de largura da cápsula cefálica; (C) Larva no 2º instar - $0,150\pm 0,161$ mm de largura da cápsula cefálica; (D) Estágio de pupa - 5,0-6,0mm; (E) Indivíduo adulto, fêmea - 4,4-5,2mm de comprimento total (Fonte: FONSECA, 1997).

Após a emergência dos adultos (duração de aproximadamente dois dias), estes copulam e as fêmeas depositam em média 500 a 600 ovos reunidos numa massa gelatinosa que permanece presa por um pedúnculo, preferencialmente, na parede da bandeja de cultivo, na superfície, mas em contato com a água (FONSECA e ROCHA, 2004).

Em um período de 44 a 48 horas, a uma temperatura de incubação de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ as larvas eclodem. No primeiro instar permanecem planctônicas ingerindo algas e bactérias (FONSECA e ROCHA, 2004), sendo os instares posteriores preferencialmente detritívoros (ALMEIDA, 2007). Após o quarto instar, o organismo passa para o estágio de pupa, que se diferencia por possuir coloração preta e cabeça bem diferenciada, emergindo depois como adulto (ímagó) (USEPA, 2000).

Todo o ciclo de vida dura cerca de 13 dias, podendo variar de 12 a 15, dependendo da temperatura, sendo que cada instar possui um tempo de duração diferenciado, em média dois dias para os três primeiros e cinco dias para o instar quatro (FONSECA e ROCHA, 2004).

O hábito alimentar de *C. xanthus* pode influenciar na sua permanência no ambiente, já que se alimentam de matéria orgânica depositada no sedimento, os tornando susceptíveis a contaminações e por consequência ocorrendo diminuição na população. Porém, esse mesmo modo de alimentação é o que favorece sua adaptação a diversos locais (possuem

baixa seletividade), contaminados ou não, sendo muitas vezes os primeiros colonizadores de novos habitats e por isso sua utilização como bioindicadores tem crescido (GOULART e CALLISTO, 2003). Os movimentos realizados por esse organismo podem colaborar para a liberação de nutrientes do sedimento para a coluna água e, dependendo do nutriente estes podem favorecer as florações de cianobactérias (N e P) (GUERESCHI, 2004).

Assim, o presente trabalho pretende confirmar se organismos de *Chironomus xanthus* acumulam cianotoxina quando expostos a condições de floração de cianobactérias, bem como se acumulam a toxina e se isso resulta em danos no DNA durante a exposição, avaliados por meio do ensaio cometa.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Cultivo de cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* e extração de cilindrospermopsina (CYN)

Para a realização deste trabalho foi selecionada uma linhagem de *Cylindrospermopsis raciborskii*, CYP-011K, produtora de CYN, que foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Andrew Humpage do Australian Water Quality Centre - Austrália. Tal cepa foi obtida do banco de culturas do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – LETC/UFRJ e cultivada em grande escala no Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI com o intuito de obter material suficiente para os ensaios crônicos.

O cultivo foi mantido em frascos do tipo mariote (Figura 8) e erlenmeyer, em meio ASM1, com pH ajustado para 7,5, aeração contínua e temperatura de $20 \pm 3^\circ\text{C}$, sob intensidade luminosa de $40 \mu\text{moles f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida com auxílio de lâmpadas fluorescentes de 20W e fotoper\u00edodo de 12 horas. Os in\u00f3culos para o in\u00edcio dos cultivos foram sempre equivalentes a 10% do volume das culturas.

Ap\u00f3s atingir a fase exponencial, com aproximadamente 15 dias de cultivo, a cultura foi desmontada e centrifugada, uma al\u00edquota de 100 μl do concentrado (fixados com lugol) foi retirada e nela acrescentada 4,9 ml de \u00e1gua ultra pura e duas gotas de lugol para fixa\u00e7\u00e3o. A contagem foi realizada atrav\u00e9s microsc\u00f3pio \u00f3ptico, com aux\u00edlio de hemocit\u00f4metro de Fuchs-Rosenthal.

Para obten\u00e7\u00e3o do extrato, o concentrado foi submetido ao rompimento celular realizado pelo processo de gelo/degelo, e mantido em freezer para posterior utiliza\u00e7\u00e3o nos ensaios cr\u00f4nicos.



Figura 8- Cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Fonte: RESTANI, 2010).

4.2 Cultivo de *Chironomus xanthus*

Os organismos de *C. xanthus* foram mantidos no laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI, conforme metodologia desenvolvida por Fonseca e Rocha (2004).

Para o cultivo foram utilizadas bandejas plásticas de 45x35x6 cm de tamanho, contendo uma camada de substrato esterilizado em autoclave e 4 litros de água proveniente de fonte natural. A cada lote de água coletada, foram avaliados os parâmetros condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e dureza ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). A granulometria do substrato utilizado é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Granulometria do substrato utilizado no cultivo de *C. xanthus*.

Peneira (mm)	Porcentagem (%)
1,000	1,0
0,500	8,0
0,250	50,0
0,105	40,0
0,053	0,5
Silte e Argila	0,5

Fonte: Fonseca, 1997.

No primeiro dia de vida (ínstar I) foi oferecido como alimento somente uma mistura de algas em suspensão (*Pseudokirchneriella subcapitata*) na proporção de 10^5 cels.ml⁻¹

¹ e a ração de peixes Tetramin® na proporção de 0,04 mg.ml⁻¹. Nos demais períodos de vida (instar II a IV) foi oferecida a ração de peixes na mesma proporção.

O sistema foi mantido sob aeração contínua em sala com temperatura de 23 ± 2°C, fotoperíodo de 12 horas, coberto por gaiolas de nylon para retenção dos adultos ao final do desenvolvimento larval (Figura 9A). A cada desova as mesmas foram retiradas das bandejas e colocadas em béqueres contendo água de manutenção até a eclosão das larvas e posterior abandono da mucilagem gelatinosa. Em seguida, um total de 100 larvas recém-eclodidas foi transferido para novas bandejas, contendo o substrato e a água nas quantidades adequadas para seu desenvolvimento (Figura 9B).

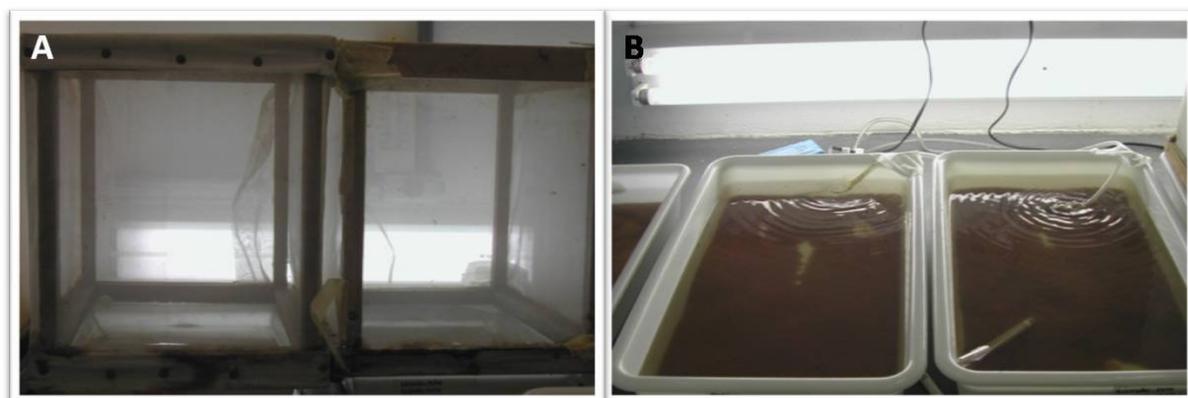


Figura 9- Bandeja de cultivo de *C. xanthus*. (A) Destaque para as gaiolas de contenção dos adultos; (B) Destaque para aeração e substrato (Fonte: SANTIAGO, 2012).

4.3 Ensaio de toxicidade crônica para avaliação da acumulação de cilindrospermopsina

Como mencionado, o objetivo de tais experimentos foi verificar se larvas de *C. xanthus*, expostas ao concentrado celular equivalente à condição de floração (10⁶ cels.ml⁻¹) rompido (extrato celular, ainda com debris celulares) contendo CYN seriam capazes de acumular toxina nos tecidos.

Foram realizados cinco ensaios preliminares, visando refinamento e validação do método, e um ensaio de toxicidade crônica definitivo. Os ensaios preliminares foram essenciais para estabelecer o número de organismos a serem expostos em cada ensaio com a finalidade de obter biomassa suficiente para posterior quantificação da toxina nos organismos.

No ensaio definitivo, foram utilizados quarenta béqueres, contendo 40 ml de água de manutenção cada. Vinte frascos foram selecionados para receber o concentrado celular rompido de *C. raciborskii* contendo o equivalente a 10⁶ cels.ml⁻¹ da cepa CYP-011K,

preparado de acordo com o item 4.1, e os outros vinte frascos, apenas água de manutenção (tratamento controle). Em cada béquer, foi inserido um organismo correspondente ao ínstar I (Figura 10).



Figura 10 - Representação esquemática do ensaio crônico realizado para avaliação de acumulação de CYN.

Os organismos foram mantidos do ínstar I até o ínstar IV (8 dias de exposição) em incubadora com fotoperíodo (12h) e temperatura controlada ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) com renovação das soluções a cada 2 dias, tomando-se o cuidado para não provocar estresse aos organismos. No primeiro dia e a cada troca das soluções, os organismos foram alimentados com a ração Tetramin® na proporção de $0,04 \text{ mg.ml}^{-1}$.

No início dos ensaios, para os tratamentos contendo o extrato celular, foi retirada uma alíquota de 15 ml e congelada em frasco âmbar para posterior quantificação de CYN (solução inicial). A cada dois dias, soluções novas eram preparadas e antes da renovação, uma alíquota de 15 ml foi retirada e congelada em frasco âmbar (solução final). Este procedimento foi realizado com intuito de conhecer as concentrações de CYN oferecidas aos organismos para posterior quantificação nos tecidos dos organismos expostos (% de acumulação). Ao final dos ensaios todos os organismos sobreviventes foram também congelados e liofilizados. Após a liofilização foi tomado o peso seco dos organismos de cada ensaio crônico e em base nestes resultados e na concentração de CYN da solução inicial foi calculada a porcentagem de acumulação de CYN nos organismos.

A quantificação de CYN nas soluções e nos organismos foi realizada através da Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS), descrito posteriormente no item 4.7.

4.4 Ensaios preliminares para de validação do ensaio cometa - cádmio e cilindrospermopsina

Como meio de validar o ensaio cometa, foi selecionado o metal cádmio para exposição dos organismos-teste, pois se trata de uma substância de referência adotada nos ensaios ecotoxicológicos, provavelmente devido à sua presença natural, bem como a sua ocorrência em efluentes (industriais e domésticos) (MOUNT *et al.*, 1995).

Para tanto, a escolha das concentrações as quais os organismos seriam expostos baseou-se no trabalho de Dornfeld (2006) onde foi avaliada a CL_{50} , concentração letal que causa morte de 50% da população de *C. xanthus* exposta, sendo determinada em $0,70 \text{ mgCd.L}^{-1}$.

Com base nos valores encontrados por Dornfeld (2006), foi determinada a concentração de $0,50 \text{ mgCd.L}^{-1}$ para o primeiro ensaio. Porém 19 dos 20 organismos que estavam expostos morreram, e assim não se obteve a biomassa indicada para a realização do ensaio cometa.

Com isso, foi realizado o segundo ensaio preliminar definindo-se a concentração em $0,30 \text{ mgCd.L}^{-1}$, bem como o aumento no número de organismos a ser utilizado, sendo agora 56 organismos. Com essa concentração, 70% dos organismos-teste sobreviveram ao final do ensaio, resultando em uma biomassa adequada para a realização do ensaio cometa.

A partir dessa definição, o ensaio crônico foi realizado conforme descrito no item seguinte e a quantificação de cádmio foi realizada conforme descrito no item 4.8.

O ensaio preliminar com CYN foi realizado expondo também 20 organismos a extrato celular de *C. raciborskii* contendo o equivalente a $10^6 \text{ cels.ml}^{-1}$ da cepa CYP-011K. A biomassa resultante desse número de organismos também não foi suficiente para a quantificação do ensaio cometa, sendo que as lâminas que obtiveram material genético apresentaram dano total ao DNA. Com isso, no ensaio definitivo (descrito a seguir) foram utilizados 56 organismos, além de definida também a utilização de extrato celular contendo o equivalente a $10^3 \text{ cels.ml}^{-1}$ e $3,3 \times 10^4 \text{ cels.ml}^{-1}$ da mesma cepa (condições de pré e início de floração, respectivamente) para uma melhor visualização dos danos ao DNA.

4.5 Ensaio de toxicidade crônica para detecção de danos ao DNA

De posse dos resultados dos ensaios preliminares descritos anteriormente, foram realizados os ensaios de exposição crônica definitivos para avaliação de danos ao DNA

(ensaio cometa). Ao todo foram utilizados 224 béqueres contendo em cada apenas um organismo na idade do ínstar I em 40 ml de solução. Os tratamentos selecionados estão descritos a seguir, totalizando 56 frascos para cada tratamento (Figura 11):

- Controle negativo: somente água de manutenção;
- Controle positivo: água de manutenção + 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cádmio;
- Tratamento A: água de manutenção + extrato celular de *C. raciborskii* contendo o equivalente a 10^3 cels. ml^{-1} da cepa CYP-011K;
- Tratamento B: água de manutenção + extrato celular de *C. raciborskii* contendo o aproximadamente $3,3 \times 10^4$ cels. ml^{-1} da cepa CYP-011K.

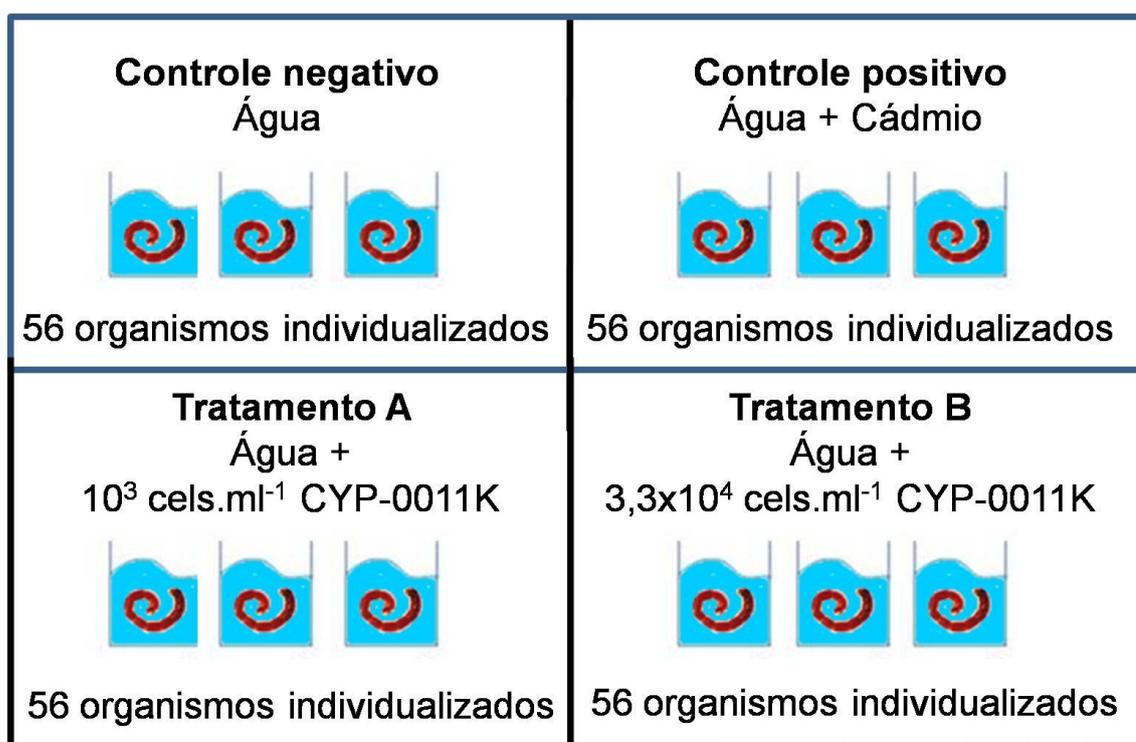


Figura 11- Representação esquemática do ensaio crônico realizado para verificação de danos ao DNA.

Os organismos foram mantidos até o ínstar IV (8 dias de exposição) em incubadora com fotoperíodo (12h) e temperatura controlada ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). A renovação das soluções foi efetuada a cada 2 dias, tomando-se o cuidado para não provocar estresse aos organismos. No primeiro dia e a cada troca das soluções, os organismos foram alimentados com a ração Tetramin® na proporção de $0,04 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Ao final do experimento, para os organismos sobreviventes foi realizado o ensaio de genotoxicidade do tipo cometa, cuja metodologia será descrita no item a seguir.

4.6 Ensaio cometa

A metodologia utilizada foi uma adaptação dos métodos desenvolvidos por Villela *et al.* (2006; 2007) e por Lee *et al.* (2009). Para tanto, os organismos sobreviventes após exposição crônica foram transferidos para frascos eppendorf contendo 200 μ l de tampão fosfato (PBS – phosphate-buffered saline) e submetidos ao rompimento da membrana celular com auxílio de um homogeneizador de tecidos (Tissuemiser) da marca Fischer Scientific.

Em seguida, obteve-se 10 μ l de suspensão celular e adicionou-se 90 μ l de agarose Low Melting 0,75% (w/v). Esta suspensão (células + agarose low-melting) foi transferida para uma lâmina de microscópio pré-revestida com agarose 1,5% (w/v). Adicionou-se a lamínula e esperou-se solidificar. Após solidificação, as lamínulas foram retiradas, e as lâminas imersas em uma solução de lise gelada (2,5M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10.0-10.5) contendo 1% Triton X-100 e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo, em seguida, mantidas em geladeira e protegidas da luz por ao menos 2 horas e no máximo 72 horas. Para cada tratamento foram preparadas doze lâminas, divididas em A e B, o que resultou um total de 48 lâminas.

Posteriormente, as lâminas foram incubadas em solução tampão alcalino recém preparado (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH 13.0) por 20 minutos para o desenrolamento do DNA. Em seguida, foram submetidas a uma corrente elétrica - eletroforese por 20 min a 300 mA e 25V (Figura 12). Todas estas etapas foram realizadas sob luz vermelha indireta.



Figura 12- Cuba e fonte de eletroforese (Fonte: Leticia Lisboa Santiago).

Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com solução de 0,4 M Tris (pH 7,5), lavadas três vezes em água destilada, e secas em temperatura ambiente. As lâminas secas foram fixadas com solução de ácido tricloacético 15% w/v, sulfato de zinco 5% w/v, glicerol 5% v/v por 10 min, lavadas três vezes em água destilada e secas a temperatura ambiente. Na etapa seguinte, as lâminas secas foram re-hidratadas por 5 minutos em água destilada e em posteriormente coradas (solução de carbonato de sódio 5%w/v, nitrato de amônia 0,1% w/v, nitrato de prata 0,1% w/v, ácido tungstosilícico 0,25%, formaldeído 0,15% w/v, preparados no escuro) e constantemente agitadas por 10 minutos, deixando-as na solução o tempo suficiente para corar.

As lâminas coradas foram lavadas duas vezes com água destilada e submergidas na solução de parada (ácido acético 1%), lavadas novamente e imediatamente codificadas para análise. A contagem foi realizada através de microscópio óptico marca NIKON modelo YS100. As células foram divididas em cinco classes, de dano 0 a dano 4, conforme metodologia descrita por Silva *et al.* (2000). A classe 0 corresponde aos cometas sem danos pela exposição; a classe 1 aos cometas com danos mínimos; a classe 2 aos cometas com danos médios; a classe 3 aos cometas com danos intensos; e a classe 4 corresponde aos cometas com danos máximos (DIPAOLLO, 2006).

Para o cálculo do índice de dano (ID), 100 células de cada repetição (lâminas A e B) foram escolhidas aleatoriamente (50 em cada lâmina). O (ID) é a soma das classes de 100 células analisadas, e pode variar de 0 (todas as células sem danos – 0x100) até 400 (todas as células com danos – 4x100). Ele é baseado no comprimento da migração e da quantidade de DNA na cauda, e é considerado uma medida sensível de danos detectáveis no DNA. A frequência de danos (FD) foi calculada pelo número de células com cauda, independente da classe de dano, em relação ao número de células sem cauda.

$$ID_{total} = 0.(nClasse 0) + 1.(nClasse 1) + 2.(nClasse 2) + 3.(nClasse 3) + 4.(nClasse 4)$$

$$FD(\%) = [(n\ total - n\ Classe\ 0) / n\ total]$$

Todos estes ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI, porém previamente foi realizado um treinamento desta técnica no Laboratório de Toxicologia da ULBRA/RS, sob coordenação da Profa. Juliana da Silva, bem como participação em ensaios similares no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - IBCCF -

UFRJ. Ambas as instituições possuem parceria científica com o Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI.

4.7 Quantificação de cilindropermopsina (CYN) no extrato celular e nos organismos

Para a análise de CYN nas soluções testes (inicial e final), o material foi centrifugado e o sobrenadante filtrado em membrana filtrante de celulose regenerada (45 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro) (Sartorius). Em seguida uma alíquota de 1 ml foi separada para análise. Para a quantificação de CYN nos organismos, se procedeu da mesma forma, porém antes da centrifugação, o pool de organismos de um mesmo teste, foi liofilizado e extraído com água em 2ml água ultra-pura (MilliQ) de acordo a metodologia desenvolvida por Welker *et al.* (2002).

A quantificação de CYN foi realizada por Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massas em modo tandem (LC-MSMS) utilizando a ionização por eletrospray (ESI) em modo positivo (Figura 13). A coluna utilizada foi Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6 x 150 mm 5µm para a separação cromatográfica, sendo empregadas duas fases móveis descritas abaixo. O volume injetado foi de 10µl com fluxo de 800µl/min.

- Fase A: 2mM de acetato de amônia em água + 0,1% de Ácido Fórmico e;
- Fase B: Metanol

A corrida cromatográfica ocorreu em modo isocrático: 60% de fase A e 40% de fase B, com tempo de corrida de 6 minutos.

As transições analisadas foram:

- 416>194 – Quantificação
- 416>336 – Confirmação



Figura 13- Cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas (Fonte: Letícia Lisboa Santiago).

Para a quantificação da CYN, foi feita uma curva de calibração contendo sete pontos, variando de 0,625ng/ml a 200ng/ml, sendo que para a avaliação dos resultados finais foi utilizado o procedimento de padronização externa, onde é feita a comparação direta entre a resposta da área do analito presente na amostra com o padrão utilizado na calibração. O padrão utilizado foi obtido no Institute for Marine Bioscience (NRC-CNRC) e o lote utilizado foi o 20050531 na concentração de 30 μ M. Tais determinações foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – LECT/UFRJ.

4.8 Análise de cádmio na solução utilizada

Para a quantificação de cádmio na solução do ensaio cometa foram analisadas as alíquotas que foram reservadas, fixadas com ácido nítrico e mantidas em geladeira.

O procedimento analítico para análise de cádmio nas soluções utilizadas como controle positivo no ensaio cometa foi integralmente realizado no Laboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franca (LREPF), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A solução utilizado como controle positivo foi preparada a partir de uma solução padrão de Cloreto de Cádmio, e a concentração preparada é equivalente a 0,3mg.l⁻¹ de cádmio.

Para tal, utilizou-se o método detalhado em estudo recente (DORNELES *et al.*, 2007) efetuado pela equipe da referida instituição (LREPF, IBCCF, UFRJ), com ligeiras modificações.

Brevemente, 20 μ l de HNO₃ 65% foram adicionados a um volume de 980 μ l de cada amostra, produzindo-se soluções de 1,3% v/v HNO₃, que foram levadas ao

espectrômetro para mensuração. A determinação do elemento em questão foi efetuada através de Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS), utilizando-se de um Espectrômetro ZEE nit 60 equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman, da Analytik Jena. Uma solução de nitrato de paládio ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$) foi utilizada como modificador químico e, conseqüentemente, adicionada a cada solução a ser analisada. Esta foi preparada a partir de uma solução padrão de nitrato de paládio, modificador para forno de grafite AAS (Merck No.B9366989 710).

Uma solução padrão de Cd (1000 mg/L) foi preparada a partir de diluição adequada de ampola Titrisol® Merck. As soluções padrão na faixa de trabalho (2 – 10 ng/ml) foram preparadas a partir da solução padrão anterior (1000 mg/L), utilizando 1,3% v/v HNO_3 .

O controle de qualidade foi efetuado através do uso de brancos, que foram submetidos a procedimentos idênticos àqueles pelos quais passaram as amostras, bem como através da determinação de cádmio no material de referência DOLT-4 (NRCC – *National Research Council of Canada*). As soluções padrão e os brancos foram preparados utilizando-se água deionizada, altamente purificada (18.2 M Ωcm) através de Sistema MilliQ. O material de referência DOLT-4 foi tratado e analisado da mesma forma que as amostras e nossos resultados analíticos (em $\mu\text{g/g} \pm \text{D.P.}$) relativos à determinação de cádmio no mencionado material ($22,8 \pm 1,34$, $n=5$) estiveram de acordo com o valor certificado ($24,3 \pm 0,8$). O limite de detecção para o método foi de 0,07 ng/ml, tendo sido este determinado pela razão entre o desvio-padrão de dez leituras do branco, multiplicado por três, e a inclinação da curva analítica.

O programa de temperatura utilizado e as condições de operação do aparelho são mostrados nas tabelas 3 e 4 respectivamente.

Tabela 3 - Programa de temperatura usado para determinação das concentrações de cádmio em água.

Secagem 1	
Temperatura (°C)	90
Rampa / Hold (s)	6 / 15
Secagem 2	
Temperatura (°C)	120
Rampa / Hold (s)	2 / 25
Pirólise	
Temperatura (°C)	900
Rampa / Hold (s)	10 / 20
Atomização	
Temperatura (°C)	1450
Rampa / Hold (s)	0,2 / 5

<i>Cleanout</i>	
Temperatura (°C)	1950
Rampa / Hold (s)	0,5 / 7

Tabela 4 - Condições de operação para determinação de cádmio no espectrômetro de absorção atômica Analytik Jena ZEE nit 60.

Comprimento de onda (nm)	2228,8
Fenda (nm)	0,8
Corrente da lâmpada (mA)	6,0
Modo de integração	Área de pico
Tempo de integração (s)	5,0
Modo do Zeeman	2 campos
Campo máximo (T)	0,8
Volume de injeção (µl)	16,0

4.9 Análise estatística

A análise estatística utilizada na interpretação dos resultados do ensaio cometa foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) com o teste Post Hoc de Dunnett e, para os resultados do ensaio de acumulação foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com auxílio do programa Graph Pad Prism® versão 5.0 de 2007.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Acumulação de cilindrospermopsina (CYN) nos organismos

A Tabela 5 apresenta os resultados do ensaio crônico de acumulação de CYN em larvas de *C. xanthus* durante oito dias de exposição, além das concentrações de CYN na solução, o peso seco dos organismos obtidos após liofilização de todas as larvas juntas e a concentração de CYN nos organismos em todos os dias de ensaio. Evidencia-se que os percentuais de acúmulo encontrados nos tecidos dos organismos foram baixos, quando comparados à quantidade de toxina oferecida, que pode estar relacionado a um processo de saturação dos organismos, porém para certificar tal informação é necessário um estudo de acumulação e depuração do animal.

Cabe ressaltar que a variação ocorrida na concentração de CYN disponível na solução durante os dias de ensaio pode estar relacionada aos debris celulares, já que o concentrado celular (extrato celular) não foi centrifugado e filtrado após o processo de gelo/degelo para ser oferecido aos organismos, então ora a toxina esteve mais dissolvida, ora mais associada ao material particulado. Outro fator que pode ter influenciado a disponibilidade de toxina é a adsorção a partículas do alimento oferecido. Sabe-se que a preferência alimentar dos organismos bentônicos no ambiente natural é detritívora e que a este alimento, alguns contaminantes se aderem possibilitando a ingestão de substâncias tóxicas.

Tabela 5 – Valores de concentração de CYN (ng.ml^{-1}) oferecida às larvas de *C. xanthus*; peso seco das larvas tomados após liofilização (mg); concentração de CYN nas larvas após ensaios (ng.mg^{-1}) e porcentagem (%) de acúmulo de toxina, durante ensaio de exposição crônica.

Dias de Ensaio	Concentração de CYN na solução (ng.ml^{-1})	Peso seco das larvas (mg) em todos os dias de ensaio	Concentração de CYN nos organismos (ng.mg^{-1}) em todos os dias de ensaio	% de CYN Acumulada
1° dia	470			0,34
3° dia	563	7,3	239	0,28
5° dia	611			0,26
7° dia	493			0,32

No gráfico ilustrado na Figura 14 observa-se que houve uma tendência a um maior acúmulo no primeiro dia de experimento. Mas, através do teste de Kruskal-Wallis foi possível avaliar que não há diferenças significativas entre os dias de exposição ($p < 0,05$).

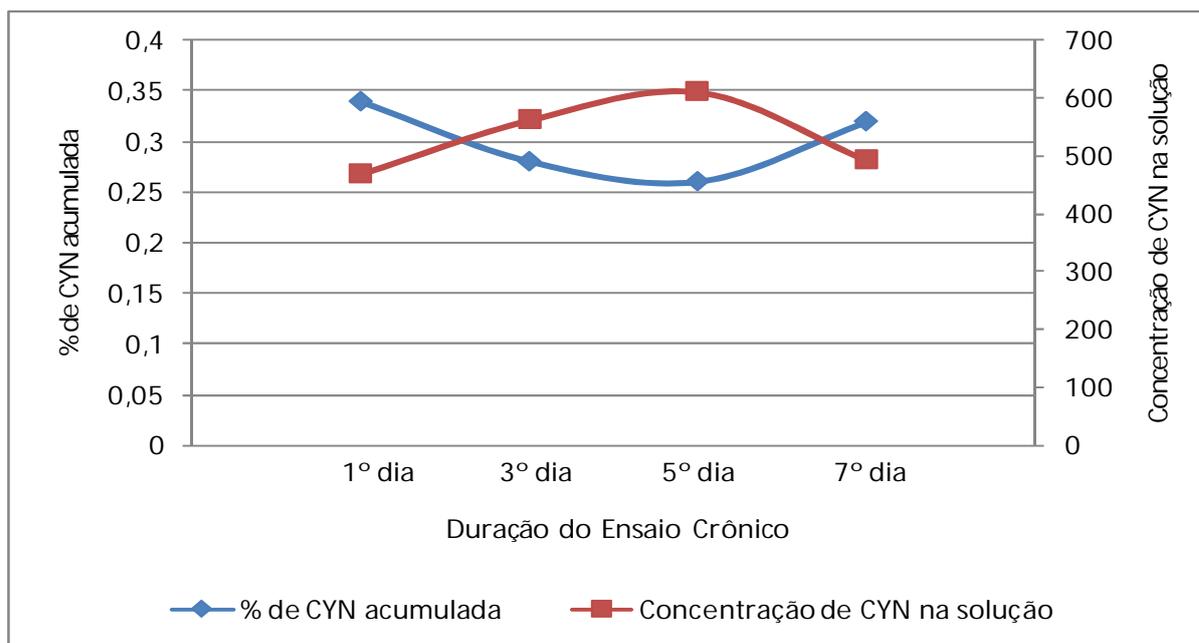


Figura 14 – Porcentagem de acumulação de CYN nos tecidos dos organismos expostos ao extrato celular tóxico e concentração de CYN na solução. Não houve diferença significativa entre os dados de acumulação (Kruskal-Wallis – $p < 0,05$).

Os *C. xanthus* são vulneráveis a absorção transdérmica, devido sua morfologia em certas etapas do ciclo de vida, e seu contato prolongado com toxinas dissolvidas. Essa absorção pode ocorrer durante o crescimento das larvas, quando elas passam por um processo de ecdise, rompendo o exoesqueleto quitinoso e formando outro, de maiores dimensões. Embora essa quitina seja rígida devido à esclerotização (envelhecimento), existem regiões em que a cutícula que reveste a parede do corpo permanece membranosa, o que permite a contaminação do ambiente por processo passivo. Para a formação da nova cutícula, ocorrem dois processos: a separação da cutícula velha da epiderme e a sua posterior ruptura (COSTA e IDE, 2006). Esses autores acrescentam que quando a cutícula se separa da epiderme, o líquido de muda é secretado no espaço entre as duas. Esse líquido contém enzimas, uma protease e uma quitinase, que digerem a endocutícula da cutícula velha. Após a digestão da cutícula velha, o produto da atividade do líquido de muda é reabsorvido através do tegumento e mais de 90% do material presente na cutícula pode ser reaproveitado para a formação da nova cutícula.

Diante de tal explicação, no presente trabalho, além da ingestão do alimento contaminado pela CYN, é provável que as larvas de *C. xanthus* também tenham absorvido mais toxina nos períodos de mudanças entre os estágios larvais (ínstar I ao IV), uma vez que a toxina do meio que estava disponível para os organismos pode ter sido absorvida de forma passiva pela membrana permeável. Ou mesmo durante a muda, grande parte da toxina

presente entre as camadas da cutícula foi reabsorvida junto com o que foi digerido pelo líquido de muda. E, de acordo com Runnegar *et al.* (2002) o pequeno peso molecular de CYN torna possível a difusão passiva, sendo esta considerada uma via importante para a absorção.

Segundo White *et al.* (2006) os resultados de acumulação dos organismos também depende da temperatura, do tamanho dos organismos-teste e do método de extração da toxina. No presente estudo, essas três variáveis citadas foram mantidas controladas para que independente do tratamento os organismos passassem pelas mesmas condições de exposição.

Nogueira *et al.* (2004), observaram uma baixa concentração de CYN no tecido de *Daphnia magna* após exposição aguda de 24 horas ($0,025\text{ng}\cdot\text{animal}^{-1}$) e após 48 horas de exposição ($0,020\text{ng}\cdot\text{animal}^{-1}$) a extrato celular contendo CYN. Os autores atribuíram tal resultado a intoxicação progressiva dos organismos, refletida pela diminuição na taxa de alimentação.

Estudos laboratoriais avaliaram o potencial do gastrópode *Melanooides tuberculata* em acumular toxina em seus tecidos e na concha após exposição de 7 e 14 dias de células inteiras e extrato celular de *C. raciborskii*. Ao final do experimento foi confirmado que os organismos acumularam toxina nos tecidos, porém, não foi detectado bioconcentração de CYN nas conchas (White *et al.*, 2006). O mexilhão *Alathyria pertexta pertexta* também demonstrou acumular CYN nos tecidos, na ordem de $130\text{-}560\ \mu\text{gCYN}\cdot\text{kg}^{-1}$, quando exposto a água de um reservatório contendo menos de $0,8\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de toxina (ANDERSON *et al.*, 2003).

Silva (2008) em trabalho com a mesma cepa utilizada na presente dissertação (CYP-011K) observou que juvenis de tilápias (*Oreochromis niloticus*) ao ingerirem extrato celular equivalente a $1,5 \times 10^7$ células, acumularam em baixos percentuais a toxina nos músculos e nas vísceras, detectável desde o terceiro dia de exposição, para ambos os ensaios realizados durante 15 e 30 dias. Houve oscilação na concentração de CYN que o autor sugeriu como sendo devido ao processo de detoxificação do animal.

Em um estudo mais recente realizado no Lago Catemaco, Berry e Lind (2010) observaram acúmulo de CYN nos caracóis de água doce – Tegogolo (*Pomacea catemacensis patula*). A toxina foi detectada nos tecidos do animal em $3,35 \pm 1,90\ \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, através de técnica de imunoensaio do tipo ELISA, representando um fator de bioacumulação de 157. A concentração ambiental foi de $20\ \text{ng}\ \text{CYN}\cdot\text{L}^{-1}$, relativamente baixa para o comumente encontrado na coluna d'água, mas mesmo assim foi demonstrada a bioconcentração.

Puerto *et al.* (2011) avaliaram o estado fisiológico de duas espécies de bivalves, *Mytilus galloprovincialis* e *Corbicula fluminea*, expostos a cianobactéria *C. raciborskii* produtora de CYN. Os autores relataram alterações nas atividades das enzimas glutaciona

peroxidase, glutathione S-transferase (que são enzimas de estresse oxidativo utilizadas para avaliar efeitos tóxicos e detoxificação) e em proteínas do citoesqueleto dos animais. Sugere-se essa mesma investigação com *C. xanthus* em estudos futuros a fim de avaliar se esses organismos também sofrem alterações na atividade das enzimas.

O resultado do ensaio de exposição crônica mostrou que CYN em concentração equivalente a condição de floração normalmente encontrada em ambientes eutrofizados (10^6 cels.ml⁻¹) foi detectada nos tecidos das larvas de *C. xanthus*. Embora as condições ambientais reais sejam diferentes e sofram interferências, tais como: o processo de degradação da toxina, liberação variada da toxina extracelular decorrentes das condições ecofisiológicas das cepas de *C. raciborskii*, ou mesmo a adsorção da toxina no sedimento, ficou claro que existe o potencial para estes organismos bentônicos absorverem CYN. E, ocorrendo o acúmulo pode haver efeitos na população como um todo, bem como em organismos superiores através de uma possível transferência trófica, já que fazem parte da base da cadeia alimentar, representando a ligação entre produtores e consumidores (SILVA *et al.*, 2008) como também são responsáveis pela ciclagem de nutrientes no sedimento, diminuindo o tamanho das partículas (ABÍLIO *et al.*, 2005). Segundo Kinnear (2010) organismos de nível trófico inferior acumulam maiores concentrações de CYN do que os outros animais, mais biologicamente complexos. No entanto, tais possibilidades devem ser mais bem investigadas, utilizando-se concentrações determinadas em laboratório, assim como, reais concentrações desta toxina nos sedimentos de corpos d'água com florações de *C. raciborskii* produtora de CYN.

5.2 Ensaio cometa

O objetivo deste ensaio foi verificar se o extrato tóxico provocava danos ao DNA, por meio do ensaio cometa, na concentração de 10^3 cels.ml⁻¹ bem como na concentração de $3,3 \times 10^4$ cels.ml⁻¹, considerado condição de possível pré-floração e início de floração, respectivamente.

Na Figura 15 estão apresentados os resultados do ensaio cometa para Índices de Danos (ID) no DNA que varia de 0-400. Nota-se que os valores observados para o controle positivo e para o tratamento B foram semelhantes, estando os dois entre 200 e 250. Seguindo a linha de raciocínio que o índice de danos varia de 0-400 (sendo analisadas 100 células a cada duas lâminas) um índice de 200 seria metade das células com dano máximo, quanto mais o ID se aproxima de 400, maior é o número de apoptoses que se tem. A apoptose no ensaio

cometa é caracterizada pelas células totalmente estouradas, não é possível enxergar o contorno núcleo. No tratamento A também foram observados danos, porém em número menor que os apresentados para controle positivo e tratamento B.

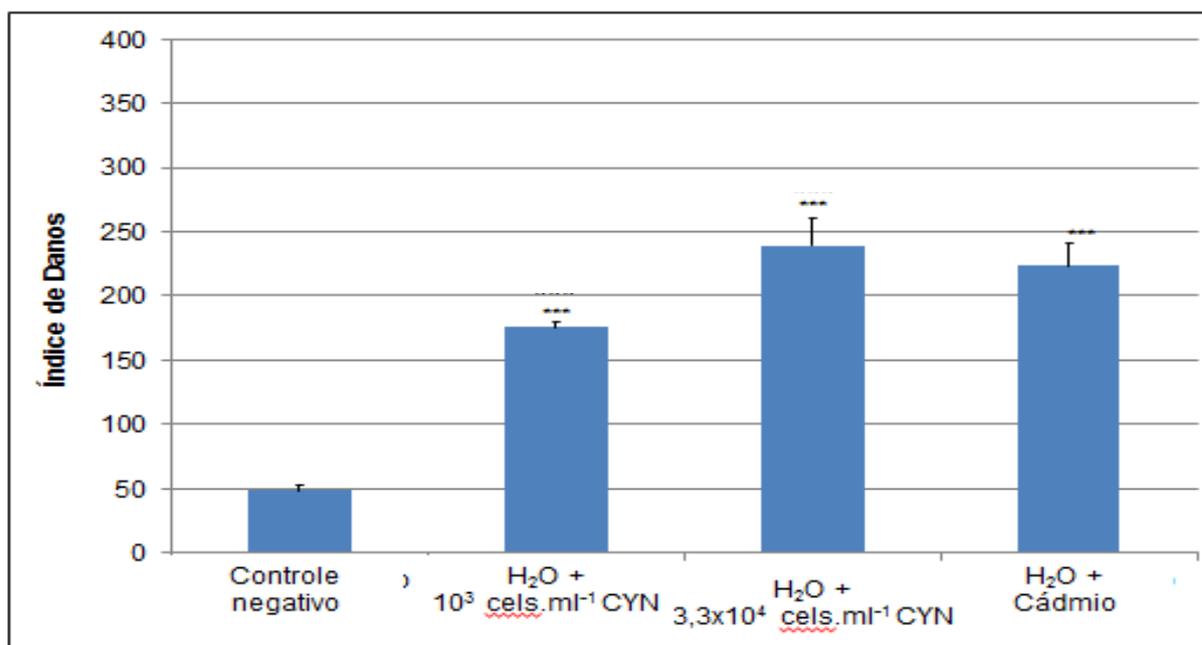


Figura 15 – Valor médio de Índice de Dano (ID) do controle positivo e dos valores médios das concentrações de 10³ e 3,3x10⁴ cels.ml⁻¹ CYN (***)Valores significativamente diferentes em relação ao controle negativo (P<0,05 – Dunnett's Test)).

Na figura 16 estão apresentados os resultados do ensaio cometa para Frequência de Danos (FD) no DNA que é dado em porcentagem. Como observado para índice de danos os valores apresentados para o controle positivo e tratamento B também foram semelhantes, aproximando-se de 100% de danos. Embora seja lenta a ação da cilindrospermopsina (são necessários 5 a 7 dias para atingir seu efeito tóxico máximo) (SANT'ANNA *et al.*, 2006) os organismos foram expostos a 8 dias, então a toxina pode ter atingido seu efeito tóxico máximo resultando na alta frequência de danos observada. O tratamento A também apresentou frequência de danos significativa estando próximo de 95% de danos.

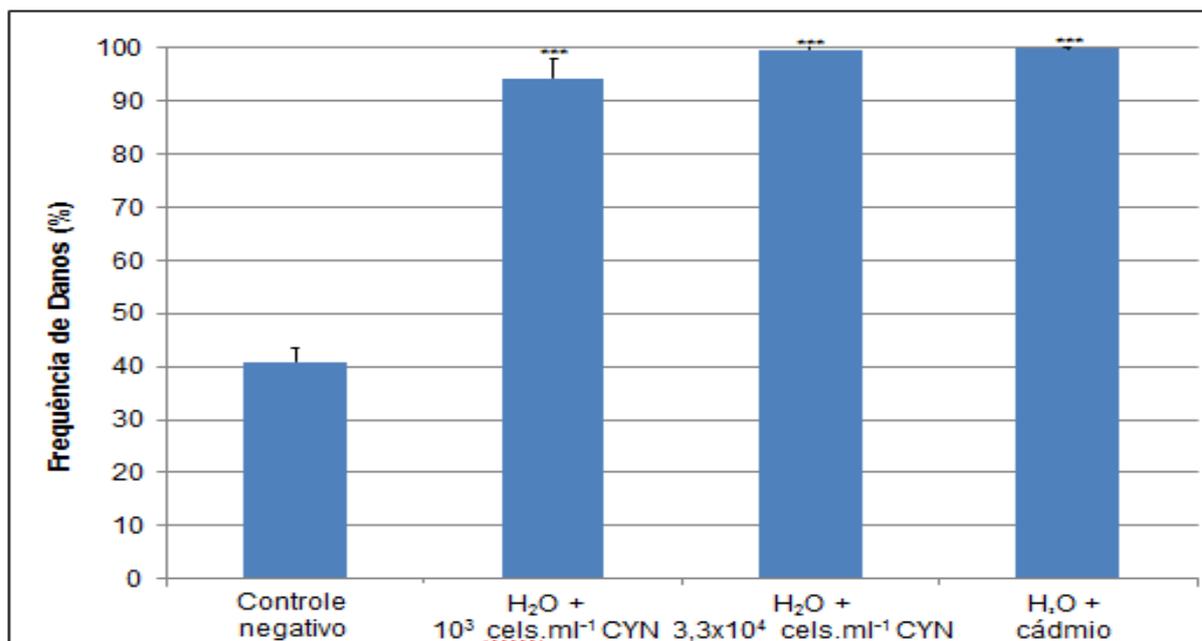


Figura 16– Valor médio de Frequência de Dano (FD) do controle positivo e dos valores médios das concentrações de 10³ e 3,3x10⁴ cels.ml⁻¹ CYN (***)Valores significativamente diferentes em relação ao controle negativo (P<0,05 – Dunnett’s Test)).

No geral a média dos valores de ID e FD foram significativamente maiores para o controle positivo e tratamento A e B, quando comparados ao controle negativo. Tais resultados foram confirmados por meio do teste Post Hoc de Dunnett. (p<0,05).

Cabe ressaltar que o cádmio foi usado como controle positivo para validação da metodologia e certificação de danos, pois o referido metal é considerado como muito tóxico e relativamente acessível.

No controle negativo o número de danos observado é comum, pois se deve ter em mente que não existe célula sem dano no DNA, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno de 1000 lesões diárias no DNA/célula (PRETTI, 2007). Para os demais tratamentos os resultados mostram um efeito genotóxico do extrato celular contendo CYN.

Embora não tenha sido possível a quantificação de CYN pelo método utilizado na solução que continha o equivalente à 10³ cels.ml⁻¹ da cepa CYP-011K utilizada no ensaio crônico, os resultados do ensaio cometa indicaram que o extrato tóxico gerou danos ao DNA, estatisticamente significativos (p <0,05), quando comparados com os resultados do tratamento do controle negativo. Ressalta-se que tal concentração celular é considerada como condição de pré-floração, comumente encontrados nos ambientes eutrofizados. De acordo com Chorus e Bartran (1999), é considerado como início de floração quando a densidade celular atinge a concentração de 10⁴cels.ml⁻¹. Os autores recomendam que nestas condições é necessário o início do monitoramento, caso este recurso aquático seja utilizado para abastecimento público.

Observa-se também que embora o índice de dano tenha apresentado maior diferença entre os dois tratamentos (10^3 cels.ml⁻¹ e $3,3 \times 10^4$ cels.ml⁻¹) (Figura 16), os resultados da frequência de danos (Figura 18) apresentaram-se mais próximos (ambos acima de 90% de danos), o que denota que a partir da concentração mais baixa, condição de pré-floração, já existe o comprometimento da população destes organismos bentônicos.

Além disso, resultados similares tanto de índice de dano como de frequência de dano foram observados entre a concentração de CYN equivalente a $3,3 \times 10^4$ cels.ml⁻¹ e o controle positivo o que indica que ambos geram sérios agravos aos organismos expostos. Cabe assim investigações futuras sobre os danos nas células dos organismos após o processo de detoxificação, pois sabe-se que mesmo depois da toxina ter sido eliminada de topo o corpo, a síntese protéica pode não ser reparada (SEDMAK, 2012).

Embora sejam escassos trabalhos que avaliam danos ao DNA causados por CYN em invertebrados aquáticos, são diversos os trabalhos para vertebrados, como mamíferos. Humpage *et al.* (2005) utilizaram o ensaio cometa para avaliar se metabólitos gerados pelo citocromo P-450 (CYP450) de CYN induzem genotoxicidade e toxicidade aguda em camundongos. Para isso, foram utilizadas células do fígado, tanto na presença como na ausência de inibidores de CYP450, e inibidores conhecidos para bloquear a citotoxicidade aguda de CYN. Os resultados mostraram o comportamento citotóxico de CYN em concentrações superiores a $0,1 \mu\text{M}$, porém acima de $0,05 \mu\text{M}$ já se observou aumento significativo dos danos ao DNA. Humpage *et al.* (2005) também confirmaram que a toxina inibe a produção de glutathiona (GSH). Portanto, pareceu provável que metabólitos derivados de CYP450 fossem responsáveis pela toxicidade aguda e genotoxicidade induzida por CYN no presente trabalho.

O ensaio cometa foi também aplicado no trabalho de Fonseca *et al.* (artigo aceito para publicação, Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology - ISSN 2236-1693) para verificar se água tratada da cidade de Boa Esperança-MG contaminada em condições de laboratório com CYN causa danos no DNA em células humanas *in vitro* (HepG2). Foram utilizados quatro tratamentos (água tratada, água tratada+extrato tóxico de CYN, extrato tóxico de CYN e extrato não tóxico de CYN) e apenas o tratamento contendo extrato tóxico causou danos ao DNA na concentração de $300 \mu\text{g}$ de CYN.L⁻¹ a partir de 24 horas de exposição e de $150 \mu\text{g}$ de CYN.L⁻¹ após 48 e 72 horas de exposição.

Straser *et al.* (2011) também avaliaram o potencial genotóxico de CYN em HepG2 e os resultados forneceram evidências de que CYN é genotóxica e sugerem que esta cianotoxina precisa ser considerada na avaliação de risco à saúde humana.

Embora não correlacionados com o organismo do presente trabalho esses dados refletem a importância em se avaliar organismos de base da cadeia trófica, já que é possível a transferência do contaminante, no caso CYN, para toda a cadeia, podendo afetar animais terrestres e a saúde humana.

5.3 Análise de CYN nas soluções- ensaio cometa

Durante o experimento crônico para a realização do ensaio cometa foram reservadas alíquotas retiradas de apenas um frasco experimental para quantificação de CYN oferecida nas concentrações de 10^3 e $3,3 \times 10^4$ cels.ml⁻¹. Este procedimento foi realizado a cada troca da solução.

Não foi possível quantificar a toxina disponível nas soluções equivalentes a 10^3 cels.ml⁻¹ pelo método utilizado. Na Tabela 6 estão apresentados os valores quantificados de toxina nas soluções equivalentes a $3,3 \times 10^4$ cels.ml⁻¹.

Tabela 6 – Valores de concentração de CYN (ng.ml⁻¹) oferecida às larvas de *C. xanthus* durante o ensaio crônico para detecção de danos ao DNA.

Dias de exposição	Concentração de CYN na solução (ng.ml⁻¹) equivalente a $3,3 \times 10^4$ cels.ml⁻¹
1º dia	16,8
3º dia	19,2
5º dia	16,7

A variação apresentada nos resultados pode ser dada pelo fato das quantificações terem sido realizadas em apenas uma amostra de cada dia de ensaio. Para um próximo trabalho sugere-se a retirada de alíquotas de todas as réplicas visando a quantificação da toxina. Esse procedimento permitirá a obtenção da média dos valores e uma real variação dos mesmos.

Observou-se nas células dos organismos submetidos a essa concentração de floração inicial um alto índice e frequência de danos ao DNA. Pode-se inferir que caso esses mesmos organismos fossem submetidos a uma concentração de CYN equivalente a condição de floração, possivelmente as células entrariam em apoptose, o que poderá ser certificado em experimentos futuros.

Como já citado, vale lembrar que mesmo em concentrações baixas de 20 ng.L⁻¹ de CYN no ambiente, caracóis de água doce foram capazes de acumular toxina nos tecidos.

Tal concentração de CYN pode ocasionar danos ao DNA assim como os observados no presente estudo para condição de pré-floração e floração inicial.

5.4 Análise de cádmio nas soluções – ensaio cometa

Após os organismos serem expostos durante 8 dias a solução com água de manutenção e cádmio ($300 \mu\text{g.L}^{-1}$), foi quantificado o real valor de cádmio na solução e os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração de cádmio ($\mu\text{g.L}^{-1}$) oferecida às larvas durante o ensaio crônico.

Amostras	Concentração de Cádmio na solução ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
1a	7,9
1b	9,5
2a	25,5
2b	11,2
3a	21,5

Legenda: a) Refere-se as soluções preparadas para reposição; b) Refere-se as soluções descartadas a cada dois dias.

A variação apresentada nos resultados pode ser dada pelo fato das quantificações terem sido realizadas em apenas uma amostra a cada dois dias de ensaio.

Com as concentrações obtidas de cádmio foi observado alto índice de danos e frequência de danos na hemolinfa dos organismos-teste. Esses resultados corroboram os dados obtidos por Dornfeld (2006) que observou efeitos de redução da sobrevivência para organismos de *C. xanthus*, efeitos negativos no desenvolvimento, bem como atraso na emergência dos adultos, que atrasaram em torno de 3 dias esse processo quando comparados com o controle.

Os resultados obtidos no presente trabalho e no estudo de Dornfeld (2006) indicam os problemas que a contaminação de ambientes aquáticos por cádmio ou outros metais pode causar nos organismos, afetando todo o ciclo de vida, em nível de indivíduos e até mesmo a população, devido ao atraso na emergência dos adultos ou transferência de contaminantes a cadeia trófica.

6 CONCLUSÕES

- A concentração de CYN equivalente a condição de floração normalmente encontrada em ambientes eutrofizados (10^6 cels.ml⁻¹) foi detectada nos tecidos das larvas de *C. xanthus*, quando avaliada a capacidade de acumulação do organismo;
- Foram detectados danos ao DNA provocados por exposição ao extrato tóxico na concentração equivalente a 10^3 cels.ml⁻¹ e $3,3 \times 10^4$ cels.ml⁻¹, condição de pré-floração e floração inicial, respectivamente;
- Os resultados da frequência de danos foram similares entre as diferentes concentrações de CYN avaliadas, o que denota que a partir da concentração mais baixa, condição de pré-floração, já existe o comprometimento da população destes organismos bentônicos;
- Os resultados de índice de dano e frequência de danos da concentração celular de CYN equivalente a $3,3 \times 10^4$ cels.ml⁻¹ foram similares aos observados no controle positivo de cádmio;
- A concentração de cádmio utilizada se comportou como um efetivo controle positivo, apresentando alto índice de danos e frequência de danos na hemolinfa dos organismos-teste;
- Larvas de *Chironomus xanthus* se apresentaram como boas ferramentas quanto utilizados como organismos-teste em ensaios genotóxicos do tipo cometa.

7 RECOMENDAÇÕES

Ambientes aquáticos com presença de cianobactérias e cianotoxinas requerem cada vez mais investigações sobre os efeitos genotóxicos nas populações. Especial atenção deve ser dada aos organismos bentônicos, devido ao seu papel ecológico e grande representatividade na cadeia trófica. Os resultados obtidos na presente dissertação de mestrado, que se propôs a avaliar os efeitos genotóxicos e de acumulação em *Chironomus xanthus* expostos a extrato tóxico contendo CYN, levantaram algumas questões que devem ser mais bem investigadas.

Portanto, recomenda-se:

- Realização de mais ensaios de acumulação para certificação de uma possível saturação dos organismos após exposição crônica à CYN;
- Realização de ensaio cometa com a concentração de CYN equivalente a condição de floração normalmente encontrada em ambientes eutrofizados (10^6 cels.ml⁻¹) para avaliar se células de *C. xanthus* suportam os danos gerados por essa concentração ou se sofrem apoptose;
- Avaliação dos danos causados pelas reais concentrações desta toxina nos sedimentos de corpos d'água com florações de *C. raciborkii* produtora de CYN;
- Realização de ensaios de detoxificação em *C. xanthus* para avaliar a capacidade desses organismos em se detoxificar e eliminar a cianotoxina acumulada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABÍLIO, F.J.P.; FONSECA-GESSNER, A.A.; WATANABE, T.; LEITE, R.L. Fauna de chironomidae e outros insetos aquáticos de açudes do semi-árido paraibano, Brasil. **Entomologia y Vectores**, v.12 (2), p.255-264, 2005.
- ALMEIDA, C.A. **Estudos ecotoxicológicos de sedimento de represas do Rio Tietê com organismo-teste bentônico: *Chironomus xanthus* Rempel (Insecta: Diptera)**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos – USP, São Carlos, 2002.
- ALMEIDA, C.A. **Aspectos do ciclo de vida de espécies bentônicas nativas e sua utilização na avaliação da qualidade de sedimentos de lagos naturais e reservatórios**. 2007. 181p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos – USP, São Carlos, 2007.
- ANDERSON, L.; FABBRO, L.D.; COWDEN, K. **Assessment of Blue-Green Algal Toxins in Barramundi, Red Clay and Mussels from Awoonga Dam**. Central Queensland University: Gladstone, Australia, 2003.
- ANDRADE, V.M. de; FREITAS, T.R.O. de; SILVA, J. da. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, v.560, p.57–67, 2004.
- AZEVEDO, S.M.F.O. Toxinas de Cianobactérias: Causas e consequências para a saúde pública. Med on line, Rio de Janeiro, v. 01, p. 1, 1998. Disponível em: http://www.medonline.com.br/med_ed/med3_microcis.htm. Acessado em 05 de maio de 2012.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W. JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p. 441-446, 2002.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. & NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, v.6: p.261-265, 1994..
- BANKER, R.; CARMELI, S.; HADAS, O.; TELSCH, B.; PORAT, R.; SUKENIK, A. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Phycology**, v.33, n.4, Aug, p.613-616. 1997.
- BERRY, J.P.; LIND, O. First Evidence of ‘Paralytic Shellfish Toxins’ and *Cylindrospermopsin* in a Mexican Freshwater System, Lago Catemaco, and Apparent Bioaccumulation of the Toxins in ‘Tegogolo’ Snails (*Pomacea patula catemacensis*). **Toxicon**, v.55 (5), p. 930-938, 2010.

- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; PICCIN-SANTOS, V.; KUJBIDA, P.; MOURA, A.N. *Cylindrospermopsis* in Water Supply Reservoirs in Brazil Determined by Immunochemical and Molecular Methods. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 3, p.349-355, 2011.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MOLICA, R. Cianobactérias invasoras: Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ed.30, janeiro/junho 2003.
- BRANDÃO, E.T.P. **Cianobactérias e saúde pública no Brasil**. 2008. 76p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.
- BRANDÃO, L.H.; DOMINGOS, P. Fatores ambientais para a floração de Cianobactérias tóxicas. **Saúde & Ambiente em Revista**, v.1 (2), p.40-50, jul-dez 2006.
- BRASIL. **Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano**. Ministério da Saúde: Fundação Nacional da Saúde. Brasília, 56p. 2003.
- BRASIL. Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html. Acessado em: 6 de junho de 2012.
- CALIJURI, M.C.; ALVES, M.S.A.; SANTOS, A.C.A. Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. São Carlos: RiMa, 2006. p. 118.
- CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K., et al. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v.109 (7), p. 663-668, 2001.
- CARVALHO, P.V.V.B.C; SILVESTRE, A.N.; MOURA, E.B.A. Ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas do gênero *Cylindrospermopsis* em mananciais de abastecimento público no estado de Pernambuco/Brasil – abordagem preliminar. 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES, Rio de Janeiro, Brasil, 3775 – 3783.
- CAVALCANTI, V.A. **Avaliação da toxicidade de sedimentos e águas contaminadas com azocorantes têxteis utilizando *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis***. 2010. 66p. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – ENSP, Rio de Janeiro, 2010.
- CHORUS, I. Cyanotoxin - occurrence, effects, controlling. Factors. Springer Publishers, Heidelberg, 2000.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. **World Health Organization**, E & FN Spon, London, 1999.

- COSTA, M.S. **Eutrofização e florações de cianobactérias tóxicas**. 2003. Monografia (Graduação) - Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO, Rio de Janeiro, 2003.
- COSTA, J.B. **Avaliação ecotoxicológica de efluentes de tratamento secundário de esgoto sanitário após desinfecção com ácido peracético, cloro, ozônio e radiação ultravioleta**. 2007. 167p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos – USP, São Carlos, 2007.
- COSTA, C.; IDE, S. Crescimento e muda. In: COSTA, C.; IDE, S.; SIMONKA, C.E., eds. **Insetos imaturos: metamorfose e identificação**. Ribeirão Preto: HOLOS, 2006. P. 31-36.
- DI PAOLO, C. **Aplicação do ensaio cometa a estudos de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona**. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico – USP, São Paulo, 2006.
- DORNELES, P.R.; LAILSON-BRITO, J.; SANTOS, R.A.; COSTA, P.A.S.; MALM, O.; AZEVEDO, A.F.; TORRES, J.P.M. Cephalopods and cetaceans as indicators of offshore bioavailability of cadmium off Central South Brazil Bight. **Environmental Pollution**, v.148, n.1, p.352-359, 2007.
- DORNFELD, C.B. **Utilização de *Chironomus* sp. (Díptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais**. 2006. 91p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos - USP, São Carlos, 2006.
- EMYGDIO, S.A.B. **efeito de cianotoxinas cilindrospermopsina e microcistina sobre o ciclo de vida de *Chironomus xanthus* (Díptera, Chironomidae)**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2011.
- ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.
- FALCONER, I. R. Health implications of Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In: STEFENSEN, D.A; NICHOLSON, B. C. *Toxic cyanobacteria current status of research and management: Proceedings for an International Workshop*. Adelaide: American Water Works Association Research Foundation, 1994. p.39-44.
- FALCONER, I. R.; HUMPAGE, A.R. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology**, v. 16(2), p.192-195, 2001.
- FERNANDES, E.M.A. **Avaliação da toxicidade de cianobactérias para *Brachydanio rerio* utilizando ensaios a diferentes níveis de organização biológica**. 2001. 72p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciência da Universidade do Porto, Porto, 2001.
- FERRÃO-FILHO, A.S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. **Marine Drugs**, v.9, p. 2729-2772, 2011.

- FONSECA, A.L. **Avaliação da qualidade da água do Rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados.** 1997. 221p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos - USP, São Carlos, 1997.
- FONSECA, A.L.; ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rampel, 1993 (Díptera, Chironomidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, n. 16, v.2, p. 153-161. 2004a.
- FOURNIE, J. W., HILBORN, E. D., CODD, G. A., COVENEY, M., DYBLE, J., HAVENS, K., IBELINGS, B.W., LANDSBERG, J., AND LITAKER, W.. Ecosystem effects workgroup report, *In* Hudnell, H. K. (ed.). **Cyanobacterial harmful algal blooms: State of science and research needs.** Springer, New York, USA. p. 655–674, 2008.
- FREITAS, A.M. de. **Utilização de processos oxidativos avançados para remediação de águas contaminadas por toxinas produzidas por cianobactérias.** 2008. 115p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- GOMES, A.M.A.; MARINHO, M.M.; AZEVEDO S.M.F.O. Which factors are related with the success of *Cylindrospermopsis raciborskii* in brazilian aquatic systems? *In*: Cyanobacteria: Ecology, Toxicology and Management. **Nova Science Publishers**, 2008.
- GOULART, M.D.C.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, nº 1, 2003.
- GUERESCHI, R.M. **Macroinvertebrados bentônicos em córregos da estação ecológica de Jataí, Luiz Antonio, SP: Subsídios para monitoramento ambiental.** 2004. 82p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
- HARADA, K.I., OHTANI, I., IWAMOTO, K., SUZYUKI, M., WATANABE, M.F., WATANABE, M., TERAOKA, K.; Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. **Toxicon**, v.32, n.1, p.73-84, 1994.
- HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, vol.18, nº.1, p.45–51, 2003.
- HAWKINS, P. R., RUNNEGAR, M. T. C.; JACKSON, A.R.B; FALCONER, I.R. 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.
- HUMPAGE, A. Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. *In*: HUDNELL, H.K. **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms.** Chapter 16, 34p. 2008.

- HUMPAGE, A.R.; FENECH, M.; THOMAS, P.; FALCONER, I.R. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutation Research**, v.472, p. 155–161, 2000.
- HUMPAGE, A.R.; FONTAINE, F.; FROSCIO, S.; BURCHAM, P.; FALCONER, I.R. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v. 68, n°14, p. 739-753, 2005.
- KAEBERNICK M.; NEILAN, B.A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 1-9, 2001.
- KINNEAR, S. Cylindrospermopsin: A Decade of Progress on Bioaccumulation Research. **Marine Drugs**, v. 8, p. 542-564, 2010.
- KINNEAR, S.; DUIVENVOORDEN, L.J.; FABBRO, L.D. Sublethal responses in *Melanoides tuberculata* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* containing cylindrospermopsin. **Harmful Algae**, v.6, cap.5, p. 642–650, 2007.
- LANKOFF, A.; CARMICHAEL, W.W. Genotoxicity and carcinogenicity of cyanobacterial toxins. Pp. 145-172. In: Luc Verschaeve (Ed.), Topical Issues in Applied Microbiology and Biotechnology. **Research Signpost**, Kerala, India. 172p. 2006.
- LEE, S.; KIM S., CHOI, J. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.28, p. 85-91, 2009.
- 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, p.1121-1126, 2001.
- METCALF, J.S; LINSAV, J.; BEATTIE, K.A.; BIRMINGHAM, S.; SAKER, M.L.; TÖRÖKNÉ, A.K. ; CODD, G.A. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. **Toxicon**, v.40, n.8, p.1115-1120, 2002.
- MOLICA, R.; ONODERA, H.; GARCIA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOKO, D.; NASCIMENTO, S.; MEGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S.; LAGOS, N. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin aalogue. **Phycologia**, v.41, p. 606-611, 2002.
- MOLLER, P. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.98, p. 336–345, 2006.

- MORAIS, S.S.; MOLOZZI, J.; VIANA, A.L.; VIANA, T.H.; CALLISTO, M. Diversity of larvae of littoral Chironomidae (Diptera: Insecta) and their role as bioindicators in urban reservoirs of different trophic levels. **Braz. J. Biol.** v.70, n.4, p.995-1004, 2010.
- MOREIRA, A.A.; BIZI, R. Analysis of cylindrospermopsin in water with liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS/MS). **Abstract VII International Conference on Toxic Cyanobacteria**, Rio de Janeiro. 2007.
- MOREIRA, C.; FATHALLI, A.; VASCONCELOS, V.; ANTUNES, A. Genetic diversity and structure of the invasive toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Current Microbiology**, v.62 (5), p. 1590-1595, 2011.
- MOREIRA, L.L. **Avaliação ecotoxicológica preliminar de efluentes contendo brometo de etídeo**. 2010. 33p. Monografia (Graduação) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- NEMP – **National Eutrophication Monitoring Programme**, 2002. Disponível em <http://www.dwaf.gov.za/iwqs/eutrophication/NEMP/EutrophicationMonitoringProgramme.pdf>. Acessado em 21 Abril de 2012.
- NOGUEIRA, I.C.G.; LOBO-DA-CUNHA, A.; VASCONCELOS, V. M. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium. **Aquatic Toxicology**, v.80, n.2, p.194-203, 2006.
- NOGUEIRA, I.C.G.; SAKER, M.L.; PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; VASCONCELOS, V.M. Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis radborskii* to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology**, v.19, n.5, p.453-459. 2004.
- NOVELLI, A. Efeito do Vertimec ® 18CE e de seu princípio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e *in situ*. 2010. 168p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- OECD - **Organisation for Economic Co-operation and Development**. Disponível em <http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=ENV/JM/TG%282011%2947&doclanguage=en>. Acessado em 6 de julho de 2012.
- OLIVEIRA, J.M.B. de. **Remoção de *Cylindrospermopsis raciborskii* por meio de sedimentação e flotação: Avaliação em escala de bancada**. 2005. 122p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Tecnologia – UNB, Brasília, 2005.
- OHTANI, I.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Cylindrospermopsin - a potent hepatotoxin from the blue-green-alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of the American Chemical Society**, v.114, n.20, p. 7941-7942. 1992.
- PAGGI, A.C. Formas imaginales y preimaginales de quironomidos (Diptera). II. *Parachironomus longistilus* sp. nov. **Limnobiós**. v.1, p.200-207, 1977.

- PEREIRA, L.O. **Apoptose induzida por extrato aquoso de *Pteridium aquilinum* em células de glândula submandibular humana (HSG) e de epitélio bucal (OSCC-3)**. 2006. 86p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- PRETTI, E.; CAVALCANTE, D.; SIMONATO, J.D.; MARTINEZ, C.B.R. Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.
- PREUSSEL, K.; STUKEN, A.; WIEDNER, C.; CHORUS, I.; FASTER, J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. **Toxicon**, v.47, n.2, p. 156-162, 2006.
- PUERTO, M., CAMPOS, A., PRIETO, A., CAMEAN, A., ALMEIDA, A.M., COELHO, A.V., VASCONCELOS, V. Differential protein expression in two bivalve species; *Mytilus galloprovincialis* and *Corbicula fluminea*; exposed to *Cylindrospermopsis raciborskii* cells. **Aquatic Toxicology**, v.101, N.1, p. 109-116, 2011.
- REINHARDT-POULIN, P.; McLEAN, J.R.; DESLAURIERS, Y.; GORMAN, W.; CABAT, S.; ROUABHIA, M. The use of silver-stained “comets” to visualize DNA damage and repair in normal and Xeroderma pigmentosum fibroblasts after exposure to simulated solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology**, v. 71 (4), p. 422-425, 2000.
- REMPEL, J. G. Neue Chironomiden aus Nordostbrasilien. **Zool. Anz**, v.127, p.209 – 216, 1939.
- RUNNEGAR, M.T.; XIE, C.; SNIDER, B.B.; WALLACE, G.A.; WEINREB, S.M.; KUHLENKAMP, J. *In vitro* hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. **Toxicol. Sci.**, v. 67, p. 81–87, 2002.
- SAKER, M.L.; EAGLESHAM, G.K.. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Toxicon**, v.37, n.7, p.1065-1077, 1999.
- SAKER, M.L.; METCALF, J.S.; CODD, G.A.; VASCONCELOS, V.M. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. **Toxicon**, v. 43, p. 185–194, 2004.
- SAKER, M.L.; NEILAN, B.A.; GRIFFITHS, D.J. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. **Journal Phycol.**, v.35, p. 599-606, 1999.
- SANT’ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.; WERNER, V.R.; DOGO, C.R.; RIOS, F.R.; CARVALHO, L.R. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, v. 126, p. 251-265, 2008.

- SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.; AGUJARO, L.F.; CARVALHO, M.C.; CARVALHO, L.R.; SOUZA, R.C.R. de. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia – SBFic, 2006.
- SANTOS, A.P.M.E. dos; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Hepatotoxicidade associada à microcistina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 417-430, 2008
- SCHEMBRI, M. A.; NEILAN, B. A., SAINT, C. P. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, v.16, n.5, p.413-421. 2001.
- SEDMAK, B. **Cyanobacteria and their toxins: What are they, Where can we find them, Why are they able to prevail and How do they behave?** (Translation IATEFL Slovenia). Ljubljana: National Institute of Biology, 2012.
- SEIFERT, M.; MCGREGOR, G.; EAGLESMAN, G.; WICKRAMASINGHE, W.; SHAW, G.; First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. **Harmful Algae**, v.6, p. 73-80, 2007.
- SHAW, G.R.; SUKENIK, A.; LIVNE, A.; CHISWELL, R.K.; SMITH, M.J.; SEAWRIGHT, A.A.; NORRIS, R.L.; EAGLESHAM, G.K. & MOORE, M.R. Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. **Environmental Toxicology**, v.14, n.1, p.167-177. 1999.
- SHEN, X.Y.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.R.; WICKRAMASINGHE, W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Toxicon**, v. 40 (10), p.1499-1501, 2002.
- SILVA, F.L. da; MOREIRA, D.C.; BOCHINI, G.L.; RUIZ, S.S. Hábitos alimentares de larvas de Chironomidae (Insecta: Diptera) do córrego Vargem Limpa, Bauru, SP, Brasil. **Biotemas**, v. 21 (2), p. 155-159, 2008.
- SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**, ano2, v.2, p.30-33, 2007.
- SILVA, J.; FREITAS, T.R.O.; MARINHO, J.R.; SPEIT, G.; ERDTMANN, B. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genet. Mol. Biol.** v.23, p.241–245, 2000.
- SILVA, R.C. da. **Acúmulo e depuração de cilindrospermopsina (cianotoxina) e seu efeito no crescimento em tilápias juvenis (*Oreochromis niloticus*)**. 2008. 89p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- SILVANO, J. **Avaliação de metais na água, no sedimento e nos peixes da lagoa Azul, formada por lavra de mineração de carvão a céu aberto, Siderópolis-SC**. 2003. 75p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

- SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L.. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SINHA, R.; PEARSON, L.A.; DAVIS, T.W.; BURFORD, M.A.; ORR, P.T.; NEILAN, B.A. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones e Is climate change responsible? **Water Research**, v. 46, p. 1408- 1419, 2012.
- ŠTRASER, A.; FILIPIČ, M.; ŽEGURA, B. Cylindrospermopsin induces DNA damage enhances reactive oxygen species formation and modulates gene expression in HepG2 cells. **Abstract VIII International Conference on Toxic Cyanobacteria**, August 29 to September 4, Istanbul. 2010.
- STRIXINO, S. **Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlensis* sp. (Diptera: Chironomidae)**. 1980, 157p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980.
- STRIXINO, T.S.; STRIXINO, G. Nova espécie do gênero *Chironomus meigen* do sul do Brasil (Diptera – Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.25, n.4, p. 333-340, 1981.
- TERÃO, K., OHMORI, S., IGARASHI, K., OHTANI, I., WATANABE, M.G., HARADA, K-I., ITO, WATANABE, M. 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.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI H.; MIYAMAE Y.; ROJAS E.; RYU, J.-C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206–221, 2000.
- TUCCI, A.; SANT’ANNA, C.L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasil. Botânica**, v.26, n.1, p. 97-112, 2003.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. USEPA/600/R-94/064. Methods for measuring toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Washington, D.C., 192p. 2000.
- VILLELA, I.V. **Avaliação do potencial genotóxico de amostras ambientais da região hidrográfica da bacia do lago Guaíba**. 2006, 153p. Tese (Doutorado) – Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- VILLELA, I.V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.C.; SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.

- VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.; SILVA, J.; HENRIQUES, J.A.P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutat. Res.** v.697, p.78–86, 2006.
- VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M. de; SILVEIRA, J.C.; DIAS, J.F.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutation Research**, v. 628, p. 76–86, 2007.
- WELKER, M.; BICKEL, H.; FASTNER, J. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin - opportunities and limits. *Water Research*, v.36, n.18, Nov, p.4659-4663. 2002.
- WHITE, S.H.; DUIVENVOORDEN, L.J.; FABBRO, L.D.; EAGLESHAM, G.K. Influence of intracellular toxin concentrations on cylindrospermopsin bioaccumulation in a freshwater gastropod (*Melanoides tuberculata*). **Toxicol.** v.47, n.5, p.497-509. 2006.
- WORMER, L.; CIRÉS, S.; CARRASCO, D.; QUESADA, A. Cylindrospermopsin is not degraded by co-occurring natural bacterial communities during a 40 day study. **Harmful Algae**, v. 7, p. 206-213, 2008.
- ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Ed. Rima, 2006, 464 p.
- ZAGATTO, P.A.; BURATINI, S.V.; ARAGÃO, M.A.; FERRÃO-FILHO, A.S. Neurotoxicity of two *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) strains to mice, *Daphnia*, and fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, nº. 4, p. 857–862, 2012.
- ZORATTO, A.C. **Avaliação ecotoxicológica de compostos naturais produzidos por *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* no Vale do Rio Doce, Minas Gerais**. 2007. 222p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – USP, São Carlos, 2007.

10 ANEXOS

ANEXO A: Resultados estatísticos para o ensaio cometa

Detecção de danos no DNA na hemolinfa do organismo bêntonico *C. xanthus* expostos a duas concentrações de cilindrospermopsina e cádmio.

Grupo	n / pool	Índices de Danos (0-400)	Frequência de Danos (%)
Controle negativo	40	48,50 ± 4,59	40,83 ± 2,71
H2O + Cádmio	40	223,20 ± 18,17 ***	99,80 ± 0,45 ***
H2O + 10 ³ CYN	40	175,50 ± 4,04 ***	94,33 ± 3,50 ***
H2O + 3,3x10 ⁴ CYN	40	239,33 ± 21,91 ***	99,67 ± 0,82 ***

*** Valores estatisticamente significativos (p<0,05 - Dunnett's Test) quando comparados ao grupo controle.

Resultados da estatística de Índice de Danos através do Teste de Dunnet realizado no programa Graphpad Prism, para avaliar diferenças significativas entre os danos ocorridos no grupo controle e os outros tratamentos.

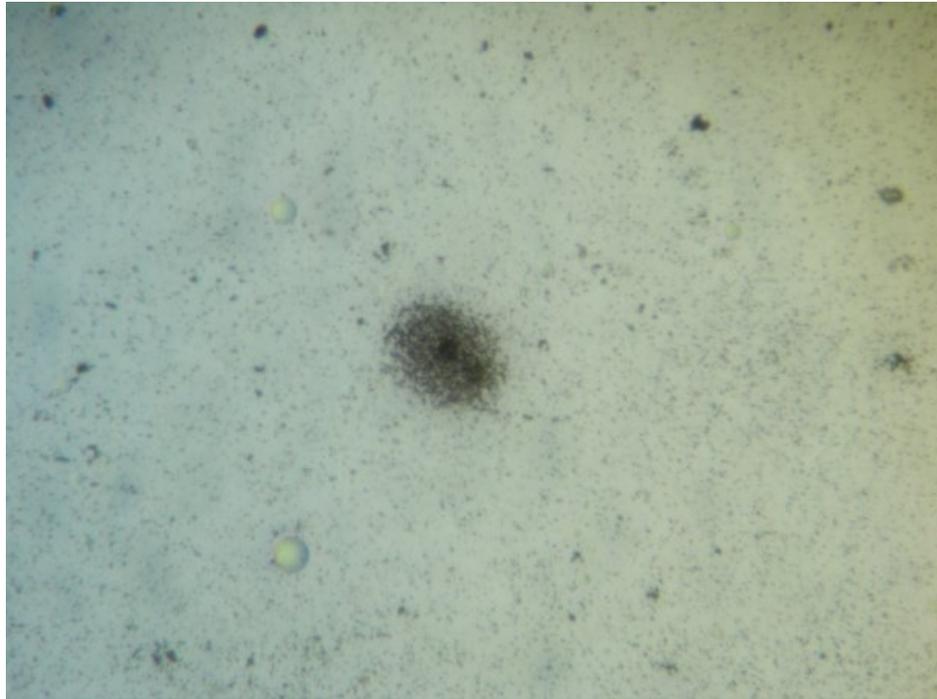
Dunnett's Multiple Comparison Test	MeanDiff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Controle vs H2O + Cádmio	-174,1	20,11	Yes	***	-199.3 to -150.1
Controle vs H2O + 10 ³ CYN	127	15,34	Yes	***	-214.3 to -167.4
Controle vs H2O + 3,3x10 ⁴ CYN	-190,8	23,04	Yes	***	-1223 to -

Resultados da estatística de Frequência de Danos através do Teste de Dunnet realizado no programa Graphpad Prism, para avaliar diferenças significativas entre os danos ocorridos no grupo controle e os outros tratamentos.

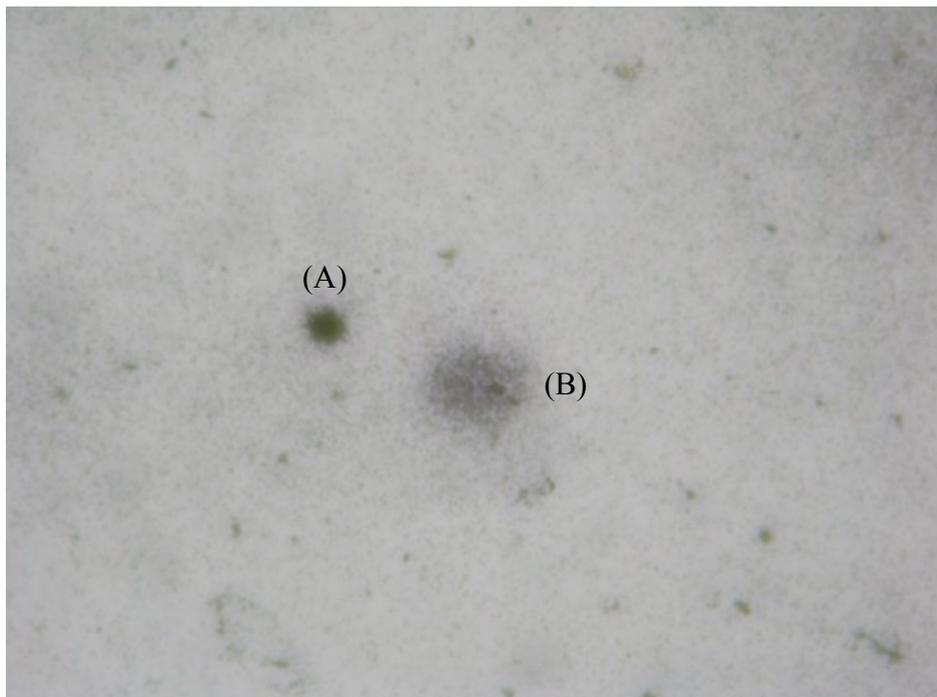
Dunnett's Multiple Comparison Test	MeanDiff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Controle vs H2O + Cádmio	-58,97	41,47	Yes	***	-61.51 to -56.42
Controle vs H2O + 10 ³ CYN	-53,5	39,93	Yes	***	-61.26 to -56.41
Controle vs H2O + 3,3x10 ⁴ CYN	-58,83	43,92	Yes	***	-6280,42 to -

ANEXO B: Células com danos observadas para os tratamentos realizados.

Célula com dano 4 visualizada através de microscópio óptico com aumento de 400x.



(A) Célula com dano 3 (B) Célula em apoptose; ambas visualizadas através de microscópio óptico com aumento de 400x.



ANEXO C: Resultados das amostras de cádmio analisadas e curva de calibração.

Resultados da análise das amostras de cádmio e determinação de cádmio no material de referência DOLT-4 utilizado para verificação da qualidade dos resultados.

No	Name	Pos	weight/g SV/ml	ASDF Pre-DF	Conc.	µg/L	CI	SD	RSD/%
6	dolt1096	1	0.1096 2.00000	8.0000 50.000	A	25780.	1779.	322.3	1.250
7	Dolt1066	2	0.1066 2.00000	8.0000 50.000	A	24100.	1811.	859.6	3.566
8	Cd_1a	3	1.0000 1.00000	50.000	A	7.931	14.20	0.5191	6.545
9	Cd_1b	4	1.0000 1.00000	50.000	A	9.665	14.09	1.267	13.11
10	Cd_2a	5	1.0000 1.00000	50.000	A	25.48	13.19	1.001	3.930
11	Cd_2b	6	1.0000 1.00000	50.000	A	11.24	13.99	0.5995	5.331
12	Cd_3a	7	1.0000 1.00000	50.000	A	21.52	13.39	0.8427	3.916
13	Dolt1096	8	0.1096 2.00000	2.2857 50.000	A	20910.	608.5	196.4	0.939

Curva de calibração utilizada.

