

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE E
RECURSOS HÍDRICOS

EFEITO DE CIANOTOXINAS CILINDROSPERMOPSINA E
MICROCISTINA SOBRE ASPECTOS DO CICLO DE VIDA DE
***CHIRONOMUS XANTHUS* (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)**

Sara Aparecida Borges Emygdio

Itajubá, Abril de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE E
RECURSOS HÍDRICOS

Sara Aparecida Borges Emydio

EFEITO DE CIANOTOXINAS CILINDROSPERMOPSINA E
MICROCISTINA SOBRE ASPECTOS DO CICLO DE VIDA DE
***CHIRONOMUS XANTHUS* (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos como parte dos requisitos para obtenção do Título de mestre em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de Concentração: Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Fonseca

Abril de 2011
Itajubá – MG

Sara Aparecida Borges Emygdio

Efeito de cianotoxinas cilindrospermopsina e microcistina sobre aspectos do ciclo de vida de *Chironomus xanthus* (Diptera, Chironomidae)

Dissertação de mestrado submetida à Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI, Instituto de Recursos Naturais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Aprovada em 28 de Abril de 2011



Dra Ana Lúcia Fonseca – UNIFEI (orientadora)



Dr. Rogério Melloni – UNIFEI



Dra Raquel Moraes Soares – IBCCF/UFRJ

“Agradeço a Deus todas as dificuldades que enfrentei, não fossem por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito ... “ (Chico Xavier)

Este trabalho é dedicado especialmente a minha família, composta por meus verdadeiros mestres, exemplos de ética, renúncia, dedicação, incentivo e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Ana Lúcia Fonseca pela orientação, dedicação e oportunidade de crescimento pessoal que me foi dada ao longo deste trajeto;

Ao Dr. Marcos Eduardo Cordeiro Bernardes pelo apoio e dedicação com toda turma de 2008;

Aos técnicos de laboratório Paulo, João e Cláudio pelos valiosos ensinamentos, por toda a ajuda prestada e amizade;

Ao amigo Diogo pela colaboração e dedicação no laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI durante toda a fase experimental;

Aos membros do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias da UFRJ, Dra. Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo, Dra. Raquel Moraes Soares, Dra. Ana Claudia Pimentel, Dra Valéria Freitas de Magalhães, Dr. Ronaldo Leal Cordeiro e Msc. Rodrigo de Cássio da Silva por toda atenção, disponibilidade e ajuda durante as análises dos experimentos;

A Ana Irene Fonseca Mendes pela ajuda durante as análises estatísticas dos dados;

À CAPES e ao projeto Reuni pela concessão da bolsa de estudo;

Aos amigos Fernanda, Vanessa, Lucas e Luiz Flávio pelo companheirismo e apoio mútuo durante todo o curso;

A família Almeida, em especial aos queridos tios Heleny e Antônio Marcos pelo carinho e pelas caronas para a Unifei;

A minha amada família, meu pai Marcus pelo exemplo de ser humana, minha mãe Rosângela por toda sua grandeza e ao meu irmão Rafael por todo seu afeto.

Ao meu amado esposo Bruno por fazer parte dos meus sonhos e das minhas realizações. Obrigada por todo amor e dedicação. “... *Se não tivesse amor de nada valeria, se não tivesse amor, proveito algum teria...*”

RESUMO

EMYGDIO, S. A. B. Efeito das cianotoxinas cilindrospermopsina e microcistina sobre o ciclo de vida de *Chironomus xanthus* (Díptera, Chironomidae). Dissertação. Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos – MEMARH. Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI. Itajubá: 2011, 53 p.

O enriquecimento de corpos d'água com o aporte de nutrientes provenientes de atividades antrópicas pode culminar com o surgimento de florações de cianobactérias tóxicas. Tal fenômeno pode afetar toda a biota aquática após lise celular, incluindo os organismos bentônicos. As espécies *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa* são produtoras em potencial das cianotoxinas cilindrospermopsina (CYN) e microcistina (MCYST) respectivamente. Com o intuito de avaliar efeitos agudos e crônicos sobre alguns aspectos do ciclo de vida do organismo bentônico *Chironomus xanthus*, no presente trabalho larvas dos instares II e III foram submetidas aos extratos celulares tóxicos e não tóxicos das espécies selecionadas, a uma concentração celular correspondente à floração (10^6 células/ml), previamente cultivadas em laboratório. Os atributos avaliados foram mortalidade, crescimento (avaliado pela largura da cápsula cefálica) e acúmulo de toxinas. Efeitos agudos quanto à mortalidade não foram observados entre os estágios larvais de *C. xanthus*, em exposição aos extratos celulares de ambas as cepas. Porém, a largura da cápsula cefálica indicou retardo no crescimento dos organismos expostos a cepas de *M. aeruginosa* e estímulo as submetidas à *C. raciborskii*. Efeitos crônicos também puderam ser observados por meio da largura da cápsula cefálica, sendo também estimuladas quando expostas as cepas de *C. raciborskii*, e contrariamente aos efeitos da exposição aguda, os organismos também tiveram crescimento estimulado, o que pode inferir um possível processo de adaptação ou mesmo de detoxicação quando expostos a um período maior. *C. xanthus* acumulou mais CYN (35,97 e 29,67 ng/mg instares II e III, respectivamente) comparado à MCYST (0,04 e 0,15 ng/mg instares II e III, respectivamente) exibindo diferença de acúmulo entre os estágios de vida. Tratam-se dos primeiros relatos sobre os efeitos de cianotoxinas numa espécie nativa tipicamente bentônica.

Palavras-chave: efeitos agudos e crônicos, mortalidade, largura da cápsula cefálica

ABSTRACT

EMYGDIO, S. A. B. Effects of the cyanotoxins cylindrospermopsin and microcystin on the life cycle of *Chironomus xanthus* (Diptera, Chironomidae). Dissertation. Master program in Meio Ambiente e Recursos Hídricos – MEMARH. Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI. Itajubá: 2011, 53 p.

Water body enrichment of nutrients caused by antropic activity might propitiate toxic cyanobacteria to bloom affecting the aquatic biota, including benthic organisms after the cell death of the bacteria. The species *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* are potencial producers of the cyanotoxins cylindrospermopsin (CYN) and mricocystin (MCYST) respectively. Aiming to evaluate the acute and chronic effects of these toxins in the life cycle of the benthic organism *Chironomus xanthus*, we exposed chironomid larvae of II and III instars to toxic cell extracts and non-toxic cell extracts of the chosen bacteria species to a concentration corresponding to the maximum blooming (10^6 células/ml), previously cultivated in laboratory. The parameters measured were mortality, growth (evaluated by head capsule width) and toxin accumulation. Acute effects on the mortality were not observed within the larval instars of *C. xanthus*, in maximum exposure to both cell strains. However, the head capsule width indicated a slower growth rate in the organisms exposed to strains of *M. aeruginosa* and a faster growth of the ones exposed to strains of *C. raciborskii*. Chronic effects were also observed in the head capsule width and were equally stimulated when exposed to strains of *C. raciborskii*, but differently from the acute effects, the organisms had faster growth, what might account for a process of adaption or even detoxification when exposed to a longer period. *C. xanthus*, accumulated more CYN (35,97 e 29,67 ng/mg instars II e III, respectively) than MCYST, (0,04 e 0,15 ng/mg instars II e III, respectively) with differences within different life stages. This constitutes the first studies of the effects of cyanotoxins on a typically benthic native species.

Key-words: Chronic and acute effects, mortality, head capsule width.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios do ciclo de vida de <i>C. xanthus</i> (1A), esquema genérico do ciclo de vida de <i>Chironomus</i> sp. (exemplo de <i>C. tentans</i>) (1B) (Fonte: modificado de Dornfeld, 2006).	10
Figura 2 - Representação da estrutura química da molécula de cilindrospermopsina (SILVA, 2008).	11
Figura 3 - Desenho esquemático da molécula de microcistina-LR. Os dois L-aminoácidos variáveis estão destacados na figura (neste caso: arginina- esquerda; leucina- direita). Fonte: Modificado de Carmichael (1994, apud Soares, 2009).	16
Figura 4 - Porcentagens de mortalidade para os instares II e III após exposição aguda de larvas de <i>C. xanthus</i> aos extratos celulares das cepas de <i>C. raciborskii</i>	24
Figura 5 - Porcentagem de organismos mortos dos instares II e III durante exposição aguda (96 horas) aos extratos celulares das cepas de <i>M. aeruginosa</i>	26
Figura 6 - Valor médio (\pm DP) da largura das cápsulas cefálicas de larvas de <i>C. xanthus</i> do ínstar II após exposição aguda aos extratos de <i>C. raciborskii</i> (* e ** = diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0,05$).	29
Figura 7 - Valor médio (\pm DP) das cápsulas cefálicas de larvas de <i>C. xanthus</i> do ínstar III após exposição aguda aos extratos das cepas de <i>C. raciborskii</i> . (* e ** = diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0,05$).	29
Figura 8 - Valores médios (\pm DP) de largura das cápsulas cefálicas de larvas do ínstar II de <i>C. xanthus</i> após exposição aguda aos extratos de <i>M. aeruginosa</i> (*diferenças significativas, $p < 0,05$).	31
Figura 9 - Valores médios (\pm DP) de largura das cápsulas cefálicas de larvas do ínstar III de <i>C. xanthus</i> após exposição aguda aos extratos de <i>M. aeruginosa</i> (* diferenças significativas ANOVA, $p < 0,05$).	31
Figura 10 - Porcentagem de organismos mortos ao final do 7º dia de exposição crônica aos extratos celulares de <i>C. raciborskii</i>	32
Figura 11 - Porcentagem de mortalidade após exposição crônica de larvas de <i>C. xanthus</i> aos extratos celulares das cepas de <i>M. aeruginosa</i>	34
Figura 12 - Média e desvio padrão das cápsulas cefálicas de larvas de <i>C. xanthus</i> após exposição crônica aos extratos de <i>C. raciborskii</i> (* diferença significativa $p < 0,05$).	35
Figura 13 - Valores referentes às médias (\pm DP) das larguras das cápsulas cefálicas de larvas de <i>C. xanthus</i> após exposição crônica aos extratos de <i>M. aeruginosa</i> (* diferença significativa $p < 0,05$).	36
Figura 14 - Carta controle para <i>C. xanthus</i> com a substância de referência KCl g.L ⁻¹	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies mais utilizadas em testes de toxicidade.	5
Tabela 2 - Granulometria do substrato utilizado para cultivo de <i>C. xanthus</i>	19
Tabela 3 - Variáveis físicas e químicas mensuradas no início e término dos ensaios de toxicidade aguda com exposição de larvas de <i>C. xanthus</i> dos instares II e III aos extratos das cepas de <i>C. raciborskii</i>	24
Tabela 4 - Variáveis Físicas e Químicas obtidas no início e fim dos ensaios de toxicidade aguda com exposição de larvas de <i>C. xanthus</i> dos instares II e III aos extratos das cepas de <i>M. aeruginosa</i>	26
Tabela 5 - Variáveis físicas e químicas obtidas no início e término dos ensaios de toxicidade crônica com exposição de larvas de <i>C. xanthus</i> aos extratos celulares das cepas de <i>C. raciborskii</i>	33
Tabela 6 - Variáveis físicas e químicas medidas no início e fim dos ensaios de toxicidade crônica com larvas de <i>C. xanthus</i> em exposição aos extratos celulares das cepas de <i>M. aeruginosa</i>	34
Tabela 7 - Concentração de CYN (ng.mL ⁻¹) oferecida às larvas durante exposição aguda; valor de peso seco (mg); concentração de CYN nas larvas após ensaios (ng/mg) e porcentagem (%) de acúmulo de toxina.	38
Tabela 8 - Concentração de MCYST oferecida às larvas de <i>C. xanthus</i> dos instares II e III durante exposição aguda e porcentagem média de toxina absorvida pelos organismos.	40
Tabela 9 - Concentração de MCYST oferecida aos organismos durante ensaio crônico e porcentagem média de toxina absorvida.	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Ensaio de toxicidade.....	4
3.2 Organismo-teste: <i>C. xanthus</i>	7
3.3 Cilindrospermopsinas.....	10
3.3.1 Efeito de CYN em organismos aquáticos.....	12
3.4 Microcistina.....	15
3.4.1 Efeito de MCYST sobre organismos aquáticos.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Condições de cultivo de <i>C. xanthus</i> em laboratório.....	19
4.2 Cultivo e manutenção de células das cepas produtoras e não produtoras de CYN e MCYST.....	20
4.3 Ensaio de toxicidade aguda - Ínstares II e III.....	21
4.4 Ensaio de toxicidade crônica.....	22
4.5 Extração e análise de CYN e MCYST dos organismos e dos extratos celulares.....	22
4.6 Ensaio de sensibilidade à substância de referência Cloreto de Potássio (KCl).....	23
4.7 Análise estatística dos dados.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Ensaio agudo: Ínstares II e III.....	24
5.1.1 Mortalidade.....	24
5.1.2 Largura da cápsula cefálica – Ínstares II e III:.....	28
5.2 Ensaio de toxicidade crônica.....	31
5.2.1 Mortalidade.....	31
5.2.2 Largura da Cápsula cefálica.....	35
5.3 Absorção de CYN e MCYST após exposição aguda e crônica.....	37
5.3.1 Absorção de CYN nos organismos após exposição aguda (instares II e III).....	37
5.3.2 Absorção de MCYST pelos organismos após exposição aguda (instares II e III) e crônica.....	39
5.4 Ensaio de sensibilidade à substância referência KCl.....	42
6 CONCLUSÕES.....	43
7 RECOMENDAÇÕES.....	44
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O enriquecimento dos corpos d'água com o aporte de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, provenientes da urbanização, atividades agropastoris e industriais, são considerados como umas das principais causas que provocam a eutrofização. O surgimento de florações, em especial de cianobactérias, são uma das respostas ambientais a tal processo. Em geral, os processos que culminam com as florações estão associados a condições eutróficas, entretanto, podem também ser observados em sistemas oligotróficos ou mesmo mesotróficos (FERNANDES *et al.*, 2009).

Cianobactérias são microrganismos procariotos fotossintetizantes, pertencentes ao reino Bactéria, capazes de colonizar uma grande variedade de ambientes, dentre estes, dulcícola, salobro, marinho e terrestre (SANT' ANNA *et al.*, 2006).Entretanto, são mais comumente encontradas habitando o plâncton de ambientes marinhos e de água doce Apresentam uma considerável diversidade morfológica, podendo ser unicelulares (ex: *Chroococcus* sp.) ou filamentosas (ex: *Anabaena* sp, *Oscillatoria* sp., *Planktothrix* sp., *Nostoc* sp., *Cylindrospermopsis* sp.), ocorrer individualmente (ex: gêneros *Synechococcus* sp. e *Aphanothece* sp.) ou agrupados em colônias envolvidos por mucilagem (ex: *Microcystis* sp. *Gomphospheria* sp. e *Merismopedia* sp.) (CALIJURI *et al.*, 2006).

A ocorrência de florações de cianobactérias é ampla. Tal fenômeno já pode ser observado em praticamente todos os continentes (CHORUS & BARTHAM, 1999). Certas florações de cianobactérias podem ser tóxicas devido ao potencial que algumas espécies apresentam em produzir e liberar metabólitos secundários denominados cianotoxinas (APELDOORN *et al.*, 2007).

No Brasil, as cianobactérias potencialmente tóxicas são representadas por 32 espécies pertencentes às ordens Choococales (12 espécies), Oscillatoriales (10 espécies) e Nostocales (10 espécies). A região tropical do país apresenta uma maior diversidade (27 espécies) em relação à região subtropical (com 14 espécies) (SANT'ANNA *et al.*, 2008). Estes mesmos autores relataram que as cepas de maior ocorrência no país são *Microcystis* sp. e *Cylindrospermopsis raciborskii* produtoras em potencial das toxinas microcistina (MCYST) e saxitoxina (STX), respectivamente. Porém, *C. raciborskii* é conhecida como produtora de cilindrospermopsina (CYN) nas regiões temperadas e, até então, a presença desta toxina no Brasil foi identificada em amostras de água e no carvão ativado usado pelo sistema de tratamento de água da clínica de hemodiálise da cidade de Caruaru/PE, onde 54 pessoas morreram devido ao contato com a água contaminada por esta toxina e, principalmente, por

MCYST (CARMICHAEL *et al.*, 2001). Recentemente, Moreira & Bizi, (2007) encontraram uma cepa de *C. raciborskii* no rio Doce/MG, como produtora de CYN.

Efeitos agudos e crônicos de cianotoxinas sobre organismos zooplanctônicos, particularmente com MCYST e STX isoladas de cepas tóxicas provenientes de corpos aquáticos brasileiros, foram relatados por Ferrão-Filho *et al.* (2002) e Ferrão-Filho (2009). Estudos de acumulação, depuração e efeito de CYN no crescimento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas à extrato celular tóxico e células íntegras de *C. raciborskii* foram realizados por SILVA (2008) que observou capacidade de detoxicação ao longo dos dias de exposição.

Os exemplos acima mencionados referem-se apenas a algumas citações sobre efeitos de cianotoxinas em organismos aquáticos. Porém, são poucas as informações, até então relatadas com organismos bentônicos, uma vez que após morte celular e consequente lise, as cianotoxinas podem permanecer nos sedimentos dos ecossistemas aquáticos.

Neste sentido, o presente trabalho optou em utilizar larvas de *Chironomus xanthus*, organismo bentônico endêmico de grande representatividade, que já vem sendo utilizado como organismos teste em ensaios de toxicidade. Desde a sua descrição e proposta de emprego como organismo teste, *C. xanthus* tem sido utilizado em alguns trabalhos no Brasil como, por exemplo: Santos *et al.* (2005), Dornfeld (2006), Almeida (2007), Penido (2010) para avaliação de amostras de sedimento de ambientes contaminados.

O estudo sobre efeitos agudos e crônicos ocorridos após exposição de *C. xanthus* em diferentes estágios larvais aos extratos de *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*, produtores e não produtores das cianotoxinas, MCYST e CYN confere um caráter pioneiro, uma vez que cianotoxinas e quironomídeos são frequentemente encontrados em ambientes eutrofizados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar efeitos crônicos e agudos sobre aspectos do ciclo de vida de larvas da espécie nativa *C. xanthus* (Diptera, Chironomidae) ocasionados pela exposição aos extratos das cepas produtoras e não produtoras das cianotoxinas cilindrospermopsina e microcistina.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da concentração das cianotoxinas contida em 10^6 células/ml, correspondente à condição de floração normalmente encontrada no ambiente;
- Determinar qual o ínstar de desenvolvimento das larvas de *C. xanthus* se mostra mais sensível à exposição, bem como se há diferenças de sensibilidade entre as cianotoxinas;
- Avaliar a capacidade de absorção de cianotoxinas pelos organismos após exposição aguda e crônica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ensaio de toxicidade

A utilização de comunidades biológicas nos bioensaios ecotoxicológicos é uma das maneiras de se obter uma maior relevância ecológica visando a tanto a preservação da biota aquática como do próprio ecossistema (CETESB, 2010).

Segundo Goldstein (1991), a toxicidade é definida como sendo o resultado nocivo à saúde proveniente do sistema composto por substâncias químicas e substâncias próprias do organismo, que se evidenciam sobre organismos vivos. Logo, na toxicidade, o objetivo de análise é o organismo, onde é determinado o efeito causado por uma substância química ou uma mistura, levando em consideração o tempo de exposição e a concentração (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

A toxicidade de determinados agentes no meio hídrico é avaliada por meio de ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos da coluna d'água ou do sedimento de ambientes de água doce, estuarina ou marinha (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

Os ensaios de toxicidade consistem na determinação de efeitos tóxicos causados por um ou por uma mistura de agentes químicos, sendo tais efeitos detectados por respostas fisiológicas dos organismos aquáticos. Portanto, os ensaios ecotoxicológicos expressam os efeitos adversos a organismos aquáticos resultantes da interação das substâncias presentes na amostra analisada (CETESB, 2010). Ao se buscar uma espécie para utilização nos ensaios de toxicidade, e para que esses forneçam resultados confiáveis, além do cultivo e da manutenção dos organismos-teste em laboratório de maneira adequada (ABNT, 2004), é necessário que as espécies escolhidas apresentem determinadas características comuns como sensibilidade a diferentes agentes químicos, ampla distribuição geográfica e estabilidade genética. Ainda como premissa básica, os organismos aquáticos utilizados em ensaios ecotoxicológicos devem pertencer a grupos taxonômicos representativos dos ecossistemas aquáticos (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

Na tabela 1 são apresentadas algumas espécies frequentemente utilizadas em ensaios de toxicidade em ambientes dulcícolas e marinho.

Tabela 1 - Espécies mais utilizadas em testes de toxicidade.

Grupo taxonômico	Espécies
Algas de água doce	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
Algas de água marinha	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Asterionella japonica</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Champia parvula</i>
Microcrustáceos de água doce	<i>Daphnia magna</i> , <i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Hyalella azteca</i> , <i>Hyalella meinerti</i>
Microcrustáceos de água marinha	<i>Mysidopsi bahia</i> , <i>Mysidopsi juniai</i> , <i>Leptocheirus plumulosus</i> , <i>Tiburonella viscana</i> , <i>Artemia salina</i>
Moluscos de água marinha	<i>Mytilus edulis</i> , <i>Crassostrea rhizophorae</i>
Equinodermos	<i>Arbacia lixula</i> , <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Arbacia punctulata</i>
Peixes de água doce	<i>Pimephales promelas</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Poecilia reticulata</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Lepomis macrochirus</i>
Peixes de água marinha	<i>Menidia beryliina</i> , <i>Menidia menidia</i> , <i>Cyprinodum variegatus</i>
Insetos de água doce	<i>Chironomus sp.</i> , <i>Hexagenia sp.</i>
Bactérias de água doce	<i>Spirillum volutans</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Bactérias de água marinha	<i>Vibrio fischeri</i> (<i>Photobacterium phosphoreum</i>)

Fonte: ZAGATTO & BERTOLETTI, (2006).

Atualmente, vários ensaios de toxicidade já estão bem estabelecidos, sendo alguns padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normalização, como Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Association Française de Normalisation (AFNOR), American Society for Testing and Materials (ASTM), American Water Work Association (AWWA), Deutsches Institut für Normung (DIN), International Organization for Standardization (ISO) e Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

Os ensaios ecotoxicológicos avaliam efeitos agudos e crônicos. Os efeitos agudos caracterizam-se por serem mais drásticos, causados por elevadas concentrações de agentes químicos e, em geral, manifestam-se em um curto período de exposição dos organismos (CETESB, 2010), geralmente de um a quatro dias para Cladóceros e peixes, respectivamente. Devido à facilidade de execução, curta duração e baixo custo, os ensaios de toxicidade aguda

foram os primeiros a serem desenvolvidos e, portanto, constituem a base de dados ecotoxicológicos (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

Nos ensaios de toxicidade aguda usualmente os critérios de avaliação são a mortalidade e a imobilidade dos organismos. Em geral, observam-se mortalidade para peixes e imobilidade para invertebrados (Cladóceros, por exemplo). Esses critérios são utilizados porque são facilmente determinados e tem significado biológico e ecológico para o ambiente (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006). Os resultados destes ensaios são dados como a concentração efetiva inicial mediana que causa imobilidade/mortalidade a 50% dos organismos (CE (I) 50), ou tóxico ou não tóxico quando se utiliza amostras ambientais sem diluição.

Cladóceros do gênero *Daphnia* tem sido utilizados como organismos úteis para investigar o impacto de substâncias tóxicas em água doce, os quais existem vários protocolos padronizados por agências internacionais de meio ambiente, inclusive no Brasil (ABNT, 2004, 2005).

Ferrão-Filho *et al.*, (2010) desenvolveram um ensaio utilizando *Daphnia* como organismo teste com o objetivo de avaliar o efeito especificamente de saxitoxina.

O efeito crônico relaciona-se à resposta a um estímulo que continua por um longo tempo. Este período pode durar parte ou todo o ciclo de vida dos organismos aquáticos (ZAGATTO *et al.*, 1992). São mais sutis, causados por baixas concentrações de agentes químicos dissolvidos e são detectados por respostas fisiológicas adversas na reprodução e crescimento dos organismos vivos (CETESB, 2010).

No ambiente aquático, devido a fatores de diluição, em geral, os organismos estão expostos a concentrações sub-letais dos poluentes, que podem não levar à morte do organismo, mas causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais a longo prazo (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006). O resultado destes testes é dado pela concentração máxima do agente tóxico que não causa um efeito observado (CENO), e pela menor concentração que o efeito é evidenciado (CEO). Estes valores devem ser estatisticamente significativos, com relação à sobrevivência e reprodução dos organismos-teste, quando comparados ao tratamento controle (CETESB, 2010).

A escolha de organismos ecologicamente significativos e representativos se faz necessária. Neste sentido, *Chironomus xanthus* (FONSECA & ROCHA, 2004a), *Ceriodaphnia silvestrii* (FONSECA & ROCHA, 2004b) e *Daphnia laevis* tem sido investigados como potenciais organismos teste, inclusive já inseridos nas normas brasileiras, como por exemplo, *C. silvestrii* (NBR 13373/2004). Fonseca & Rocha (*op. cit.*) propuseram o

cultivo e teste de toxicidade utilizando a espécie nativa *C.xanthus* para uso com amostras de sedimento de água doce contaminado.

3.2 Organismo-teste: *C. xanthus*

A comunidade bentônica é a biota que habita o substrato de ambientes aquáticos e sua estrutura pode se alterar em resposta às variações na qualidade desses ecossistemas, possibilitando a elaboração de um diagnóstico ecológico, inclusive as alterações associadas à impactos antrópicos (KUHLMANN, *et al* 2006). Os resultados da caracterização dessa comunidade integram efeitos de vários poluentes presentes na água e principalmente no sedimento, respondem à concentração de contaminantes as vezes não detectáveis por métodos químicos, acusam a ocorrência de despejos intermitentes e inserem o componente temporal na avaliação de qualidade ambiental.

Rosemberg & Resh (1993) defendem a utilização de organismos bentônicos pelas seguintes vantagens ecológicas:

- são comuns a maioria dos corpos d'água;
- estão presentes em lagos, represas e rios, sejam ambientes lênticos ou lóticos;
- vivem em diversos habitats dentro de um ecossistema, geralmente apresentando um grande número de grupos taxonômicos, gerando assim ampla diversidade de respostas a estresses ambientais;
- possuem hábitos sedentários, que permitem a análise espacial do efeito da perturbação;
- tem ciclo de vida comparativamente mais longo, permitindo a avaliação temporal das alterações provocadas por contaminação.

A comunidade bentônica está representada, dentre outros, pelos Filos Aschelminths, Nematoda, Mollusca e Arthropoda. A classe Insecta contém mais de 750.000 espécies descritas, formando o maior grupo de animais existentes no planeta. Os insetos aquáticos caracterizam-se por habitar a água doce nos estágios larvais de desenvolvimento (WETZEL, 1991).

A família Chironomidae (Ordem Diptera) apresenta uma ampla distribuição geográfica, reunindo 10 subfamílias e compreendendo um total de 355 gêneros. Na região neotropical, contribui com 109 gêneros, sendo o grupo mais importante dos insetos de água doce, formando elo na cadeia alimentar. Em ambiente fluvial, as larvas colonizam

basicamente o sedimento e a vegetação aquática, mostrando uma ampla faixa de condições nas quais podem sobreviver, o que reflete a capacidade adaptativa do grupo (TRIVINHO-STRIXINO & STRIXINO, 1995).

Os quironomídeos na fase larval vivem em casulos formados por seda e lodo a poucos centímetros do sedimento, e constituem frequentemente a proporção mais significativa da biomassa bentônica. Possuem papel importante na ciclagem de nutrientes do sedimento e são importantes na dieta de pássaros e peixes de água doce (FONSECA, 1997). Exibem diversos modos de alimentação e podem ingerir uma ampla variedade de alimentos, dentre estes podem ser consideradas cinco categorias: algas, detritos e microrganismos associados, macrófitas, detritos de madeira e invertebrados.

De modo geral, o ciclo de vida dos Quironomídeos pode ser dividido em 4 estágios distintos em ovo, larva, pupa e adulto, sendo os dois últimos estágios de curta duração. O estágio adulto requer apenas um abrigo para o acasalamento, maturação dos ovos e ovoposição. Em contraste, grande parte do ciclo de vida desses organismos ocorre no período larval, pois é neste estágio que se adquire toda a energia necessária para completar o desenvolvimento (FONSECA & ROCHA, 2004a). O ciclo de vida da espécie *Chironomus xanthus* foi investigado e um protocolo de cultivo laboratorial foi desenvolvido com o objetivo de padronização dessa espécie como organismo teste (FONSECA & ROCHA, *op. cit*)

Inicialmente, *C. xanthus* foi descrito por Rempel (1939), apresentando mais tarde sinonímia com *C. domizzi* (Paggi, 1997) e com *C. sancticaroli* (Strixino & Strixino, 1982). Sua distribuição geográfica restringe-se ao Brasil e a Argentina. Strixino & Strixino (1981) relataram a ocorrência de organismos em São Carlos – SP e Spies & Reiss (1996) do holótipo em Campina Grande – Paraíba (FONSECA & ROCHA, *op. cit.*)

Em condições ideais de laboratório, com aproximadamente dois dias de vida após a emergência, os adultos de *C. xanthus* copulam e as fêmeas grávidas depositam os ovos reunidos numa massa gelatinosa no substrato, presa por um pedúnculo e em contato com a água das bandejas de cultivo. Cada fêmea deposita em média 500 – 600 ovos dispostos em forma de espiral. A ovoposição ocorre geralmente no início da manhã ou no final da tarde. Os ovos são deixados imediatamente após a cópula, ocorrendo em seguida à morte das fêmeas. Todo esse processo pode ocorrer em torno de 10 minutos.

A matriz gelatinosa que envolve os ovos, em contato com a água se expande dando a massa ovígera um aspecto tubular recurvado. Decorridos um período de aproximadamente 44 a 48 horas, em incubação a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ocorre a eclosão das larvas, que medem em torno de

0,099 ± 0,005 mm de largura da cabeça (FONSECA & ROCHA, 2004). Os autores acrescentam que as larvas de *C. xanthus* iniciam a construção dos casulos a partir do segundo estágio de vida, pois durante o primeiro permanecem entre as partículas do substrato, alimentando-se das bactérias geradas pela fermentação aeróbia. Este estágio é predominantemente planctônico. Os casulos aumentam de largura e tamanho juntamente com o crescimento da larva, através da adição de pequenas partículas do substrato unidas por fios de seda secretada pelas glândulas salivares. Após o quarto ínstar o organismo passa para o estágio de pupa que possui coloração preta (último dia antes de atingir a fase adulta) e cabeça bem diferenciada, emergindo depois como adulto (imago) (Figura 1).

A largura da cápsula cefálica é a melhor variável para definir a posição do estágio de vida da larva (instar) nos quironomídeos. Cada ínstar tem um tempo de duração diferente, sendo que o quarto ínstar é o mais longo devido à taxa de crescimento geométrico do tamanho do corpo (FONSECA & ROCHA, *op. cit.*).

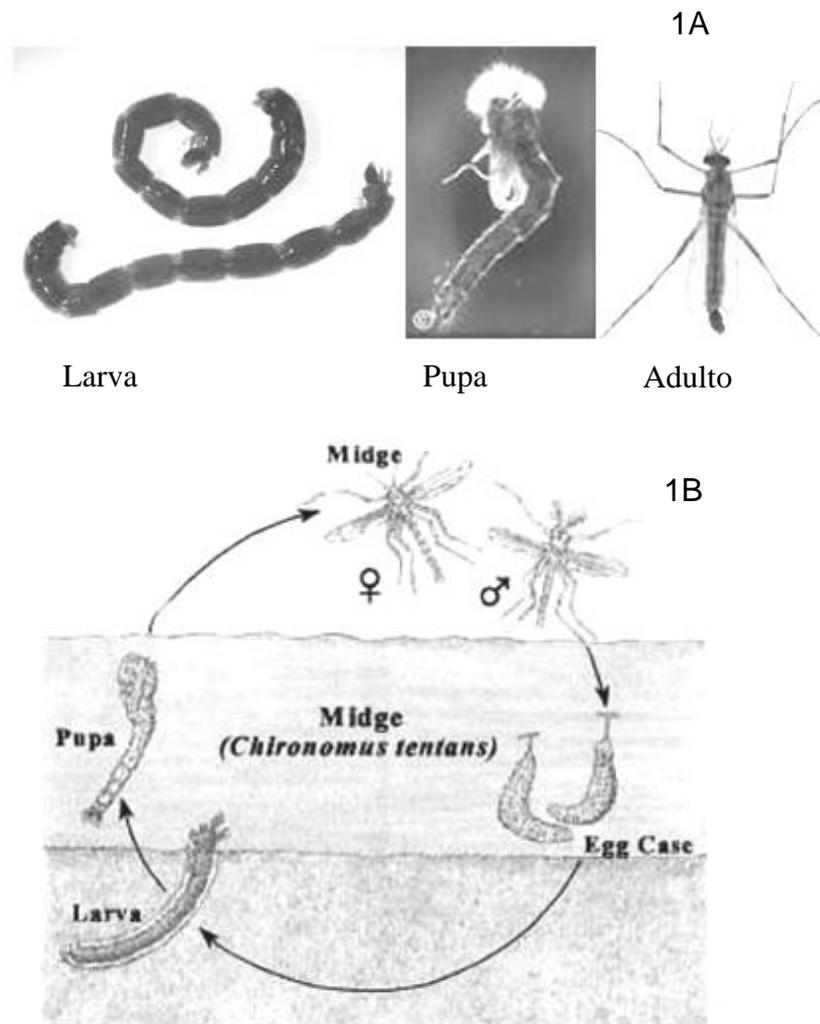


Figura 1 - Estágios do ciclo de vida de *C. xanthus* (1A), esquema genérico do ciclo de vida de *Chironomus* sp. (exemplo de *C. tentans*) (1B) (Fonte: modificado de Dornfeld, 2006).

3.3 Cilindrospermopsinas

As cilindrospermopsinas pertencem ao grupo dos alcalóides, compostas por uma fração tricíclica guanídica ligada através de uma ponte de carbono hidroxilado à fração uracil, sendo esta a fração que lhe confere toxicidade (HUMPAGE, 2008). Trata-se de uma molécula quimicamente estável a luz solar e a altas variações de pH e temperatura (CHISWELL *et al.*, 1999) (FIGURA 2).

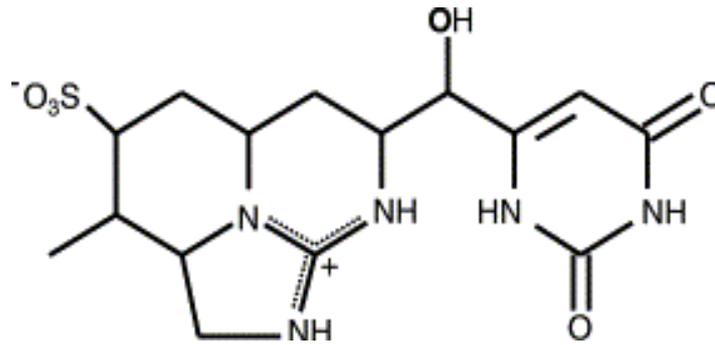


Figura 2 - Representação da estrutura química da molécula de cilindrospermopsina (SILVA, 2008).

A produção do alcalóide hepatotóxico cilindrospermopsina já foi identificada em oito espécies de cianobactérias: *C. raciborskii* (OHTANI *et al.* 1992), *Umezakia natans* (HARADA *et al.*, 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* (BANKER *et al.*, 1997; SHAW *et al.*, 1999), *Raphidiopsis curvata* (LI *et al.*, 2001), *Anabaena bergii* (SCHEMBRI *et al.*, 2001), *Anabaena lapponica* (SPOOF *et al.*, 2006), *Aphanizomenon flos-aquae* (PREUBEL *et al.*, 2006), *Lyngbya wollei* (SEIFET *et al.*, 2007) e possivelmente em *Aphanizomenon gracile* (RÜCKER *et al.*, 2007). São também conhecidos dois análogos dessa toxina, sendo deoxi-cilindrospermopsina identificada em *C. raciborskii* (NORRIS *et al.*, 1999) e 7-epicilindrospermopsina produzida por *Aphanizomenon ovalisporum* (BANKER *et al.*, 1997).

O mecanismo de ação de cilindrospermopsina se dá através do bloqueio da síntese protéica (TERÃO *et al.*, 1994) e os primeiros sintomas clínicos de intoxicação em invertebrados incluem insuficiência renal e hepática. Por via oral, a toxina pode causar gastroenterite por lesionar o revestimento do intestino, hepatite por lesionar células do fígado, mau funcionamento renal por lesões às células dos rins e hemorragia ocasionada por lesões dos vasos sanguíneos (APELDOORN *et al.*, 2007). Segundo Humpage *et al.* (2000) e Shen *et al.* (2002) CYN pode também causar danos a molécula de DNA, indicando, portanto, uma possível atividade carcinogênica e mutagênica.

Tal toxina pode gerar no organismo de vertebrados duas respostas: uma mais rápida ocasionada pela ação da enzima citocromo P-450 e outra mais lenta com a maior toxicidade observada ao final do 5º ou 7º dia de exposição, com inibição da síntese protéica desde o primeiro instante (SOARES, 2009). Como consequência destas duas respostas, tem-se dois valores de DL 50 para camundongos quando expostos à CYN. Por injeção intraperitoneal obteve-se 2100 µg.kg⁻¹ com morte até 24 horas e de 200 µg.kg⁻¹ de peso corpóreo para morte entre 5-6 dias (OHTANI *et al.*, 1992). Por via oral, a DL50 após 5 dias é de aproximadamente 6000 µg kg⁻¹.

Inicialmente, através de estudos toxicológicos Shaw *et al.*, (2000) propuseram um valor aceitável de 15 µg/L para água de abastecimento, valor este incorporado como recomendação na portaria 518 (2004) pelo Ministério da Saúde no Brasil. Estudos mais recentes de Humpage & Falconer (2003), baseados em toxicidade por via oral em doses subcrônicas para camundongos,

propuseram a recomendação de 1µg/L como limite máximo aceitável da toxina em água para consumo humano.

Segundo Sant'Anna, *et al.* (2008), *C. raciborskii* tem sido um dos gêneros de cianobactérias tóxicas mais amplamente distribuído no Brasil. Trata-se de uma cianobactéria filamentosa planctônica de água doce, pertencente à ordem Nostocales. A espécie foi inicialmente identificada em 1912 em amostras de água de uma lagoa em Java e descrita mais tarde como uma cianobactéria tropical por Geitler e Ruttner em 1936. (HAANDE., 2008).

Como já mencionado, *C. raciborskii* é conhecida como potente produtora de CYN e STX, entretanto, no Brasil prevalecem cepas produtoras de STX (SANT'ANNA *et al.*, 2008). No País, até então, as ocorrências relatadas desta cepa como produtora de CYN (“Síndrome de Caruaru” - CARMICHAEL *et al.*, 2002 e rio Doce- MOREIRA & BIZI, 2007, sem confirmação) indica a capacidade potencial que esta cepa possui em sintetizar também esta toxina, além da grande capacidade de dispersão.

Devido às razões mencionadas acima, e também pelo fato desta toxina ter sido descoberta recentemente, quando comparada com as microcistinas, as informações sobre efeitos desta toxina em organismos aquáticos ainda são insuficientes, conforme pode-se constatar na descrição no tópico a seguir. Estes fatos estimularam a realização da presente dissertação. Para tanto, foram utilizadas duas cepas de *C. raciborskii*, uma produtora de CYN de origem australiana, e uma não produtora de qualquer cianotoxina, isolada de um reservatório em Pernambuco/BR.

3.3.1 Efeito de CYN em organismos aquáticos

Uma das hipóteses lançadas sobre a razão da produção de cianotoxinas seria o controle da herbivoria, uma vez que cianobactérias participam das cadeias alimentares como alimento para o zooplâncton e peixes herbívoros (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009). As rotas de exposição destes organismos às estas toxinas podem ocorrer pela ingestão direta de células vivas ou pelo contato e absorção de toxinas disponíveis no ambiente (FOURNIE *et al.*, 2008).

Cianobactérias presentes em ambientes naturais podem afetar potencialmente a sobrevivência, o crescimento e a fecundidade de populações inteiras de zooplâncton. Vários fatores têm sido propostos para explicar tais efeitos adversos, incluindo insuficiência nutricional, interferência na capacidade de alimentação e a produção de substâncias tóxicas (SUSEELA *et al.*, 2008).

O potencial de *C. raciborskii* em produzir mudanças na estrutura de populações do zooplâncton em corpos d'água naturais vem sendo investigado. Hawkins & Lampert (1998) observaram uma redução proporcional na abundância de espécies de cladóceros quando na

presença de filamentos de *C. raciborskii* produtores de CYN, com diminuição da taxa de filtração. A toxina CYN também já é conhecida por ser tóxica para outros crustáceos como *Artemia salina* (NOGUEIRA *et al.*, 2004).

Nogueira *et al.*, (*op.cit*) em ensaios realizados com *Daphnia magna*, demonstraram que populações naturais de *Daphnias* submetidas a florações de *C. raciborskii* produtoras de CYN podem apresentar alta taxa de mortalidade, redução de crescimento do corpo e efeitos negativos quanto a fecundidade devido à presença dos metabólitos tóxicos. Os autores ainda salientam o fato de CYN ter sido detectada nos tecidos dos organismos, indicando que *D.magna* é potencialmente capaz de transmitir a toxina para níveis tróficos superiores.

Alguns estudos têm demonstrado que extratos de células de cianobactérias são mais tóxicas para *Daphnias* do que a exposição à toxina purificada, sugerindo que outros compostos podem vir a contribuir com o efeito tóxico. Um estudo realizado por Metcalf *et al.*, (2002), investigando a influência de CYN e de seu extrato purificado sobre a sobrevivência de *Artemia salina* constatou maior mortalidade para os organismos expostos ao extrato celular em comparação aos expostos à toxina pura.

Os principais modos de captação de CYN são desconhecidos. A abundância relativa da toxina em frações extra e intracelular no ambiente, incluindo a variação espacial e temporal dependem, principalmente, da especiação da floração e da idade de uma possível floração tóxica. Isso pode ser crítico, uma vez que a fração biodisponível está indissociavelmente ligada às rotas de captação da toxina pelos organismos. Recentemente, este conceito tem sido investigado com o objetivo de prever e gerir riscos da bioacumulação da toxina por organismos aquáticos (WHITE *et al.*, 2006).

Existem também alguns estudos sobre acumulação de CYN em organismos aquáticos de água doce. Dentre estes, destacam – se os realizados com peixes. Estes têm demonstrado que CYN pode exercer efeitos diversos, incluindo danos ao fígado, as guelras e aos rins, distúrbios no equilíbrio iônico, mudanças comportamentais, redução no crescimento e mortalidade (SILVA 2008).

Silva (2008) avaliou o acúmulo, a depuração e o efeito da presença de CYN no crescimento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a extrato celular tóxico e células íntegras de *C. raciborskii* produtoras de CYN. O autor observou que peixes jovens alimentados com extrato tóxico acumulam proporcionalmente mais toxina do que os animais alimentados com células íntegras, e que houve um padrão oscilatório ao longo do tempo de exposição à toxina, o que pode estar relacionado ao processo de detoxificação. Este foi o primeiro trabalho que investigou a bioacumulação de CYN em tecidos de tilápias, uma vez

que este organismo é utilizado como alimento humano, o que revela um risco potencial para saúde humana.

No que se refere aos macroinvertebrados bentônicos, alguns estudos de bioacumulação de CYN em decapodas e bivalvas foram realizados. Saker & Eaglesham (1999) estudaram o acúmulo de CYN em *Cherax quadricarinatus* (Decapoda) provenientes de açude de aquíicultura em condições de laboratório e verificaram maior acúmulo desta toxina no hepatopâncreas. White *et al.*, (2005), em estudo com *Melanooides tuberculata* avaliaram o potencial em bioconcentrar e bioacumular CYN nos tecidos dos organismos expostos ao extrato e à células intactas de *C. raciborskii*.

Tanto bioconcentração quanto bioacumulação foram observadas, porém, a contaminação dos tecidos através da exposição ao extrato celular foi menor do que quando expostos a cultura de células inteiras. Deste modo, os autores concluíram que embora a captação de CYN tenha ocorrido tanto por via intra quanto extracelular, a disponibilidade da toxina intracelular foi fundamental para afetar os tecidos do molusco.

Kinnear *et al.* (2007) também investigaram possíveis efeitos sub-letais em *M. tuberculata* durante exposição ao extrato e células intactas *C. raciborskii* produtora de CYN. Os autores observaram que ambos os tratamentos não causaram alterações na mortalidade, taxa de crescimento ou comportamento nos indivíduos adultos e sim na liberação de filhotes pela bolsa incubadora, o que revela um efeito na reprodução destes organismos.

Estudos da distribuição de toxinas em tecidos de moluscos bivalves têm mostrado que a maioria das toxinas está presente na massa visceral, resultante do consumo de células contendo toxina e pela presença de toxinas no trato digestivo. Saker *et al.*, (2004) demonstraram a capacidade do mexilhão de água doce *Anodonta cygnea* em acumular grande concentração de CYN na hemolinfa em proporções superiores as encontrada no ambiente. Os autores encontraram concentrações de CYN da ordem de 2,9 a 5,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ nos tecidos (corpo e vísceras), mas valores maiores (61,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ocorreram na hemolinfa deste bivalve. Estes autores também referem que a concentração máxima desta toxina atingiu 408 $\mu\text{g L}^{-1}$ na hemolinfa do bivalve quando a concentração no meio era de 34 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Através de análise proteômica e bioquímica, Puerto *et al.*, (2010) investigaram os efeitos da exposição dos bivalves *Mytilus galloprovincialis* e *Corbicula fluminea* à cianobactéria *C. raciborskii* produtora de CYN com objetivo de avaliar o estado fisiológico dos organismos. Foram relatadas alterações nas atividades das enzimas glutathione S transferase (GST) e em proteínas do citoesqueleto dos animais, traduzindo a condição de

estresse fisiológico. A toxina CYN foi capaz de afetar as diferentes vias bioquímicas relacionadas com a produção de energia, função mitocondrial e transporte de metal.

3.4 Microcistina

Microcistinas são classificadas como heptapeptídeo monocíclicos. Estas foram primeiramente identificadas e isoladas da espécie *Microcystis aeruginosa* (BISHOP *et al.*, 1995). São as toxinas mais frequentemente encontradas em ambientes de água doce, podendo ser isoladas de várias espécies de cianobactérias como os gêneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* e *Nostoc*. Atualmente, mais de 70 variantes estruturais de MCYST são conhecidas (GOMES *et al.*, 2009).

O primeiro relato da presença de MCYST no Brasil foi feito por Azevedo *et al.* (1994), que estudaram uma cepa de *M. aeruginosa*. Desde então, a produção de tais toxinas já foi registrada em *Aphanocapsa cumulus* (DOMINGOS *et al.*, 1999), *Radiocystis fernandoi* (VIEIRA *et al.*, 2003), *M. panniformis* (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.* 2005), *M. viridis* e *M. wesenbergii* (SANT'ANNA *et al.*, 2008). Estas toxinas são caracterizadas pela presença de 5 D-aminoácidos e 2 L-aminoácidos, sendo sua estrutura geral descrita como: ciclo-(D-alanina₁-X₂-D-MeAsp₃-Y₄-Adda₅-D-glutamato₆-Mdha₇), onde D-MeAsp₃ é D-eritro-β-ácido metilaspártico, Mdha é N- metildehidroalanina e Adda é (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico, onde os L-aminoácidos podem ser arginina ou leucina. (SOARES, 2009) (FIGURA 3).

Microcistinas são solúveis em água, metanol e etanol; resistentes a hidrólise química ou oxidação em pH neutro; bastante estáveis à luz natural. Apresentam alta estabilidade química e apesar de sua degradação fotoquímica já ter sido demonstrada por Tsuji *et al.* (1995) e por Welker & Steinberg, (1999), tal processo é de menor relevância, pois geralmente os corpos d'água que contenham elevadas concentrações de microcistina são eutróficos, apresentando portanto uma maior turbidez. Sua degradação microbiana é rápida. Diversas fases podem ser observadas antes mesmo da total degradação ocorrer, provavelmente porque as bactérias que podem degradar microcistina nem sempre estão presentes em quantidades suficientes ou apresentem necessidades de adaptação. No entanto, uma vez que se inicie a degradação, a meia vida pode estar no intervalo de poucos dias (1 a 2), conforme JONES & ORR (1994).

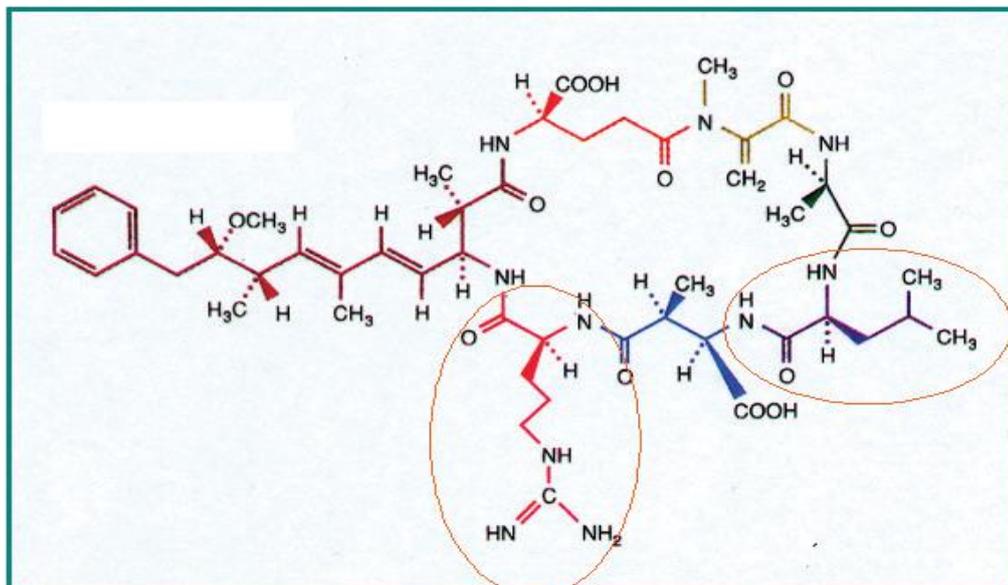


Figura 3 - Desenho esquemático da molécula de microcistina-LR. Os dois L-aminoácidos variáveis estão destacados na figura (neste caso: arginina- esquerda; leucina- direita). Fonte: Modificado de Carmichael (1994, apud Soares, 2009).

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias está relacionado à presença de hepatotoxinas, que são toxinas de ação mais lenta, podendo causar morte num curto intervalo de tempo (horas ou dias). (MOLICA & AZEVEDO, 2008).

Essas hepatotoxinas têm o fígado de vertebrados como órgão alvo, podendo promover desorganização dos microfilamentos de actina que compõe parte do citoesqueleto (RUNNEGAR & FALCONER 1987). Esta desorganização leva a uma densa agregação desses microfilamentos para o centro da célula, que resultam na perda do suporte celular. Com a destruição das células parenquimais e sinusoidais do fígado, ocorrem hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico, causando morte entre poucas horas a poucos dias (CARMICHAEL, 1994).

Microcistinas são moléculas hidrofílicas, apresentando pouca capacidade de ultrapassar as membranas lipídicas. Quando captadas pelas células do fígado tornam-se potentes inibidores de proteínas fosfatases PP1 e 2A. (RUNNEGAR *et al.*, 1995).

A DL50 para as MCYST por injeção intraperitoneal em camundongos situa-se entre 50 e 1.200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo e entre 5.000 e 10.900 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo por administração oral (CHORUS & BARTRAM, 1999).

Em 1997 a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou um valor de referência provisório para microcistina – LR em água de abastecimento de 1,0 $\mu\text{g/L}$, baseado em uma ingestão diária máxima tolerada de 0,04 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal (OMS, 2004). Tal orientação é provisória devido às limitações no banco de dados, particularmente no que diz respeito aos

estudos sobre a exposição a longo prazo e da carcinogenicidade. Em um documento de apoio às orientações da OMS para água de abastecimento, Chorus & Bartram (1999) e Falconer *et al.* (1999) recomendam o uso de tal concentração como equivalente para outras variantes.

3.4.1 Efeito de MCYST sobre organismos aquáticos

A proliferação de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas em ecossistemas aquáticos tem a capacidade de comprometer a qualidade da água, com isso aumentando o risco de toxicidade para componentes da biota e para o homem. Dentre tais toxinas, as mais estudadas foram as MCYST (MAGALHÃES *et al.*, 2001).

Métodos com maior poder de detecção de MCYST como o teste imunológico ELISA tornaram possíveis a análise de pequenas concentrações, possibilitando com isso a análise de pequena biomassa de animais. Utilizando ELISA, Thorstrup & Christoffersen (1999) conseguiram detectar MCYST em *Daphnia* expostas às células tóxicas de *M. aeruginosa*.

Ferrão-Filho *et al.* (2002) encontraram valores de MCYST variando de 0,3 a 3,9 µg /g de peso seco (PS) no fitoplâncton, de 0,3 a 16,4 µg/g no zooplâncton e de 0 a 5,8 ng/g no séston da Lagoa de Jacarepaguá (RJ), chegando a conclusão de que estes organismos acumularam as toxinas a partir do séston.

O efeito de cepas tóxicas e não-tóxicas de *M. aeruginosa* em *Procambarus clarkii* (Crustacea, Decapoda) foi avaliado por Vasconcelos *et al.*, (2001). Os autores observaram que os animais mais jovens foram mais suscetíveis às cepas não-tóxicas, demonstrando que outras toxinas mais potentes que MCYST podem estar sendo produzidas por esta cianobactéria. Montagnoli *et al.*, (2004) testaram a toxicidade de extratos de uma cepa de *M. aeruginosa* em *Kalliapseudes schubartii* (Crustacea, Tanaidacea) e observaram uma CL₅₀ (48h) de 1.440 mg/L⁻¹ (equivalente a 1,58 mg MCYST L⁻¹, considerando-se o conteúdo de microcistinas do extrato), além de um aumento no consumo de oxigênio.

Maršálek & Bláha (2004) testaram o efeito de extratos brutos e frações de toxinas purificadas a partir de florações de *M. aeruginosa* em diferentes invertebrados aquáticos, incluindo o camarão *A. salina*, o cladóceros *D. magna*, o rotífero *Brachionus calyciflorus*, o crustáceo anostracóide *T. platyurus*, o cnidário *Hydra tenuata* e o oligoqueta *Tubifex tubifex*, encontrando grande variabilidade na sensibilidade destes organismos, sendo *T. platyurus* o mais sensível a ambas as amostras e *B. calyciflorus* apresentou-se mais resistente.

Apesar de geralmente apresentarem maior resistência às cianotoxinas, os moluscos também podem ser afetados por estas. Gérard *et al.*, (2005) demonstraram que, além de

acumular microcistina-LR, o gastrópode pulmonado *Lymnaea stagnalis* apresentou redução na produção de ovos e na locomoção quando expostos a toxina purificada. Em outro estudo, Juhel *et al.*, (2006) demonstraram que o mexilhão *Dreissenia polymorpha* teve uma redução na taxa de ingestão e absorção de alimento, na produção de fezes e pseudo-fezes e no balanço líquido de energia quando expostos as suspensões de células de *M. aeruginosa*, e que este efeito foi mais intenso quando esta cianobactéria foi oferecida em mistura com uma diatomácea (*Asterionella formosa*).

Cianobactérias podem fazer parte da dieta de peixes, dentre os quais os ciclídeos e caprinídeos (SOARES, 2009). Beveridge *et al.*, (1993) demonstraram supressão na taxa de filtração e crescimento de duas espécies de tilápias (*Hipophthalmichthys molitrix* e *Oreochromis niloticus*) quando na presença de cepa tóxica de *M. aeruginosa*.

Elevadas taxas de mortalidade em peixes foram observadas por Tencalla *et al.*, (1994). Os autores constataram que trutas tratadas com altas doses de células liofilizadas de *M. aeruginosa* (doses de 6,6 mg de MCYST.kg⁻¹ de peso vivo) morreram em 96 horas de exposição.

Soares *et al.*, (2004) avaliaram o acúmulo e a depuração de MCYST em *Tilapia rendalli*. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram diferentes perfis de acúmulo no fígado e músculo do animal, correspondentes à concentrações de 0,6 µg MCYST g⁻¹ no fígado de 0,05 µg MCYST g⁻¹ no músculo. Os autores concluíram que *T. rendalli* é capaz de acumular MCYST em seus tecidos.

Alguns estudos já foram realizados até o presente momento com insetos aquáticos. Dentre estes, Kiviranta & Abdel-Hameed (1994), identificaram que as larvas de dípteros como as do mosquito *A. aegypti* apresentaram sensibilidade moderada as cianobactérias. Os autores encontraram valores de CL₅₀ próximos aos valores encontrados para outros organismos aquáticos testados.

Embora o conhecimento sobre efeitos de MCYST em organismos aquáticos seja bem conhecido dada a grande ocorrência destas cianotoxinas nos ecossistemas aquáticos do mundo inteiro, ainda são poucas as informações sobre efeitos destas cianotoxinas em organismos bentônicos, particularmente as larvas de insetos, as quais compõem a maior densidade da comunidade bentônica. Neste sentido, o presente trabalho de dissertação se propôs a avaliar os possíveis efeitos da exposição de larvas do quironomídeo *C. xanthus* à presença de extratos tóxicos e não tóxicos de duas cepas de *M. aeruginosa* isoladas de ecossistemas brasileiros, uma produtora de MCYST e outra não.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições de cultivo de *C. xanthus* em laboratório

O cultivo e a manutenção dos organismos foram realizados no laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal de Itajubá, segundo metodologia proposta por Fonseca & Rocha (2004a).

A água utilizada para a manutenção das culturas foi proveniente de fonte natural (mina) sendo armazenada em galões de 10L por um período máximo de 10 dias em laboratório. Os padrões físico químicos da água de cultivo utilizada correspondiam a padrões de dureza de 35 a 40 mg/L de CaCO₃, pH entre 6,5 e 7,5 e temperatura de 22 ± 2°C.

O alimento oferecido durante o primeiro ínstar de desenvolvimento (fase exclusivamente planctônica) foi composto apenas por algas em suspensão (*Pseudokirchneriella subcapitata*) na proporção de 10⁵ células.mL⁻¹, adicionadas às bandejas de cultivo apenas no primeiro dia.

Para os demais ínstars de desenvolvimento foram adicionadas as bandejas de cultivo uma suspensão de ração floclada para peixes Tetramin® na proporção de 0,04mg/ml, adicionadas diariamente às bandejas que continham entre 100 e 150 organismos.

Como substrato, utilizou-se uma proporção de areia (1cm) coletada em rio, previamente lavada com água de torneira em abundância e água destilada, e posteriormente esterilizada em mufla a uma temperatura média de 550°C. As proporções granulométricas utilizadas na constituição do substrato estão expressas na (TABELA 2).

Tabela 2 - Granulometria do substrato utilizado para cultivo de *C. xanthus*.

Peneira (mm)	Porcentagem de areia utilizada (%)
1,000	1,0
0,500	8,0
0,250	50,0
0,105	40,0
0,053	0,5
Silte/argila	0,5

Fonte: Fonseca (1997).

4.2 Cultivo e manutenção de células das cepas produtoras e não produtoras de CYN e MCYST

Para a realização dos experimentos, duas cepas de *C. raciborskii* e duas cepas de *M. aeruginosa* foram cultivadas no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal de Itajubá, sendo elas:

- CYP 011K – cepa de origem australiana, produtora da toxina CYN, gentilmente cedida pelo professor Dr. Andrew Humpage -“Australian Water Quality Center”;
- NPC51 – cepa não produtora da toxina CYN, isolada do reservatório de Custodia/PE;
- NPLJ 4 – cepa original da lagoa de Jacarepaguá - RJ, produtora da toxina MCYST;
- NPCD – cepa não produtora da toxina MCYST, isolada de lagoas da Cidade de Deus – RJ.

Todas as cepas foram obtidas do banco de culturas de cianobactérias do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – LECT, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho- IBCCF/UFRJ, que possui um convênio de parceria científica com a UNIFEI.

As cepas foram cultivadas em mariotes com capacidade de 10 L durante 15 dias, em meio ASM1 (Gorham *et al.*, 1964) até que atingissem o crescimento exponencial máximo, sob as seguintes condições:

- pH entre 7,5 e 8,0;
- temperatura mantida entre $23 \pm 2^\circ\text{C}$;
- intensidade luminosa de $21,43 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ medida com auxílio de luxímetro (LM 8000 Digital Instruments) após devida conversão de unidades;
- fotoperíodo de 12 horas claro/escuro;
- aeração contínua.

Os inóculos utilizados para obtenção de novas culturas foram equivalentes a 10% do volume de culturas pré existentes para as cepas de *C. raciborskii* e 5% para as cepas de *M. aeruginosa*. A partir daí, o crescimento das culturas foi interrompido e as mesmas mantidas

sob refrigeração por cerca de 3 dias até que toda a biomassa fosse decantada, possibilitando o descarte da solução sobrenadante. Do concentrado obtido foram feitas diluições e a estimativa do volume celular foi realizada sob microscópio óptico em hemocitômetro de Fuchs Rosenthal.

Para a extração de toxinas adotou-se o procedimento de gelo/degelo com repetição mínima de três vezes, até que as células fossem rompidas e as toxinas liberadas para o meio. O extrato então foi novamente congelado para uso posterior durante os ensaios.

4.3 Ensaio de toxicidade aguda - Ínstares II e III

Um total de 30 organismos com idades de 5 e 7 dias de vida (instares II e III, respectivamente) foram coletados das bandejas de cultivo e expostos individualmente a cada tratamento, sendo:

- Tratamento 1: extrato tóxico da cepa de *C. Raciborskii*;
- Tratamento 2: extrato não tóxico da cepa de *C. Raciborskii*;
- Tratamento 3: extrato tóxico da cepa de *M. Aeruginosa*;
- Tratamento 4: extrato não tóxico da cepa de *M. Aeruginosa*
- Tratamento 5: grupo controle (somente água de cultivo).

Os organismos foram expostos individualmente em béqueres de vidro contendo soluções compostas pelo alimento Tetramin, na proporção 0,04 mg.SSV.mL⁻¹ adicionado apenas no primeiro dia de exposição, extratos celulares equivalentes a 10⁶ células.mL⁻¹ (condição de floração) e água de cultivo, perfazendo um volume final de 20 mL⁻¹ em cada recipiente. Foram realizadas um total de seis repetições de cada ensaio, com período de exposição de 96 horas.

Os atributos de avaliação foram mortalidade e crescimento do corpo, avaliado pela medida da largura da cápsula cefálica. Para tanto, no início de cada ensaio dez larvas foram coletados das mesmas bandejas de cultivo dos organismos a serem expostos e preservados em solução álcool 70%. As variáveis físicas e químicas como pH, condutividade elétrica (μScm^{-1}), oxigênio dissolvido (mgL⁻¹) e temperatura (°C) foram mensurados no início e no final de cada ensaio. Das larvas sobreviventes a cada tratamento, dez foram coletadas e preservadas em álcool 70% para medição da cápsula cefálica e as demais congeladas para quantificação de toxinas. Este procedimento foi realizado apenas para os organismos expostos ao extrato contendo as toxinas.

4.4 Ensaio de toxicidade crônica

Os ensaios de toxicidade crônica foram realizados com a exposição de 30 organismos individualizados do ínstar II a cada tratamento, além do controle, por um período de 8 dias (tempo suficiente para que os organismos controle atingissem o IV ínstar, num total de 2 repetições). Diariamente as soluções teste foram renovadas, respeitando-se um período de 24 horas entre as trocas.

Os atributos de avaliação foram mortalidade/sobrevivência e crescimento do corpo, avaliados também pela largura da cápsula cefálica (mm). Para tanto, no início de cada teste, 10 organismos foram coletados das mesmas bandejas de cultivo dos organismos a serem expostos e preservados em solução álcool 70%. Essa mesma quantidade de organismos foi também preservada dentre os sobreviventes ao final da exposição para a mesma finalidade. As larvas expostas as toxinas foram coletadas ao final do período experimental e congeladas para posterior análise de toxinas. Atributos como pH, condutividade elétrica (μScm^{-1}), oxigênio dissolvido (mgL^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) foram mensurados no início e final de cada teste.

4.5 Extração e análise de CYN e MCYST dos organismos e dos extratos celulares

O procedimento de extração e análise de CYN e MCYST dos organismos teste *C. xanthus* expostos aos extratos celulares tóxicos foi realizado no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os organismos a serem analisados foram pesados e em seguida liofilizados (Freezone 6 – Labconco) por um período de quatro horas. Após liofilização, o conjunto de organismos referentes a cada ensaio foi novamente pesado (obtenção do peso seco), macerado e homogeneizado com adição de 1mL^{-1} de água ultra pura (Milli-Q) para ressuspensão da toxina dissolvida para os expostos à CYN e adição de 1ml de metanol para os expostos à MCYST. O material foi então filtrado em filtro de celulose ($0,45\ \mu\text{m}$ de porosidade e 13mm de diâmetro) ou centrifugado (amostras contendo CYN e MCYST, respectivamente) e analisado pelo método ELISA. Para tanto, foram utilizados “kits” específicos para CYN e MCYST (Beacon[®] Kit – Analytical Testes Kits).

O princípio do método do Imunoensaio enzimáticos ELISA baseia-se na identificação de um antígeno (CYN ou MCYST), através de um anticorpo específico em solução.

4.6 Ensaio de sensibilidade à substância de referência Cloreto de Potássio (KCl)

Substâncias de referência são utilizadas para avaliar as condições de saúde/sensibilidade dos organismos-teste, sejam eles oriundos do campo ou cultivados em laboratório. São também utilizados em pesquisas básicas com organismos aquáticos e terrestres para definir condições essenciais de ensaios para cada espécie. Uma vez estabelecidas essas condições ótimas de teste, é possível obter resultados comparáveis, isto é, que apresentem boa repetibilidade e reprodutibilidade (ZAGATTO *et al.*, 2006).

Para tanto, ensaios de sensibilidade foram realizados ao longo de toda a fase experimental de modo a garantir uma periódica avaliação da saúde dos organismos utilizados nos ensaios e a consequente elaboração de uma carta controle. A solução estoque utilizada foi Cloreto de Potássio (KCl) 40,0 g.L⁻¹ em seis diferentes concentrações, além do controle. A faixa das concentrações ficou entre 0,5 g.L⁻¹ e 3,0 g.L⁻¹. Um total de 10 organismos dos instares II e III foram expostos a cada concentração durante um período de 96 horas, totalizando 70 organismos por teste. Ao final da exposição, foram realizadas as contagens dos organismos mortos em cada concentração, e posterior cálculo dos valores de CL50 com o auxílio do programa Spermán – Karber. De posse dos valores das CL50 foi aplicado o modelo desenvolvido pela USEPA (1994) para cálculo dos limites superiores e inferiores referentes á carta controle.

4.7 Análise estatística dos dados

O tratamento dos dados para o atributo largura da cápsula cefálica foi realizado com o auxílio do programa estatístico SPSS 17.0. Inicialmente, uma análise de variância (ANOVA UNIVARIADA) foi aplicada com o intuito de se avaliar a existência de diferença significativa entre os ensaios com ambos os instares (II e III), tendo como variável dependente a largura da cápsula cefálica (mm). A não existência de diferença entre os ensaios permitiu que os mesmos fossem agrupados, utilizando para os cálculos as médias das larguras cápsulas cefálicas. Posteriormente, utilizou-se o teste de Dunnett com o intuito de verificar a existência de diferença significativa entre o grupo controle e os demais tratamentos, e o teste de Bonferoni para comparações múltiplas. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio agudos: Ínstares II e III

5.1.1 Mortalidade

5.1.1.1 Cepas de *C. raciborskii*

A figura 4 apresenta os dados relativos à mortalidade obtida nos ensaios de toxicidade aguda com larvas dos instares II e III após exposição aos extratos das cepas de *C. raciborskii* e na tabela 3 os valores das variáveis físicas e químicas obtidas durante estes ensaios.

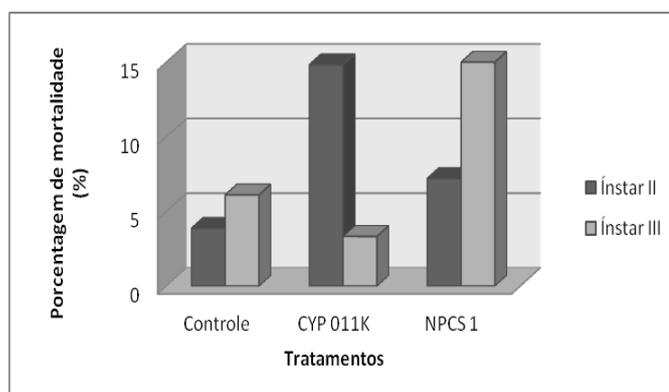


Figura 4 - Porcentagens de mortalidade para os instares II e III após exposição aguda de larvas de *C. xanthus* aos extratos celulares das cepas de *C. raciborskii*.

Tabela 3 - Variáveis físicas e químicas mensuradas no início e término dos ensaios de toxicidade aguda com exposição de larvas de *C. xanthus* dos instares II e III aos extratos das cepas de *C. raciborskii*.

Ínstares	pH		CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		OD (mg L^{-1})		T ($^{\circ}\text{C}$)	
	Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim
CONTROLE								
II	7,2	8,1	140	151	5,9	6,2	23	22
III	7,5	8,1	165	188	5,8	6,5	23	23
CYP-011K								
II	7,4	8,1	129	277	6,1	5,8	23	23
III	7,3	8,3	204	252	5,2	5,2	22	22
NPCS-1								
II	7,2	8,0	165	219	6,2	6,0	22	23
III	7,4	8,2	186	222	5,6	5,1	22	24

A análise quantitativa dos resultados indicou uma maior sensibilidade de larvas do ínstar II em exposição ao extrato tóxico (CYN) correspondendo a uma porcentagem de mortalidade de 14%. Contrariamente, larvas do ínstar III foram mais sensíveis quando expostas ao extrato não tóxico, com 15% de mortalidade, não apresentando efeito quando expostas ao extrato tóxico, porém, não se pode afirmar que houve efetivamente efeito agudo pronunciado em relação à mortalidade para ambos os instares e ambos os extratos, uma vez que os maiores valores de mortalidade não ultrapassaram porcentagens de 15%, valor aceitável como baixo.

Efeitos agudos avaliados pelo atributo mortalidade foram encontrados por Dornfeld (2006) após exposição de larvas de *C. xanthus* ao metal cádmio e por Almeida (2007) após exposição ao inseticida atrazina. Tais contaminantes possuem mecanismos de ação em *C. xanthus* totalmente diferentes da CYN, de efeito já comprovado por vários autores como potente bloqueador da síntese protéica, porém não avaliado no presente trabalho.

Nogueira *et al.* (2004) também avaliaram os efeitos sobre o crescimento de *D. magna* juvenis após exposição aguda a duas cepas de *C. raciborskii* (tóxica e não tóxica). Após 48 horas de exposição os autores observaram taxas de mortalidade da ordem de 93,33% e 10% para as cepas tóxicas e não tóxicas, respectivamente.

Kinnear *et al.*, (2007) também investigaram possíveis efeitos sub-letais em *M. tuberculata* durante exposição ao extrato e células intactas de *C. raciborskii* produtora de CYN. Os autores observaram que ambos os tratamentos não causaram alterações na mortalidade, taxa de crescimento ou comportamento nos indivíduos adultos, e sim na liberação de filhotes pela bolsa incubadora, o que revelou um efeito na reprodução destes organismos.

A semelhança observada nas taxas de mortalidade para ambas as cepas, em especial para os dados obtidos após exposição ao extrato não tóxico também pode indicar a presença e atuação de outros metabólitos que não cianotoxinas na solução de exposição. Tal fato é de grande relevância, uma vez que a mortalidade de larva de *C. xanthus* em condições ambientais normais pode estar relacionada a simples presença de cianobactérias.

Os valores das variáveis físicas e químicas monitoradas durante os ensaios agudos não sofreram alterações entre o início e final dos experimentos. Observa-se apenas que nas soluções com os extratos houve um pequeno aumento nos valores de condutividade, e pH, o que é explicado por conter justamente extratos de cianobactérias, as quais foram cultivados em meio com pH em torno de 8,0 (valor similar ao encontrado nos ambientes com florações).

5.1.1.2 Cepas de *M. aeruginosa*

A figura 5 apresenta os dados de mortalidade dos ensaios de toxicidade aguda após exposição de larvas dos instares II e III aos extratos das cepas de *M. aeruginosa* e ao tratamento controle, e na Tabela 4, os valores das variáveis físicas e químicas monitoradas. Também foi observada a mesma tendência já relatada nos ensaios com os extratos de *C. raciborskii*.

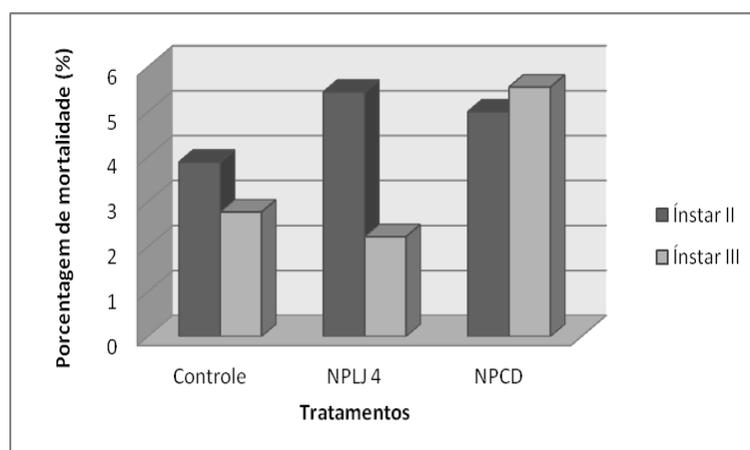


Figura 5 - Porcentagem de organismos mortos dos instares II e III durante exposição aguda (96 horas) aos extratos celulares das cepas de *M. aeruginosa*.

Tabela 4 - Variáveis Físicas e Químicas obtidas no início e fim dos ensaios de toxicidade aguda com exposição de larvas de *C. xanthus* dos instares II e III aos extratos das cepas de *M. aeruginosa*.

CONTROLE								
Ínstares	pH		CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)		OD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		T ($^{\circ}\text{C}$)	
	Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim
II	7,2	8,1	140	151	5,9	6,2	23	22
III	7,5	8,1	165	188	5,8	6,5	23	23
NPLJ4								
II	7,0	8,2	146	187	6,5	6,5	24	23
III	7,4	8,1	151	178	6,4	6,9	24	24
NPCD								
II	7,1	8,1	143	188	6,6	6,6	22	23
III	7,5	8,1	166	184	6,5	6,1	23	22

Como observado, a análise quantitativa dos resultados revelou a não existência de efeito agudo quanto à mortalidade para larvas de *C. xanthus*, uma vez que as maiores porcentagens de mortalidade não corresponderam a valores superiores a 6% para ambos os extratos.

Em estudo já realizados com larvas de insetos Marsalek & Blaha (2004) compararam a diferença de sensibilidade após exposição aguda ao extrato, pigmento e toxina purificada em três diferentes amostras de *M. aeruginosa* nas concentrações de 1,085; 0,48 e 0,03 mg/g de peso seco (PS). Tais concentrações foram denominadas como tóxica (1), intermediária (2) e não tóxica (3), respectivamente, para larvas de *Culex pipiens* e *Drosophila melanogaster*. Para *C. pipiens*, a exposição à concentração não tóxica não resultou em mortalidade, porém, os maiores valores de CL50 foram registrados após exposição a toxina purificada tanto para a concentração tóxica quanto a intermediária (22,3 e 25,9 mg/g PS, respectivamente). Já para *D. melanogaster*, os maiores valores de CL50 foram registrados após exposição ao pigmento para as três amostras analisadas.

No presente trabalho, larvas de *C. xanthus* foram expostas apenas aos extratos celulares, sendo detectado nos organismos concentrações de toxina equivalentes a 0,016 e 0,060 ng/mg respectivamente para os instares II e III. (Tabela 8). Tais valores são menores, comparados aos obtidos pelos autores acima mencionados, o que permite indicar que a concentração de MCYST (equivalente a condição de floração) a que os organismos foram expostos foi insuficiente para provocar um efeito agudo avaliado pelo atributo mortalidade.

Estes mesmos autores mencionam que a mortalidade muitas vezes pode ser resultado da interação entre toxina e outros metabólitos presentes nas amostras. Neste sentido, Kivirata *et al.*, (1993) concluíram que a cepa de *Oscillatoria agardhii* não produtora de MCYST foi altamente tóxica para larvas de *Aedes aegypti*, apresentando valores de CL50 - 24 horas de 8,7 e 6,1 g/celulas/ml para os instares IV e II, respectivamente. Porém, este efeito não foi observado no presente trabalho, o que pode indicar que a cepa não produtora de MCYST (isoladas das lagoas da Cidade de Deus/RJ) não possuem metabólitos secundários diferentes da toxina que provocam efeitos agudos em *C. xanthus*, ou que mesmo se houver, a concentração utilizada não foi suficiente para provocar um efeito agudo.

5.1.2 Largura da cápsula cefálica – Ínstares II e III:

5.1.2.1 Cepas de *C. raciborskii*

As figuras 6 e 7 apresentam os valores médios mais os desvios padrões para o atributo largura das cápsulas cefálicas de larvas de *C. xanthus* dos instares II e III após exposição aguda aos extratos das cepas de *C. raciborskii*.

A análise de variância dos dados referentes às médias das larguras das cápsulas cefálicas dos instares II e III após exposição aos extratos de *C. raciborskii* revelou a existência de não interação entre tipo de tratamento (extrato) e estágio de vida. Foi também verificada a existência de diferença significativa de resposta à exposição entre os instares, bem como entre o tipo de extrato oferecido. Pela aplicação do pós teste de Bonferoni, pôde-se observar que a média das cápsulas cefálicas de larvas expostas ao tratamento controle diferiu significativamente das médias dos dois extratos celulares, que também diferiram entre. Em geral, para os dois instares testados, ao final do período de exposição, o maior estímulo de crescimento ocorreu entre larvas expostas ao tratamento com extrato da cepa NPC51, seguida pelo tratamento com extrato tóxico da cepa CYP011K, e por fim pelo tratamento controle. Com isso, ficou claro que a exposição aos extratos promoveu o crescimento.

Nogueira *et al.* (2004) avaliaram possíveis efeitos quanto ao crescimento e desenvolvimento de *D. magna* após exposição aguda as cepas tóxicas e não tóxicas de *C. raciborskii* e uma alga não tóxica utilizada como alimento (*A. falcatus*), além do grupo controle. Os autores observaram a ocorrência de aumento na taxa de crescimento do corpo de 2,54% para *Daphnias* expostas a cepa tóxica, 38,14% para a não tóxica, 55,54% para as que receberam *A. falcatus* como alimento e de 11,47 para o grupo controle.

Os autores comentam que além do fato de *C. raciborskii* ser considerada como fonte inadequada de alimento devido ao baixo teor nutricional apresentado ou pela inibição de enzimas digestivas (ARNOLD, 1971; PORTER & MCDONOUGH, 1984; HAWKINS & LAMPERT, 1989; JUTTNER & WESSEL, 2003), o efeito da CYN neste caso foi pronunciado, o que também foi observado no presente trabalho.

Os resultados dos ensaios agudos avaliados pelo atributo largura da cápsula cefálica indicaram que independente da presença de CYN, organismos expostos a ambos os extratos tiveram estímulo no crescimento do corpo, com maior expressividade para os expostos ao extrato não tóxico. Isso pode indicar que a ligação dos extratos (maior conteúdo de carbono orgânico), acrescido da ração Tetramin, foi melhor assimilada pelo organismos, promovendo

um maior crescimento. Cabe ressaltar que por intermédio da avaliação desse atributo, pode-se observar melhor o efeito, quando comparado ao parâmetro mortalidade.

O estímulo de crescimento mais acentuado observado após exposição ao extrato não tóxico indica que a presença da toxina CYN não está diretamente relacionada à inibição ou não do crescimento, pois ficou claro que o extrato não tóxico oferecido se mostrou mais eficiente em estimular o crescimento das larvas. Isto mostra que possivelmente existam outros metabólitos no extrato considerados estimulantes.

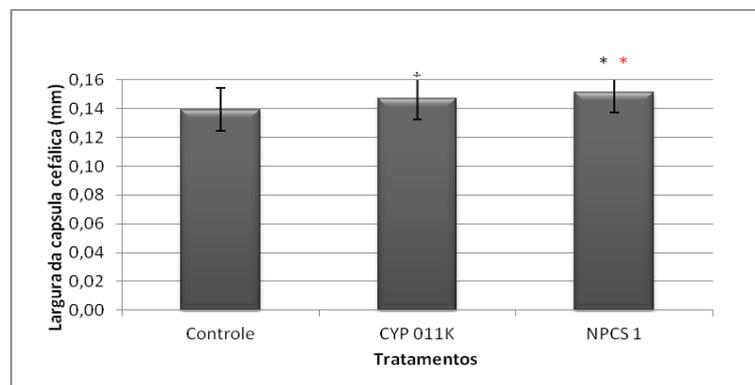


Figura 6 - Valor médio (\pm DP) da largura das cápsulas cefálicas de larvas de *C. xanthus* do ínstar II após exposição aguda aos extratos de *C. raciborskii* (* e ** = diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0,05$).

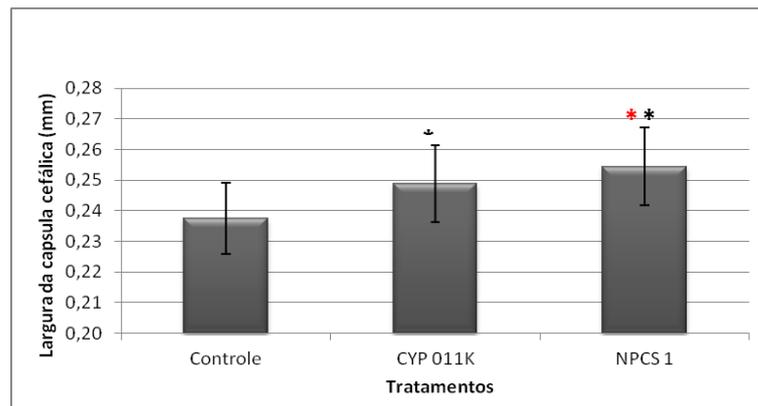


Figura 7 - Valor médio (\pm DP) das cápsulas cefálicas de larvas de *C. xanthus* do ínstar III após exposição aguda aos extratos das cepas de *C. raciborskii*. (* e ** = diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0,05$).

5.1.2.2 Cepas de *M. aeruginosa*

As figuras 8 e 9 apresentam os valores médios mais os desvios padrões para a largura das cápsulas cefálicas de larvas de *C. xanthus* dos instares II e III após exposição aguda aos extratos das cepas e *M. aeruginosa*.

A análise estatística revelou a existência de diferença significativa entre os estágios de vida e tipo de tratamento, ou seja, o efeito de toxicidade gerada pela exposição aos diferentes extratos está diretamente relacionado ao estágio de desenvolvimento dos organismos. Organismos do instar III tiveram efeito mais pronunciado (cresceram menos) em comparação aos do instar II.

O teste de comparação múltipla (Bonferroni) evidenciou a existência de diferença significativa entre o tratamento controle e os tratamentos com as cepas produtoras e não produtoras de MCYST, porém, não havendo diferença entre os dois tratamentos com os extratos.

Contrariamente ao que foi observado após exposição às cepas de *C. raciborskii*, houve efeito de retardo no crescimento dos organismos para ambos os instares, fato este não relacionado à presença de MCYST, uma vez que o mesmo efeito ocorreu em ambos os instares, o que reflete uma preocupação ecológica ao se avaliar o efeito de cianobactérias sobre comunidades bentônicas, uma vez que esta faz parte da cadeia de detritos nos ecossistemas aquáticos.

Para os ensaios agudos, o atributo largura da cápsula cefálica, comparado ao de mortalidade foi mais expressivo, uma vez que os resultados indicaram uma maior acuracidade na avaliação do efeito de extratos de cianobactérias sobre aspectos do ciclo de vida de *C. xanthus*.

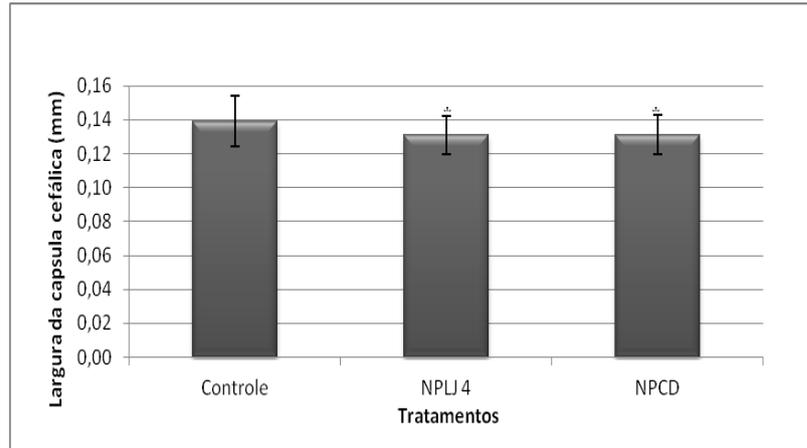


Figura 8 - Valores médios (\pm DP) de largura das cápsulas cefálicas de larvas do ínstar II de *C. xanthus* após exposição aguda aos extratos de *M. aeruginosa* (*diferenças significativas, $p < 0,05$).

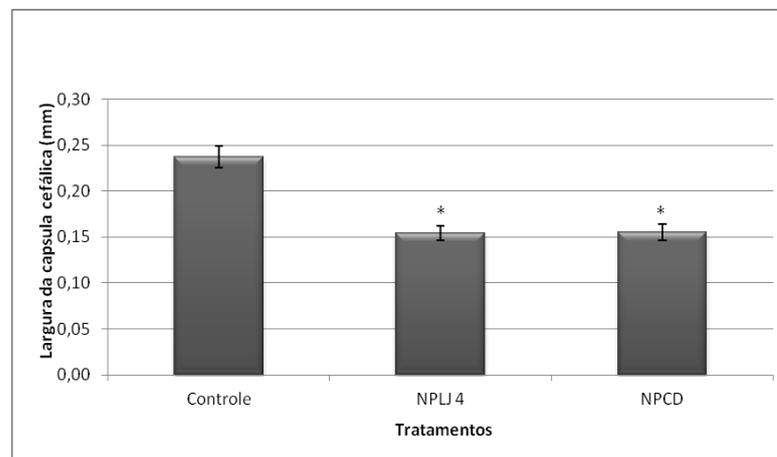


Figura 9 - Valores médios (\pm DP) de largura das cápsulas cefálicas de larvas do ínstar III de *C. xanthus* após exposição aguda aos extratos de *M. aeruginosa* (*diferenças significativas ANOVA, $p < 0,05$).

5.2 Ensaio de toxicidade crônica

5.2.1 Mortalidade

5.2.1.1 Cepas de *C. raciborskii*

O emprego de testes de toxicidade crônica é de fundamental importância, pois tende a mostrar os efeitos subletais dos contaminantes aos organismos, sendo importante na avaliação da dinâmica populacional e também nas extrapolações para os prováveis efeitos à saúde ambiental (DORNFELD, 2002).

Segundo Janssens de Bisthoven *et al.* (1998), os atributos de avaliação como desenvolvimento, sobrevivência e crescimento são frequentemente utilizados para a avaliação da toxicidade em invertebrados bentônicos. Portanto, vários são os trabalhos realizados com quironomídeos que apontam os testes de longa duração e parâmetros de avaliação mais sensíveis que a sobrevivência como ferramenta importante para a avaliação da toxicidade ambiental.

A figura 10 apresenta os dados quantitativos de mortalidade para larvas de *C. xanthus* expostas aos extratos das cepas de *C. raciborskii*. Os maiores valores de mortalidade foram observados dentre as larvas expostas ao extrato contendo CYN, o que não foi observado nos resultados dos ensaios agudos. Tal fato pode indicar a expressão de um possível efeito citotóxico relacionado à presença de CYN, uma vez que o ápice da interrupção da síntese protéica ocasionada por tal toxina ocorre ao final do 7º ou 8º dia de exposição. Entretanto, não se pode afirmar que tenha ocorrido um efeito expressivo de mortalidade, já que ao final do 7º dia de exposição a maior taxa de mortalidade (para larvas expostas ao extrato contendo CYN) não ultrapassou 16%, o que ainda pode-se considerar dentro dos parâmetros de validação dos ensaios de toxicidade (até 10% de mortalidade para os organismos do tratamento controle).

Os valores das variáveis físicas e químicas monitoradas neste ensaio estão na Tabela 5. Observa-se também, como nos ensaios agudos, tendência de pequeno aumento nos valores de condutividade e pH.

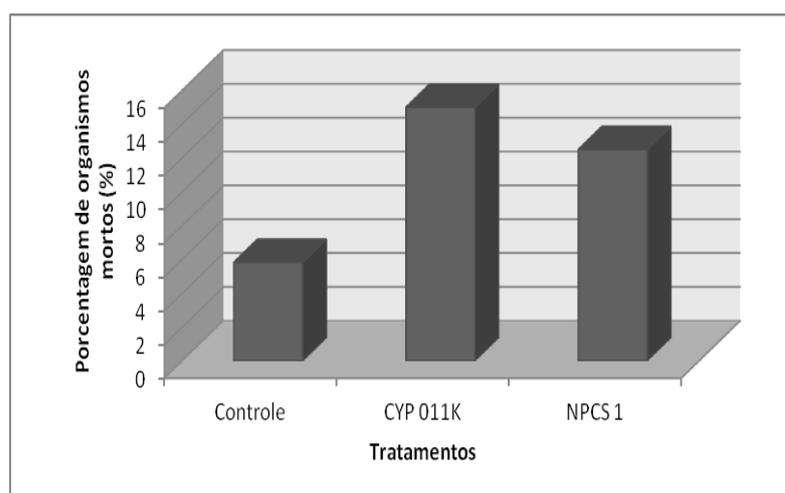


Figura 10 - Porcentagem de organismos mortos ao final do 7º dia de exposição crônica aos extratos celulares de *C. raciborskii*.

Tabela 5 - Variáveis físicas e químicas obtidas no início e término dos ensaios de toxicidade crônica com exposição de larvas de *C. xanthus* aos extratos celulares das cepas de *C. raciborskii*.

CONTROLE							
pH		CE ($\mu\text{s.cm}^{-1}$)		OD (mg L^{-1})		T($^{\circ}\text{C}$)	
Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim
7,20	8,0	107	132	6,0	6,2	23	22
CYP- 011K							
7,30	8,1	127	275	6,2	5,9	22	23
NPCS-1							
7,3	8,0	166	172	6,3	6,0	23	22

5.2.1.2 Cepas de *M. aeruginosa*

A figura 11 apresenta os dados relativos à mortalidade de larvas de *C. xanthus* após exposição aos extratos das cepas de *M. aeruginosa* e na tabela 6 as variáveis monitoradas durante o ensaio que prevalecem as mesmas observações já relatadas para os experimentos com os extratos de *C. raciborskii*.

Foi observada a ocorrência de maior porcentagem de mortalidade para larvas expostas ao extrato não tóxico, o que pode evidenciar efeito da presença de outras substâncias relacionadas à toxicidade que não MCYST, entretanto, de acordo com resultados obtidos através dos ensaios agudos para todos os extratos, não se pode afirmar a existência de efeito pronunciado de mortalidade.

Apesar da capacidade apresentada por cianobactérias e cianotoxinas em exercer efeitos em todos os níveis taxonômicos, especial atenção tem sido dada aos efeitos em invertebrados aquáticos, principalmente aos componentes do zooplâncton (CHRISTOFFERSEN, 1996; WIEGAND & PFLUGACHER, 2005). Os efeitos tóxicos da presença de tais organismos e substâncias dependem da concentração, rota de exposição, tipo de toxina e espécie de zooplâncton afetada. Segundo Ferrão-Filho (2009), efeitos agudos de MCYST sobre a sobrevivência são obtidos com concentrações relativamente elevadas de células vivas, extratos ou toxina purificada, enquanto efeitos crônicos ocorrem em concentrações menores.

Fernandes (2008), em ensaio crônico de acúmulo e depuração de MCYST no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, obteve um valor máximo de mortalidade de apenas 5%

após expor os animais a uma concentração de $7,1 \mu\text{g MCYST} / 10^8$ células, também não evidenciando a existência de efeito crônico.

Os resultados obtidos no presente trabalho, no que se refere à sobrevivência das larvas de *C. xanthus* indicaram, que embora a concentração celular de 10^6 cels/mL⁻¹ não tenha provocado efeitos agudos e crônicos, a exposição prolongada efetuada no ensaio crônico provocou um aumento na mortalidade para ambas as cepas.

Vale ressaltar que a concentração de MCYST livre contida na solução teste foi de 39 ngMCYST.mL⁻¹ (Tabela 8) obtida no extrato celular não provocou efeitos agudos e crônicos para larvas de *C. xanthus*, o que implica em dizer que estes efeitos só poderão ser observados em concentrações mais elevadas de extrato celular, com a toxina purificada ou mesmo com células integras.

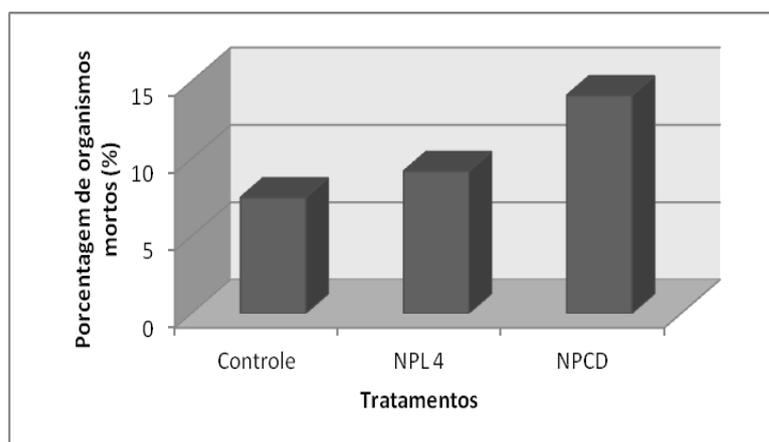


Figura 11 - Porcentagem de mortalidade após exposição crônica de larvas de *C. xanthus* aos extratos celulares das cepas de *M. aeruginosa*.

Tabela 6 - Variáveis físicas e químicas medidas no início e fim dos ensaios de toxicidade crônica com larvas de *C. xanthus* em exposição aos extratos celulares das cepas de *M. aeruginosa*.

CONTROLE							
pH		CE ($\mu\text{s.cm}^{-1}$)		OD (mg.L^{-1})		T ($^{\circ}\text{C}$)	
Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim
7,2	8,1	142	155	6,0	5,8	23	22
NPLJ-4							
7,0	8,2	144	155	6,2	6,1	23	24
NPCD-1							
7,1	8,1	145	151	6,4	6,0	22	23

5.2.2 Largura da Cápsula cefálica

5.2.2.1. Cepas de *C. raciborskii*

A figura 12 apresenta os dados referentes às médias das cápsulas cefálicas das larvas de *C. xanthus* medidas após exposição crônica aos tratamentos controle e extratos celulares das cepas de *C. raciborskii*.

A análise de variância revelou a existência de diferença significativa entre a média das cápsulas cefálicas de organismos expostos ao tratamento controle e entre os demais tratamentos. Já o teste de comparação múltipla possibilitou a identificação de tais diferenças, onde, larvas expostas ao extrato não tóxico apresentaram maior crescimento em relação expostas ao extrato tóxico, o que corrobora com resultados obtidos após exposição aguda às mesmas cepas. Novamente, a hipótese anteriormente levantada sobre a presença de outras substâncias no extrato se apóia a tais resultados, uma vez que a exposição ao extrato da cepa NPC5 foi mais efetivo em estimular o crescimento das larvas.

Os resultados acima expostos indicaram também que extratos de cianobactérias acrescidos de alimento promoveram estímulo no crescimento das larvas, independente da presença da CYN. Isso pode indicar que florações de *C. raciborskii* (10^6 cels.mL⁻¹), embora já comprovada como alimento de baixo conteúdo nutricional comparado as clorófitas, quando presentes no ambiente e ao morrerem e se depositarem nos sedimentos poderão estimular o crescimento da biomassa de *C. xanthus*.

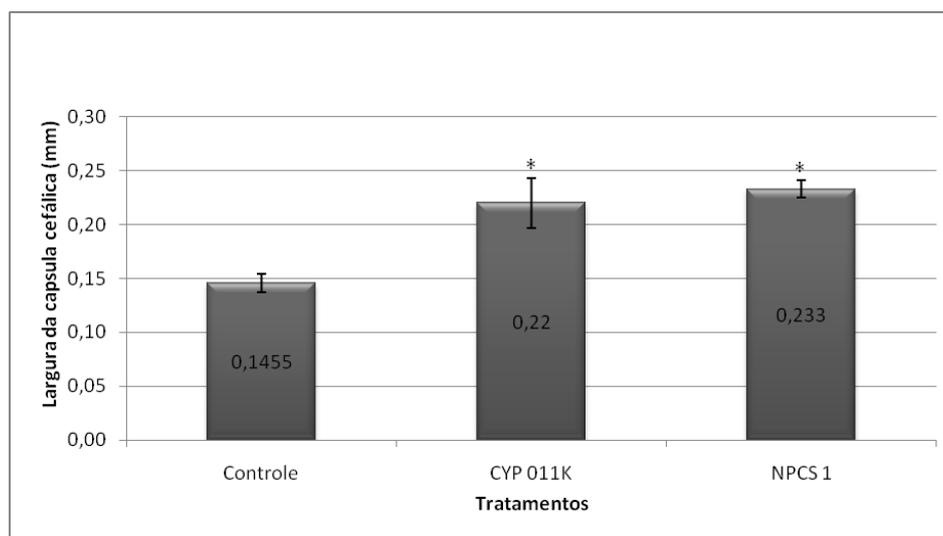


Figura 12 - Média e desvio padrão das cápsulas cefálicas de larvas de *C. xanthus* após exposição crônica aos extratos de *C. raciborskii* (* diferença significativa $p < 0,05$).

5.2.2.2 Cepas de *M. aeruginosa*

A figura 13 apresenta os dados referentes às médias das larguras das cápsulas cefálicas de larvas de *C. xanthus* após exposição aos extratos de *M. aeruginosa*.

A análise de variância indicou a existência de diferença significativa entre as médias das cápsulas expostas aos três diferentes tratamentos. Pelo teste de Bonferoni pode-se constatar que a media das cápsulas do grupo controle diferiu significativamente da média das cápsulas das larvas expostas aos dois extratos celulares, porém, não existindo diferença estatística significativa entre os tratamentos com ambos os extratos.

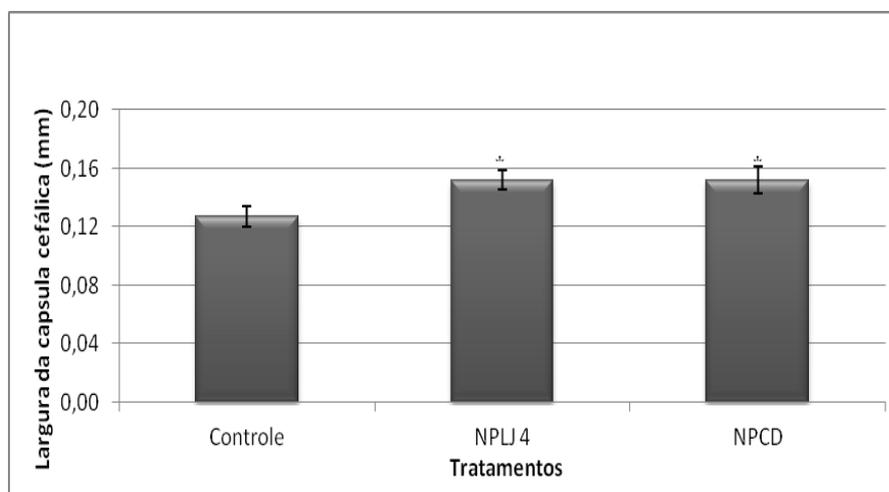


Figura 13 - Valores referentes às médias (\pm DP) das larguras das cápsulas cefálicas de larvas de *C. xanthus* após exposição crônica aos extratos de *M. aeruginosa* (* diferença significativa $p < 0,05$).

Existe grande disponibilidade de dados relacionados a ensaios utilizando quironomídeos e agentes estressores ambientais, entretanto, devido ao ineditismo do presente trabalho, que se propôs a avaliar o efeito de extratos de cepas de *M. aeruginosa* sob determinados aspectos do ciclo de vida de *C. xanthus*, poucos são os resultados que puderam ser comparados com dados já existentes na literatura relacionada.

Os ensaios crônicos realizados com exposição de larvas de *C. xanthus* aos extratos celulares de cianobactérias revelaram que um período maior de exposição permitiu que o efeito observado nos ensaios agudos fosse minimizado, uma vez que houve crescimento dos organismos, independente da presença ou não de toxinas. Portanto, ao se expor larvas de *C. xanthus* em estágios iniciais de desenvolvimento e com renovação diária da quantidade de alimento (ração Tetramin agregada aos extratos celulares de *M. aeruginosa*), não foram

observados efeitos que comprometessem a manutenção dos organismos no ambiente, após morte celular das cianobactérias.

Cabe ressaltar que possivelmente o processo de detoxicação tenha ocorrido somente após o quarto dia de exposição, ou mesmo que tenha ocorrido uma adaptação a concentração exposta, o que posteriormente deverá ser objeto de investigação.

O efeito da detoxicação pode estar relacionado à atividade de enzimas como a GST (glutatinona S – transferase) ou GP-X (glutaciona peroxidase), efeito este já demonstrado em estudos com peixes como o realizado por Wiegand *et al.* (1999) onde os autores constataram a existência de absorção de MCYST nos estágios larvais de *Danio rerio* e a capacidade de metabolização da toxinas à substâncias menos danosas. Larvas de *C. xanthus* também podem apresentar a capacidade de metabolização acima discutida, o que possibilitou maior resistência das larvas em estágios iniciais de desenvolvimento aos extratos.

5.3 Absorção de CYN e MCYST após exposição aguda e crônica

5.3.1 Absorção de CYN nos organismos após exposição aguda (instares II e III)

A Tabela 7 apresenta os valores da concentração de CYN oferecida, de peso seco (mg), as concentrações nos tecidos dos organismos (ngCYN/mg), e a porcentagem de absorção apresentada pelas larvas nos diferentes estágios de vida (instares II e III).

Cabe ressaltar que os dados apresentados são apenas estimativas preliminares, necessitando de uma confirmação mais segura, uma vez que não foi possível quantificar em um número maior de organismos. Mediante tal impossibilidade, uma análise mais acurada dos dados ficou comprometida. Novos experimentos deverão ser realizados numa futura investigação científica.

Tabela 7 - Concentração de CYN (ng.mL⁻¹) oferecida às larvas durante exposição aguda; valor de peso seco (mg); concentração de CYN nas larvas após ensaios (ng/mg) e porcentagem (%) de acúmulo de toxina.

	Concentração de CYN no início dos ensaios (ng.mL ⁻¹)	Peso de organismos secos (mg)	Concentração de CYN nos organismos (ng/mg)	% média de CYN acumulada
Ínstar II	5,56	0,35	2,00	35,97
Ínstar III	5,56	0,47	1,65	29,67

Pode-se observar que houve tendência da porcentagem de acúmulo de CYN ser inversamente proporcional ao peso seco das larvas secas, uma vez que larvas maiores (ínstar III) acumularam menos toxina do que larvas menores (ínstar II). Entretanto, como já mencionado, estes dados necessitam ser confirmados, além do que, existem poucas informações disponíveis sobre o acúmulo de CYN em animais aquáticos, especialmente em invertebrados.

Dentre estes trabalhos, Nogueira *et al.* (2004), em estudo com *D. Magna* oferecendo células intactas de uma cepa de *C. raciborskii* produtora de CYN, encontraram uma concentração de CYN após exposição aguda de 24 horas de 0.025 ng animal⁻¹ e de 0,020 ng animal⁻¹, após 48 h de exposição, respectivamente. Os autores comentam que tais animais podem ter tido uma maior capacidade de filtrar as células das cianobactérias, uma vez que a taxas de filtração e ingestão são dependentes do comprimento do corpo de cladóceros (HANEY, 1985; LAMPERT, 1987) e neste caso, *D.magna* é considerada um organismo grande (5 – 6mm), comparado a outros Cladocera. A relativa baixa concentração de CYN detectada no tecido *D. magna* neste estudo poderia ser atribuídas à intoxicação progressiva dos animais, causando a uma diminuição na taxa de alimentação (LAMPERT, 1981).

Estudos com invertebrados bentônicos também revelaram a capacidade de acumulação de CYN. Shaker *et al.*, (2004) expuseram o mexilhão de água doce *Anodonta cygnea* durante 16 dias à cultura de *C. raciborskii* produtora de CYN em uma concentração entre 14 e 90 µg.L⁻¹ durante a fase de acumulação, obtendo uma concentração de até 2,52 µg/g PS . Entretanto, houve diferença entre acúmulo de toxina, onde hemolinfa acumulou 68,1%,

vísceras 23,3%, pé e gônadas 7,7% e manto 0,9%. Após um período de depuração de duas semanas, cerca de 50% de toxina ainda permanecia nos tecidos do animal em questão.

Outros macroinvertebrados bentônicos também apresentaram capacidade de bioacumulação de CYN. Em estudos com decapodas e bilvavos Saker & Eaglesham (1999) demonstraram a acumulação de CYN em *Cherax quadricarinatus* (Decapoda) provenientes de açude de aquicultura. Em condições de laboratório os autores verificaram maior acúmulo de CYN no hepatopâncreas do animal. White *et al.* (2005), em estudo com *Melanoides tuberculata*, avaliaram o potencial em bioconcentrar e bioacumular CYN nos tecidos dos organismos expostos ao extrato e à células intactas de *C. raciborskii*.

Mais estudos relacionados ao acúmulo e à bioconcentração de CYN em macro invertebrados bentônicos são necessários para que se possam entender exatamente quais os verdadeiros danos que a exposição à toxina possa vir a causar a tal nível da biota aquática.

Cabe ressaltar que estas investigações necessitam ser realizadas com extratos celulares de cianobactérias ou com a toxina purificada, uma vez que a presença de células intactas no compartimento sedimento é praticamente improvável.

5.3.2 Absorção de MCYST pelos organismos após exposição aguda (instares II e III) e crônica

A tabela 8 apresenta os dados relacionados à concentração de MCYST oferecida às larvas durante os ensaios agudos, bem como as médias de peso seco das mesmas, as concentrações de MCYST absorvidas e a porcentagem média de acúmulo. Os resultados revelaram que a incorporação da toxina livre foi proporcional a massa dos organismos para ambos os estágios de desenvolvimento durante o tempo de exposição aguda, ou seja, maior massa, maior quantidade de toxina assimilada.

Os organismos foram expostos a uma concentração inicial de MCYST na solução teste de $39,0 \text{ ng.mL}^{-1}$ (início) e final de $34,8 \text{ ng.mL}^{-1}$, havendo, portanto, apenas 10,76% de degradação de toxina. Observou-se que os valores médios de assimilação ficaram entre 0,04% e 0,15% para os instares II e III respectivamente.

Tabela 8 - Concentração de MCYST oferecida às larvas de *C. xanthus* dos instares II e III durante exposição aguda e porcentagem média de toxina absorvida pelos organismos.

	Concentração de MCYST no início dos ensaios (ng.mL⁻¹)	Peso médio de organismos secos (mg)	Concentração média (±DP) de MCYST nos organismos (ng/mg)	% média de MCYST absorvida
Instar II	39	0,05 (± 0,03)	0,016 (±0,011)	0,04
Instar III	39	0,21 (±0,18)	0,060 (±0,02)	0,15

No que concerne aos ensaios crônicos, como o tempo de exposição foi maior (7 dias) e também com renovação diária das soluções, maior foi a porcentagem de toxina assimilada (0,23%) ao final do sétimo dia de exposição quando comparado a uma única dose na exposição aguda (Tabela 9). Porém, ambos os resultados indicaram a baixa capacidade de absorção destes organismos. Estes resultados serão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Concentração de MCYST oferecida aos organismos durante ensaio crônico e porcentagem média de toxina absorvida.

Concentração de MCYST no início dos ensaios (ng/mL⁻¹)	Peso médio (±DP) de organismo (mg)	Concentração média (±DP) de MCYST nos organismos (ng/mg)	% média de MCYST absorvida
39	0,09 (±0,007)	0,093 (±0,0007)	0,23

A comunidade zooplanctônica é uma das mais importantes ligações entre os produtores primários e os consumidores, como peixes. Assim, o zooplankton pode ser um importante vetor de cianotoxinas ao longo da cadeia alimentar (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2002). Entretanto, existe uma ampla necessidade de estudos que avaliem o efeito da acumulação de toxinas em organismos bentônicos, também importantes elos da cadeia alimentar de ecossistemas aquáticos.

Os processos de absorção e bioacumulação de MCYST já foram demonstrados em vários trabalhos (WATANABE *et al.*, 1992); LAURÉN MÄÄTÄ *et al.*, 1995; KOTAK *et al.*, 1996; THOSTRUP & CHRISTOFFERSEN, 1999; MAGALHÃES *et al.*, 2001; FERRÃO-FILHO *et al.*, 2002; IBELINGS *et al.*, 2005; SILVA, 2008).

Thorstrup & Christoffersen (1999) pela utilização do método ELISA detectaram de 0,7 a 24,5 μg de MCYST.g⁻¹ PS (peso seco) de *Daphnias* submetidas às células tóxicas de *M. aeruginosa*. Os autores ainda salientaram que se a quantidade de toxina fosse originária somente do conteúdo de células contidas no tubo digestivo dos animais (calculada em 0,002 ng.MCYST *Daphnia*⁻¹), a quantidade de toxina realmente medida (0,19 ng.MCYST *Daphnia*⁻¹) foi cerca de 100 vezes maior, indicando que esta toxina foi assimilada e acumulada em outras partes do animal.

No presente trabalho, os valores encontrados para a absorção de MCYST por larvas de *C. xanthus* variaram entre 0,016, 0,060 e 0,23 ng de MCYST/g PS para larvas dos instares II e III (ensaio agudo) e crônico, respectivamente, uma vez que o modo de exposição (células intactas, extratos, toxina purificada) é um dos principais fatores que influenciam nos resultados. Quando expostos à células intactas, mesmo em baixas concentrações, os efeitos são mais evidentes do que quando os animais são expostos a extratos ou toxinas purificadas (FERRÃO-FILHO, 2009).

Fernandes (2008), avaliou o acúmulo e a depuração de MCYST no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*. A autora concluiu que os mexilhões mostraram um nível máximo detectável de MCYST de 0,38 $\mu\text{g/g}$ peso seco durante o período de acumulação e de 0,37 $\mu\text{g/g}$ de PS durante o período de depuração, o que indica potencial de acumulação de toxina.

Em estudo com uma teia alimentar simples, Laurén-Määtä *et al.* (1995) demonstraram que *Chaoborus* apresentou alta mortalidade quando alimentado com *Daphnia*, alimentada por sua vez com *Microcystis* tóxica, sugerindo que *Daphnia* pode ter transferido a toxina para as larvas de *Chaoborus*. Entretanto, estes autores não detectaram microcistinas (por HPLC) nas larvas de mosquito, sugerindo que estas toxinas podem ter sido metabolizadas ou excretadas por estes organismos ou mesmo não detectadas pelo método de análise escolhido.

De acordo com resultados obtidos com larvas de *C. xanthus*, as mesmas também pareceram ser pouco suscetíveis a acumularem MCYST em seus tecidos, quando expostas a concentração de toxina contida em 10⁶ cels/ml, que foi a abordagem do presente trabalho. Exposições às concentrações maiores, bem como outros métodos de avaliação, como, por exemplo, ensaios de genotoxicidade, e com biomarcadores bioquímicos poderão ser objeto de novas investigações.

Em concordância com resultados obtidos através da avaliação final das médias de crescimento das larvas (medição das cápsulas cefálicas), estão as médias de peso seco mensurados após exposição às cepas de *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Pode-se observar que houve grande diferença de peso entre as que foram expostas aos extratos de *C. raciborskii*

com crescimento mais pronunciado e entre as expostas aos extratos de *M. aeruginosa* que apresentaram retardo no crescimento e conseqüente menor média de peso seco.

A avaliação de tal atributo deixa mais clara a ação dos extratos celulares a que foram expostas as larvas. Dentre estas, as de efeito mais pronunciado foram as de *M. aeruginosa*, mais eficientes em inibir o crescimento das larvas. Entretanto, pode-se observar também um aumento da média de peso seco para larvas após exposição crônica, o que pode estar relacionado aos processos de detoxicação.

5.4 Ensaio de sensibilidade à substância referência KCl

Assim como em outros processos analíticos, as substâncias de referência são utilizadas para estabelecer a faixa de aceitação de resultados da sensibilidade dos organismos para uso em testes. A USEPA (1992) recomenda a realização mensal de testes de toxicidade para a avaliação da sensibilidade de organismos (ZAGATTO *et al.*, 2006)

A elaboração da carta controle (figura 14) com a substância de referência KCl para larvas de *C. xanthus*, foi elaborada com os valores médios de CL50, obtidos com 7 ensaios de sensibilidade. Observa-se que durante os experimentos, todos os ensaios encontraram-se dentro da faixa de sensibilidade adotada pelo modelo da USEPA (1994) permitindo com isso a utilização dos organismos durante todos os ensaios de toxicidade para ambas as cianotoxinas.

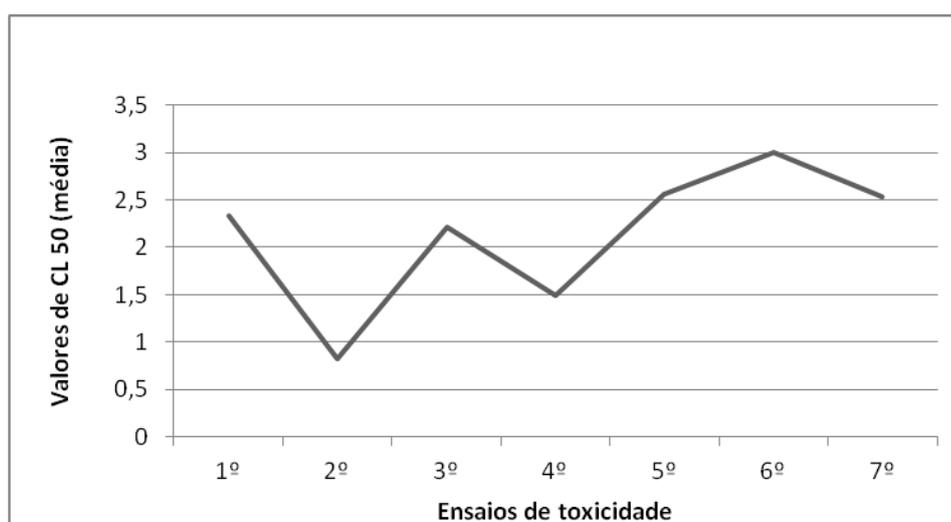


Figura 14 - Carta controle para *C. xanthus* com a substância de referência KCl g.L⁻¹.

6 CONCLUSÕES

- A concentração das cianotoxinas microcistina e cilindrospermopsina contida em 10^6 células mL^{-1} não provocaram efeitos agudos e crônicos em larvas de *C. xanthus*, independente do instar quando avaliados pelo atributo mortalidade;
- Existe diferença de sensibilidade entre os estágios larvais de *C. xanthus*, apenas para organismos expostos aos extratos celulares de *M. aeruginosa*, independente da presença de microcistinas, para curtos períodos de exposição;
- Exposição crônica, avaliada pela largura da cápsula cefálica, provocou um estímulo no crescimento das larvas de *C. xanthus* para ambos os extratos celulares de *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*;
- Organismos de maior massa absorveram mais microcistinas durante a exposição aguda e este processo também foi evidenciado durante a exposição crônica.

7 RECOMENDAÇÕES

Os efeitos deletérios da presença de cianobactérias e cianotoxinas em ambientes aquáticos à componentes da biota requer cada vez mais investigação da comunidade científica. Especial atenção deve ser dada aos organismos bentônicos, devido a sua grande representatividade e relevante importância ecológica. Os resultados obtidos na presente dissertação de mestrado que se propôs a avaliar efeitos da exposição de larvas do inseto nativo *C. xanthus* aos extratos celulares de cepas tóxicas e não tóxicas de *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* levantaram alguma questões de grande relevância que devem ser investigadas, como:

- Se a concentração de cianotoxinas acumulada nos organismos provoca danos celulares ou fisiológicos. Tal investigação poderá ser avaliada por outras abordagens, como por exemplo, ensaios de genotoxicidade e com biomarcadores bioquímicos;
- A realização de ensaios agudos e crônicos com concentrações de cianotoxinas mais altas da utilizada no presente trabalho com extratos celulares e com toxina purificada, com intuito de se conhecer as reais concentrações que provocam tais efeitos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13343. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade Crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp.* Rio de Janeiro, RJ. 15p, 2005.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, RJ.. 23p, 2009.
- 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.** Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.,181 p. 2007.
- APELDOORN, M.E., EGMOND, H.P., SPEIJERS, G. J. A., BAKKER, G. J. I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research.** v.51, p. 7-60, 2007.
- ARNOLD, D.E. Ingestion, assimilation, survival and reproduction by *Daphnia pulex* fed seven species of blue-green algae. *Limnology Oceanography.* 16,906 - 920. 1971.
- 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., CARMELY, S., HADAS, O., TELTSCH, B., PORAT, R., SUKENIK, A. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Phycology**, v.33, n.4, p. 613-616, 1997.
- BEVERIDGE, M.C.M., BAIRD, D.J., RAHMATULLAH, S.M., LAWTON, L.A., BEATTIE, K.A., CODD, G.A. Grazing rates on toxic and nontoxic strains of cyanobacteria by *Hypophthalmichthys molitrix* and *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, v.43, p. 901-907, 1993.
- BISHOP, C.T., ANET, E.F.L.J., GORHAM, P.R. Isolation and identificaton of the past-death factor in *Microcystis aeroginosa* NRC⁻¹. **Canadian Journal of Biochemical and Physiology**, v.37, p. 453-471, 1995.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., KUJBIDA, P., CARDOZO, K.H.M., CARVALHO, V.M., MOURA, A.N., COLEPICOLO, P., PINTO E. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek *et al.* **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.326, p. 687-694, 2005.
- CALIJURI, M.C., ALVES, M. S. A., SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais.** São Carlos: RiMa., 118 p, 2006
- CARMICHAEL, W.W. The toxins of Cyanobacteria. **Scientific American**, 270 (1): 64-72. 1994.

CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M.F.O., AN, J., MOLICA, R.J.R., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RINEHART, K.L., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v.109, p.663-668, 2001.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL Relatório de qualidade das águas interiores de São Paulo. Relatório da Diretoria de Controle da Poluição do Interior, CETESB, São Paulo, 213 p. 2010.

CHISWELL, R. K., SHAW, G. R., EAGLESHAM, G., SMITH, M. J., NORRIS, R. L., SEAWRIGHT, A. A., MOORE, M. R. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. **Environmental Toxicology**, v.14, n.1, p.155-161. 1999.

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

CHRISTOFFERSEN, K. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. **Phycologia**, v.35, p.42-50, 1996.

DOMINGOS, P., RUBIM, K.T., MOLICA, R.J.R., AZEVEDO, S.M.F.O., CARMICHAEL, W.W. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. **Environmental Toxicology**, v.14, p.31-35, 1999.

DORNFELD, C.B. **Utilização de análises limnológicas e bioensaios toxicológicos em macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana/SP)**. 2002. Dissertação (Mestrado). São Carlos,. 196p,2002.

DORNFELD, C.B. **Utilização de *Chironomus sp.* (Díptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais**. Tese (doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 211 p. 2006.

FALCONER, I. R., HARDY, S. J., HUMPAGE, A.R., FROSCIO, S.M., TOZER, G.J., HAWKINS, P.R., Hepatotoxicity and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male swiss albino mice. **Environmental Toxicology**, v.14, n.1, p.143-150. 1999.

FERNANDES, S. S. **Biodisponibilidade de Cianotoxinas em Bivalves**. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Universidade do Porto. 43 p, 2008.

FERNANDES V.O., CAVALCANTI B., BASSANI L.O., SOUZA B.D.; Fatores Promotores e Consequências das Florações. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p.6, 2009.

FERRÃO-FILHO, A.S., DOMINGOS P., AZEVEDO, S.M.F.O. Influences of a *Microcystis aeruginosa* Kützing bloom on zooplankton populations in Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). **Limnologia**, v.32, p. 295-308, 2002.

FERRÃO FILHO, A.S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, 2009.

FERRÃO-FILHO, A.S., MOLICA., R., AZEVEDO, S.M F O . Ecologia, ecofisiologia e toxicologia de cianobactérias. **Oecologia Brasiliensis** , v. 13, p. 225-228, 2009.

FERRÃO-FILHO, A.S. ; SOARES, M..C. S., M., V. F. ; AZEVEDO, S.M.F.O. . A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Pollution** , v. 158, p. 2084-2093, 2010.

FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água do Rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados**. Tese (doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos,p 221,1997.

FONSECA, A. L., ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rampel, 1993 (Diptera, Chironomidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, n. 16, v.2, p. 153-161. (2004a).

FONSECA, A. L., ROCHA, O. The life cycle of *Ceriodaphnia silvestrii*, Daday, 1902,a neotropical endemic species (Crustacea,Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.16, p:319-328; 2004b.

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.

GERARD, C., BRIENT, L., ROUZIC, B.L. Variation in the response of juvenile and adult gastropods (*Lymnaea stagnalis*) to Cyanobacterial Toxin (Microcystin-LR). **Environmental Toxicology**, v.20, p. 592–596, 2005.

GOLDSTEIN, E.G., ZAGATTO, P.A. Toxicidade em águas do estado de São Paulo. **Revista Ambiente**, v. 5, n. 1, p. 13-20, 1991.

GOMES, A.A., PIMENTEL A.C., AZEVEDO S.M.F.O. Efeito de diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido e bactérias na degradação de microcistinas (cianotoxina). **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, 2009.

GORHAN, P., MACLACHLAV, J R., HAMMER, V.T., KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb.**Verhandlungen der Internationalen Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie**,15, 796-804.1964.

HANEY,J.F.Field studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, vol. 21: 467-475.1987

HAANDE, S., ROHRLACK, T., BALLOT, A., ROBERG, K., SKULBERG, R., BECK, M.,WIEDNER, C. ; Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. **Harmful Algae**, 7, 692-701. 2008.

HARADA, K.I., OHTANI, I., IWAMOTO, K., SUZUYUKI, 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.

HAWKINS, P.R., LAMPERT, W. The effect of *Daphnia* body size on filtering rate inhibition in the presence of a filamentous cyanobacterium. **Limnology Oceanography**, v.34, p.1084 – 1089, 1989.

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

HUMPAGE, A. International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB). Chapter 16: Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. 34p. US Environmental Protection Agency. 2008.

IBELINGS, B.W.; BRUNING, K.; JONGE, J.; WOLSTEIN, K.; DIONISIO, L.M.; POSTMA J.; BURGER, T. Distribution of microcystins in a lake food web: no evidence for biomagnification. **Microbial Ecology**, v.49, p. 487-500, 2005.

JANSSENS DE BISTHOVEN, L. NUYTS, P.; GOODDERIS, B.; OLIVER, F. Sublethal parameters in morphologically deformed *Chironomus* larvae: clues to understanding their bioindicator value. **Freshwater Biology**, v.39, p.179-191, 1998.

JONES, G.J.; ORR, P.T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. **Water Research** 28: 871-876, 1994.

JUHEL, G.; DAVEMPORT, J.; O'HLLORAN, J.; CULLOTI, S.C.; O'RIORDAN, R.M.; JAMES, K.F.; FUREY, A.; ALLIS, O. Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*: A bioenergetics approach. **Aquatic Toxicology**, v.79, p. 391-400, 2006.

JUTTNER, F., WESSEL, H.P., Isolation of di(hydroxymethyl) dihydroxypyrrolidine from the cyanobacterial genus *cylindrospermum* that effectively inhibits digestive glucosidases of aquatic insects and crustacean grazers. **Journal of Phycology**.v.39, (1), p.26-32. 2003

KINNEAR, S.H.W., FABBRO, L.D., DUIVENVOORDEN, L.J., HIBBERD, E.M.A. Multiple organ toxicity resulting from cylindrospermopsin exposure in tadpoles of the cane toad (*Bufo marinus*). **Environmental Toxicology**. 22, 550-558. 2007.

KIVIRANTA, J.; ANDEL-HAMEED, A. Toxicity of the blue-green alga *Oscillatoria agardhii* to the mosquito *Aedes aegypti* and the shrimp *Artemia salina*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.10, p. 517-520, 1994.

KOTAK, B.G., ZURAWELL, R.W.; PREPAS, E.E.; HOLMES, C. F. B. Microcystin-LR concentrations in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v.53, p. 1974–1985, 1996.

KUHLMANN, M.L.; HAYASHIDA, C.Y. ; ARAUJO R.P.A. Using *Chironomus* (Chironomidae: Diptera) mentum deformities in environmental assessment, **Acta Limnologica Brasiliensis**, v.12, p.55-61, 2006.

LAMPERT, W. Inhibitory and toxic effects of blue green algae on *Daphnia*. **International Review of Hydrobiology**. v. 66, p. 285–298. 1981.

LAMPERT, W. Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. **N.Zealand.J.Mar.and Fresh. Res.** 21:483-490.1987.

LAURÉN-MÄÄTTÄ, C.; HIETALA, J.; REINIKAINEN, M. ; WALLS, M. D. *Microcystis aeruginosa* toxins accumulate in the food web: a laboratory study. **Hydrobiologia**, v.304, p. 23-27, 1995.

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.

MAGALHÃES, V.F.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. **Toxicol**, v.39, p.1077- 1085, 2001.

MARSALEK, B. ; BLAHA, L. Comparison of 17 biotests for detection of cyanobacterial toxicity. **Environmental Toxicology**, v.19, p. 310-317, 2004.

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. **Toxicol**, v.40, p. 1115-1120, 2002.

MOLICA, R. , AZEVEDO S.M.F.O.; *Ecofisiologia de Cianobacterias Produtoras de Cianotoxinas*. **Oecologia Brasiliensis**, v.13, n.2, p 230, 2008.

MONTAGNOLLI, W.; ZAMBONI, A.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.J. ; YUNES, J.S. Acute Effects of *Microcystis aeruginosa* from the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil, on the Microcrustacean *Kalliapseudes schubartii* (Crustacea: Tanaidacea). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.46, p. 463–469, 2004.

MOREIRA, A. A., BIZI, R. Analysis of cylindrospermopsin in water with liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS/MS). Abstract VII In: International Conference on Toxic Cyanobacteria, 5-10 August. Rio de Janeiro. 2007.

NOGUEIRA, I.C.G.; SAKER, M.L.; PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C. ; VASCONCELOS, V.M. Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology**, v.19, p. 453–459, 2004.

NORRIS, R.L.; EAGLESHAM, G.K.; PIERENS, G.; SHAW, G.R.; SMITH, M.J.; CHISWELL, R.K.; SEAWRIGHT, A.A. ; MOORE, M.R. Distribution of C-14 Cyindrospermopsin *in vivo* in the mouse. **Environmental Toxicology**, v.16, n.6, p.498-505. 1999.

OHTANI, I.; MOORE, R.E. ; RUNNEGAR, M.T.C. Cyindrospermopsin - a potent hepatotoxin from the blue-green-alga *Cyindrospermopsis raciborskii*. **Journal of the American Chemical Society**, v.114, n.20, p. 7941-7942. 1992.

PENIDO, J.S. Estudos Ecotoxicológicos da água e do sedimento do ribeirão Limeira (Piquete/Lorena, SP) Tese (doutorado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

PORTER, J.C.G., MCDONOUGH, R.. The energetic cost of response to blue-green algal filaments. **Limnology Oceanography**, 29, 365-369. 1984.

PREUBEL, K.; STÜKEN, A.; WIEDNER, C.; CHORUS, I. ; FASTER, J. First report on cyindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. **Toxicon**, v.47, p. 156-162, 2006.

PUERTO, M., CAMPOS, A., PRIETO, A., CAMEM, A., ALMEIDA, A.M., COELHO, A.V., VASCONCELOS, V., Differential protein expression in two bivalve species; *Mytilus galloprovincialis* and *Corbicula fluminea*; exposed to *Cyindrospermopsis raciborskii* cells. **Aquatic Toxicology**, v.101, N.1, p. 109-116, 2010.

ROSEMBERG, D. M. ; RESH, V. H. (ed) **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates**. Chapman and Hall, New York, (1993). 488p.

RÜCKER, J.; STÜKEN, A.; NIXDORF, B.; FASTNER, J.; CHORUS, I. CLAUDIA, W. Concentrations of particulate and dissolved cyindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon* dominated temperate lakes. **Toxicon**. v. 50, p. 800 - 809, 2007.

RUNNEGAR, M.T.C.; ANDREWS, J.; GERDES, R.G.; FALCONER, I.R. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v.25, p.1235-1239, 1987.

RUNNEGAR, M.T.C., KONG, S.M., ZHONG, Y.Z., LU, S.C. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cyindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**. 49, 219–225. 1995.

SAKER ,M.L.; EAGLESHAN, G.K. The accumulation of cyindrospermopsin from the cyanobacterium *Cyindrospermopsis raciborskii* in tissues of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Toxicon**, v.37, p.1065-1077, 1999.

SAKER, M.L.; METCALF, J.S, CODD, G.A, VASCONCELOS, V. M. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cyindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. **Toxicon**, v.43, n.2, p.185-194. 2004.

SANTOS, M.MOREIRA ., FONSECA, A. L. ; MOREIRA, S.M ; OSTEN, J. R.V.,SILVA, E.M ., SOARES, A.M.V.M., GUILHERMINO, L., RIBEIRO, R.Short-Term Sublethal (sediment and aquatic roots of floating macrophytes) Assays with a Tropical Chironomid Based on Postexposure Feeding and Biomarkers.. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 9, 2005.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUJARO, L.F.; CARVALHO, M.C.; CARVALHO, L.R. ; SOUZA, R.C.R. **Identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 58p. 2006.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; 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.

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.

SEIFERT, M.; MCGREGOR, G.; EAGLESMAN, G.; WICKRAMASINGHE, W.; SHAW, G.; First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin 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.

SHAW, G., SEAWRIGHT, R.A.A., MOORE, M.R., LAM, P.K.S. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: Evaluation of its toxicologic activity. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.22, n.1, p.89-92. 2000.

SHEN, X.Y.; LAM, P.S.K.S.; SHAW, G. ; WICKRAMASINGHE, W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Toxicon**, v.40, p.1499-1501, 2002.

SILVA, R.C. **Acúmulo e depuração de Cilindrospermopsina (cianotoxina) e seu efeito no crescimento em tilapias juvenis (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho -IBCCF- Centro de Ciências e da Saúde.Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 89 p. 2008.

SOARES, R.M., MAGALHÃES, V.F., AZEVEDO, S.M.F.O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology** 70 (1), 1-10. 2004

SOARES, R. M. Microcistinas as Estrelas do Tema. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, 2009.

SPOOF, L.; BERG, K.A.; RAPALA, J.; LAHTI, K.; LEPISTO, L.; METCALF, J.S.; CODD, G.A. ; MERILUOTO, J. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica*

isolated from the boreal environment (Finland). **Environmental Toxicology**, v.21, p. 552-560, 2006.

SUSEELA, M.R. Bloom and toxin occurrence. In: Hudnell, H. K. (Ed) **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**, v. 619. Springer. 2008.

TENCALLA, F.G.; DIETRICH, D.R. ; SCHLATTER, C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v.30, p. 215-224, 1994.

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.

THORSTRUP, L., CHRISTOFFERSN, K. Accumulation of microcystins in *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis*. **Archives Hydrobiology**, v.145, n.4, p.447- 467, 1999.

TSUJI, T.K., WATANUKI, F. K., ISHIKAWA, N.M.F. WATANABE, S., NAKAZAWA, H.S M., SUZUKI, H. UCHIDA, HARADA, K.I Stability of microcystins from cyanobacteria—II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. **Toxicon** 33, pp. 1619–1631, 1995

TRIVINHO-STRIXINO, S., STRIXINO, G. **Larvas de Chironomidae (Diptera) do Estado de São Paulo. Guia de identificação e diagnose dos gêneros. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.** Universidade de São Carlos. 1995.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA/600/R - 94/024. **Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants with freshwater invertebrates.** Washington.D.C, 133p, 1994.

VASCONCELOS, V., OLIVEIRA, S. , TELES, F.O. Impact of a toxic and a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkii*. **Toxicon**, v.39, p.1461-1470, 2001.

VIEIRA, J.M.D., AZEVEDO, M.T.D., AZEVEDO, S.M.F.O., HONDA, R.Y., CORREA, B. Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belem, PA,) Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, v.42, p. 709-713, 2003.

WATANABE, M.M., KAYA, K., TAKAMURA, N.J. Fate of the toxic cyclic hepatopeptides, the microcystins, from blooms of *Microcystis* (Cyanobacteria) in a hypereutrophic lake. **Phycology**, v.28, p. 761–76, 1992.

WELKER.M., STEINBERG, CH. Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence, **Water Research**, 33 (5), 1159–1164. 1999.

WETZEL, R.A., LIKENS, G.E.; **Limnological Analyses.** New York, 1991. 391 p.

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*). **Toxicon**, v.47, p. 497–509, 2006.

WHITE, S.H., DUIVENVOORDEN, L.J., FABBRO, L.D. A decision making framework for ecological impacts associated with the accumulation of cyanotoxins (cylindrospermopsin and microcystin). *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 10, 25–37. 2005.

WIEGAND, C., PFLUGMACHER, S., OBEREM, A., MEEMS, N., BEATTIE, KA., STEINBERG, C.E.W. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxification enzymes of early stages of the zebrafish (*Danio rerio*). **International Review of Hydrobiology**. v. 85, p. 89- 422. 1999.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.203, p. 201-218, 2005.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Ed. Rima , 464, p. 2006.

ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E., GOLDSTEIN, E. G. ; SOUZA, H. B. . Avaliacao de Toxicidade Em Sistemas de Tratamento Biológico de Efluentes Líquidos. **Revista Dae**, v. 52, n. 166, p. 1-10, 1992.