

Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI
MEMARH – Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Geovana Coura Restani

**Efeitos de cepas tóxicas e não tóxicas de
Cylindrospermopsis raciborskii sobre aspectos do
ciclo de vida de *Daphnia laevis* (Cladocera,
Daphnidae)**

Itajubá, MG
2011

Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI
MEMARH – Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Geovana Coura Restani

**Efeitos de cepas tóxicas e não tóxicas de
Cylindrospermopsis raciborskii sobre aspectos do
ciclo de vida de *Daphnia laevis* (Cladocera,
Daphnidae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Instituto de Recursos Naturais da Universidade Federal de Itajubá, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Fonseca

Abril de 2011
Itajubá - MG

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

R436

Restani, Geovana Coura

Efeitos de cepas tóxicas e não tóxicas de *Cylindrospermopsis raciborskii* sobre aspectos do ciclo de vida de *Daphnia laevis* (Cladocera, Daphnidae) / Geovana Coura Restani. -- Itajubá, (MG) : [s.n.], 2011.
65 p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Fonseca.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Cianobactérias. 2. Saxitoxinas (STXs). 3. *Cylindrospermopsis raciborskii*. 4. *Daphnia laevis*. I. Fonseca, Ana Lúcia, orient. II. Universidade Federal de Itajubá. III. Título.

Geovana Coura Restani

Efeitos de cepas tóxicas e não tóxicas de *Cylindrospermopsis raciborskii* sobre aspectos do ciclo de vida de *Daphnia laevis* (Cladocera, Daphnidae)

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 Março de 2011



Dra Ana Lúcia Fonseca – UNIFEI (orientadora)



Dr. Rogério Melloni – UNIFEI



Dra Raquel Moraes Soares – IBCCF/UFRJ

AGRADECIMENTOS

- À Deus; meus pais e ao meu filho;
- Ao programa REUNI, pela bolsa concedida;
- Aos técnicos de laboratório, Paulo, Cláudio, João Luís e Tânia, pela contribuição a pesquisa e a amizade construída;
- A minha orientadora Ana Lúcia Fonseca pelos conselhos e conhecimentos a mim transmitidos ao longo desses anos de convivência
- Ao Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC), pela ajuda prestada;
- Ao Arquimedes, um agradecimento especial pela amizade, carinho, companheirismo e paciência demonstrados ao longo desses anos, e por ter me ensinado que no final tudo dá certo;
- Ao Aloysio Ferrão-Filho, Ronaldo Leal Carneiro e a todos que auxiliaram, de alguma forma, para esse trabalho. Sintam-se imensamente agradecidos

“Não podemos ganhar a batalha de salvar as espécies e os ambientes se não formarmos uma ligação emocional entre nós e a natureza... Temos de deixar espaço para a natureza em nossos corações.”

Stephen J. Gould, 1991

RESUMO

Cylindrospermopsis raciborskii tem sido uma das espécies de cianobactérias de água doces mais difundidas no Brasil e as linhagens brasileiras até então descritas são potencialmente produtoras de saxitoxinas (STXs) (SANT'ANNA et al., 2008). *Daphnia laevis* é um cladóceros de ampla distribuição na América do norte e do sul e tem sido estudado como um possível organismo teste a ser padronizado para uso em ensaios de toxicidade. Dessa forma, o presente trabalho avaliou os efeitos agudos e crônicos em *D. laevis* expostas a diferentes concentrações de cepas de *C. raciborskii*, sendo uma produtora e outra não produtora de STXs, isolados de ecossistemas brasileiros. O efeito agudo observado em *D. laevis* foi caracterizado pela paralisia dos movimentos natatórios, somente para a cepa produtora de STXs. Efeitos crônicos negativos na fecundidade, idade da primeira reprodução e sobrevivência de *D. laevis* foram observados para ambas as cepas de *C. raciborskii*, porém mais acentuados para os tratamentos com a cepa produtora de STXs. Os resultados indicaram que *D. laevis* tem potencial para uso como organismo-teste na avaliação de florações de *C. raciborskii*.

Palavras chaves: cianobactérias, saxitoxina (STXs), *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Daphnia laevis*

ABSTRACT

Cylindrospermopsis raciborskii has been one of the most common fresh water cyanobacteria in Brazil and its Brazilian breedings described so far are potential producers of saxitoxins (STXs) (SANT'ANNA et al., 2008). *Daphnia laevis* is a cladocer of broad distribution on both North and South America and has been considered as a likely test organism to be considered for toxicity tests purposes. This work assessed the acute and chronic effects of *D. laevis* when exposed to different concentrations of *C. raciborskii* breedings, one of which produces STXs while the other breeding does not produce them. Both were isolated from Brazilian ecosystems. The acute effect on *D. laevis* was the immobilization of natatorial movements only under STXs producer breeding. Chronic negative effects were on the fecundity, age of first reproduction and survival of *D. laevis* were observed under both breedings of *C. raciborskii*. However, these effects were most pronounced STXs producer breeding. Results confirm that *D. laevis* has a great potential as a test organism on the assessment of *C. raciborski* blooms.

Key Words: cyanobacteria, saxitoxins (STXs), *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Daphnia laevis*

SUMÁRIO

1 Introdução	8
2 Revisão Bibliográfica.....	9
2.1 Cianobactérias e cianotoxinas	9
2.2 Saxitoxinas (STXs)	12
2.3 Ensaios de toxicidade aguda, crônica e organismos-teste	17
2.4 Cladocera: <i>Daphnia laevis</i> – ecologia e uso como organismo teste	21
3 Justificativa	25
4 Objetivos	26
4.1 Objetivos Gerais	26
4.2 Objetivos Específicos	26
5 Material e Métodos	27
5.1 Origem, cultivo e densidade celular das cepas de cianobactérias	27
5.2 Cultura e manutenção de <i>Daphnia laevis</i>	28
5.3 Quantificação de saxitoxinas	28
5.4 Bioensaios de toxicidade aguda	29
5.5 Bioensaios de toxicidade crônica	30
6 Resultados e Discussão	33
6.1 Bioensaio agudo	33
6.2 Bioensaio crônico	38
7 Conclusões	47
8 Recomendações	48
9 Referências Bibliográficas	49

1. INTRODUÇÃO

Devido às atividades antrópicas há um aumento do aporte de compostos nitrogenados e fosfatados nos recursos hídricos, acelerando o processo de eutrofização. Como resposta a este processo surgem florações de microalgas, entre elas as cianobactérias.

Cianobactérias podem produzir metabólitos secundários, os quais tem sido estudados para a exploração farmacêutica e biotecnológica. No entanto, alguns deles são tóxicos e conhecidos por cianotoxinas. Estas são mais comumente classificadas de acordo com a sua toxicidade para os animais em dermatotoxinas, hepatotoxinas e neurotoxinas. Dessa forma, florações de cianobactérias podem trazer sérios problemas à saúde animal incluindo os seres humanos, além de outros prejuízos ambientais, podendo acabar inviabilizando a utilização de um recurso hídrico.

Entre as espécies de cianobactérias conhecidas, a *Cylindrospermopsis raciborskii* tem sido considerada uma espécie invasora, com florações relatadas em vários países, sendo que linhagens desta espécie tem sido referidas por produzirem cilindrospermopsina (CYN) e saxitoxinas (STXs). A literatura relata que até o momento as linhagens brasileiras conhecidas, são potencialmente produtoras de STXs.

As saxitoxinas são neurotoxinas cuja ação é o bloqueio dos canais de sódio, o que impede a propagação de impulsos nervosos. Essas STXs foram originalmente isoladas de moluscos marinhos que a bioacumularam ao se alimentar de dinoflagelados causadores da maré vermelha e, são melhores estudadas em ambiente marinho.

Os estudos dos efeitos de STXs em organismos de água doce ainda são poucos relatados na literatura, porém apontam prejuízos para vários organismos estudados. Particularmente no caso dos cládoceros, os estudos já existentes demonstraram que as diferentes espécies estudadas apresentaram diferentes respostas à presença das STXs. Neste sentido, o presente trabalho visa contribuir para o conhecimento sobre efeitos de STXs sobre aspectos do ciclo de vida de *D.laevís*, um cladocero endêmico de regiões tropicais e subtropicais ainda não avaliado com relação a cepas de *C. raciborskii*, particularmente produtoras de STXs.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

Cianobactérias são seres procariotos que possuem um sistema de tilacóides contendo clorofila a e outros pigmentos fotossintetizantes como os carotenóides e ficobilinas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001), realizam fotossíntese associadas aos fotossistemas I e II (CASTENHOLZ e WATERBURY, 1989 apud CHORUS e BARTRAM, 1999).

Segundo Sergeev, Gerasimenko e Zavarzin (2002), há aproximadamente 3 bilhões de anos atrás, os seres dominantes na Terra foram procarióticos, o que inclui comunidades de cianobactérias. Assim, elas estão entre as formas mais antigas de vida do planeta e podem estar vinculadas à liberação de oxigênio na atmosfera primitiva.

Quanto à morfologia, as cianobactérias podem ser unicelulares, coloniais ou filamentosas, com células variando entre 2µm e 40µm de diâmetro (KAEBERNICK e NEILAN, 2001). Algumas espécies podem formar um envoltório mucilaginoso ou bainha, que mantém unidos grupos de células ou filamentos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

O habitat das cianobactérias é bastante variado e muitas vezes podem crescer em ambientes inóspitos, como águas de fontes termais com temperaturas próximas de 74°C ou lagos antárticos com temperaturas próximas a 0°C (ALÍPIO, 2008). Algumas espécies habitam em solos ou rochas, em simbioses com plantas ou fungos. No entanto, a grande maioria das espécies conhecidas cresce em ambientes aquáticos – principalmente os de água doce (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Em ambientes límnicos, as condições ideais para o desenvolvimento das cianobactérias são águas neutro-alcálinas (pH 6-9), temperaturas entre 15°e 30°C e altas concentrações de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio (AZEVEDO, 1998).

O sucesso competitivo de cianobactérias se deve a adaptações como: capacidade para fixar nitrogênio (heterocistos); habilidade para regular sua flutuação (aerótopos); pigmentos acessórios para captação de luz e a vários metabólitos secundários produzidos por elas com funções específicas (KAEBERNICK e NEILAN, 2001).

A habilidade das cianobactérias em sintetizar vários metabólitos secundários como peptídeos, alcalóides, etc., têm fascinado os pesquisadores para exploração farmacêutica e biotecnológica (RASTOGI e SINHA, 2009). No entanto, o crescimento excessivo de cianobactérias (florações), altera drasticamente a qualidade da água, impedindo que este recurso seja utilizado para consumo humano ou mesmo para recreação, uma vez que alguns destes metabólitos produzidos por elas são tóxicos, conhecidos como cianotoxinas.

Atualmente, florações de cianobactérias têm se tornado um problema de escala mundial devido às atividades antrópicas acelerarem o processo de eutrofização nos corpos aquáticos. Um corpo aquático eutrófico possui concentrações relativamente altas de nitratos e fosfatos e alta produtividade primária e secundária, sendo, a princípio, um processo natural de envelhecimento de um ecossistema, que leva milhões de anos para acontecer (SILVA, 2008). Com o crescimento e o desenvolvimento das sociedades, resíduos domésticos, agrícolas e industriais lançados em corpos d'água têm acelerado o processo de eutrofização, como pode ser visualizado na figura 1.

EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE EUTROFIZAÇÃO DE UM LAGO OU REPRESA

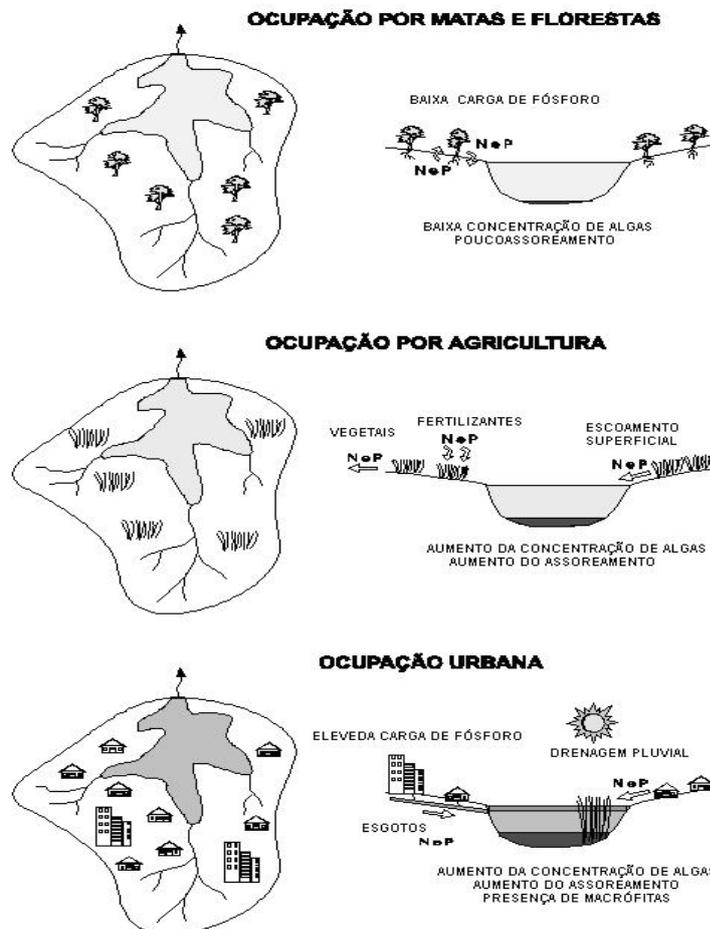


Figura 1. Evolução do processo de eutrofização em um lago ou represa. Associação entre o uso e ocupação do solo e a eutrofização. (Fonte: VON SPERLING, 1996 apud SILVA 2008).

Além das florações de cianobactérias, a eutrofização provoca profundas mudanças nas condições físicas, químicas e biológicas do meio aquático. Dentre essas mudanças Sigeo (2005) menciona, por exemplo: redução da penetração de luz no corpo aquático; aumento da atividade de bactérias heterotróficas; alteração da concentração de oxigênio dissolvido; mortandade de peixes; perda da qualidade cênica e de funções recreacionais; elevação do custo e da dificuldade no tratamento da água para consumo humano.

Já as florações de cianobactérias nesses corpos aquáticos eutrofizados podem acentuar alguns efeitos da eutrofização e acarretarem outras conseqüências como alteração nos aspectos organolépticos da água; alterações nas cadeias alimentares, inibição do zooplâncton herbívoro e sérios problemas à saúde animal, devido às possíveis produções de cianotoxinas (FERNANDES et al., 2009).

De acordo com sua estrutura, as cianotoxinas são divididas em três grandes grupos: peptídeos cíclicos (microcistinas e nodularinas), alcalóides (anatoxina-a, anatoxina-a (s), saxitoxinas, cilindrospermopsinas, aplysiatoxinas e lyngbyatoxina-a) e lipossacarídeos (LPS). Porém, são mais comumente classificadas em termos de sua toxicidade para os animais em: dermatotoxinas (lyngbyatoxina e aplysiatoxinas), as hepatotoxinas (cilindrospermopsinas, microcistinas e nodularinas) e neurotoxinas (saxitoxinas, anatoxina-a e anatoxina-a(s)) (KAEBERNICK e NEILAN, 2001).

Segundo Ibelings e Chorus (2007), os seres humanos podem ser expostos a cianotoxinas através de diferentes rotas e não somente pelo consumo de água contaminada, pois alguns organismos, como peixes, moluscos e crustáceos, podem bioacumular essas toxinas em seus tecidos e serem consumidos pelo homem. Por isso, existe a constante necessidade de monitorar sistemas aquáticos eutróficos com florações de cianobactérias. No Brasil, cianobactérias e cianotoxinas são utilizadas no monitoramento de qualidade de água para consumo humano, por meio da Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

Segundo Sant'Anna et al. (2008) cianobactérias potencialmente tóxicas no Brasil são representadas por 32 espécies nas ordens: 12 Chroococcales, 10 Oscillatoriales e 10 Nostocales. A *Cylindropermopsis raciborskii* pertence à ordem Nostocales e família Nostocaceae (Domínio Bacteria, divisão Cyanobacteria). Esta espécie possui tricomas solitários, células cilíndricas com aerótopos, heterocistos terminais e cônicos, os acinetos são cilíndricos e distantes dos heterocistos (ATLAS..., 2007). Seu sucesso ecológico tem sido atribuído a diversos fatores, tais como: alta taxa de assimilação de amônia (NH₄); capacidade de fixar nitrogênio atmosférico; elevada afinidade por fósforo; resistência à predação pelo

zooplâncton; tolerância à baixa intensidade luminosa (PADISÁK, 1997); e habilidade para tolerar certas variações climáticas (BRIAND *et al.*, 2004 apud HANDEE *et al.*, 2008).

A espécie *C. raciborskii*, pode ser produtora de cilindrospermopsina, como nas linhagens de origem australiana, por exemplo, ou de saxitoxina (STX), como ocorre no Brasil. A primeira informação de florações de *C. raciborskii* produtora de cianotoxinas no Brasil ocorreu em 1999. Lagos *et al.* (1999) relataram a ocorrência de uma floração ocorrida no estado de São Paulo com a produção de saxitoxina, neosaxitoxina e goniautoxina e desde então as linhagens tóxicas brasileiras de que se tem conhecimento atualmente são produtoras de saxitoxinas, as quais inibem a condução nervosa por bloqueio dos canais de sódio (KAEBERNICK e NEILAN, 2001).

Florações com a espécie *C. raciborskii* têm se tornado comum em vários países, e esta espécie tem sido considerada como uma espécie invasora (JARDIM e AZEVEDO, 2006). No presente trabalho foi utilizada cepas de *C. raciborskii*, sendo uma produtora de saxitoxinas e a outra não produtora, ambas isoladas de ecossistemas brasileiros. A seguir aspectos gerais das saxitoxinas serão abordados com detalhes.

2.2 SAXITOXINAS (STXs)

As STXs foram originalmente isoladas de moluscos filtradores que a bioacumularam ao se alimentar de dinoflagelados marinhos causadores da maré vermelha (CHORUS e BARTRAM, 1999). Após trinta anos de sua descoberta, a estrutura da saxitoxina foi elucidada por cristalografia raio-x (SCHANTZ *et al.* apud HUMPAGE, 2008). Mais tarde, Shimizu *et al.* (1976 apud ARAÓZ, MOLGÓ, MARSAC, 2009), isolaram muitas novas toxinas paralisantes de moluscos, nomeadas de goniautoxinas.

As STXs são um grupo de alcalóides carbamatos que podem não ser sulfatados, as saxitoxinas (STXs), com um único grupamento sulfato, as goniautoxinas (GTXs) ou com dois grupamentos sulfato (C-toxinas). Além dessas, grupamentos decabomoil (dcSTX ou dcGTX) e muitas novas toxinas relacionadas como as lyngbiatoxinas (LWTXs) tem sido identificadas. (APELDOORN *et al.*, 2007; ARAÓZ; MOLGÓ; MARSAC, 2009; CHORUS e BARTRAM, 1999; HUMPAGE, 2008). As LWTXs tem sido encontradas em espécies de cianobactérias bentônicas. A figura 2 demonstra a estrutura química das neurotoxinas.

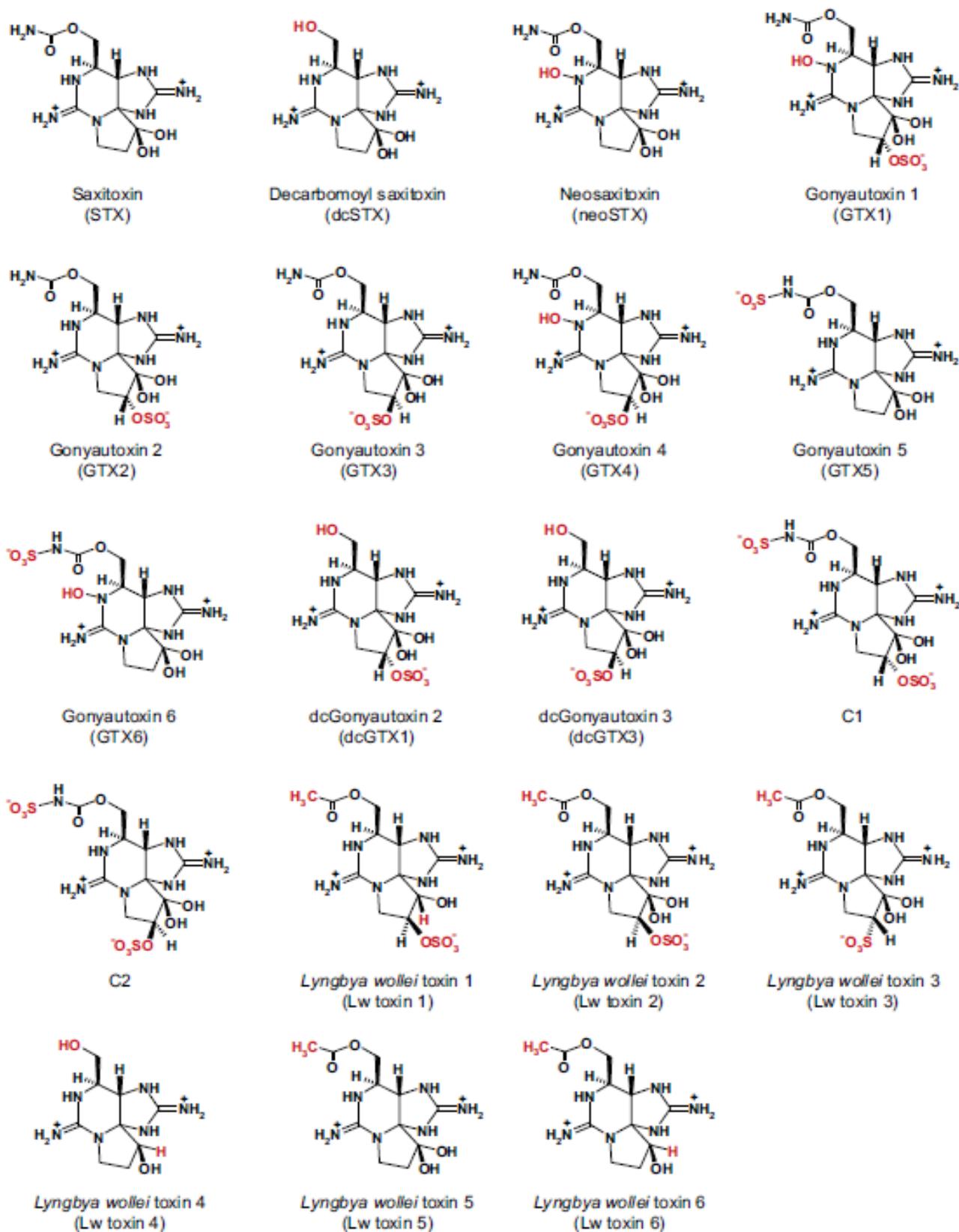


Figura 2– Análogos de Saxitoxinas produzidos por diferentes gêneros de cianobactérias.
Fonte: Llewellyn (2006) apud Araóz; Molgó; Marsac, 2010

Essas neurotoxinas agem afetando a permeabilidade ao potássio ou a resistência das membranas bloqueando os canais de sódio, impedindo assim a propagação do impulso nervoso (CHORUS e BARTRAM, 1999). A posição do bloqueio do canal de sódio é a seguinte: STX carbamato > STX > neoSTX > GTX > decarbomoil STX > N-sulfocarbomoil derivados de STX (DEEDS et al., 2008 apud ARAÓZ; MOLGÓ; MARSAC, 2009). As saxitoxinas foram consideradas na lista 1 da Convenção de Armas Químicas juntamente com o gás mostarda, sarin, ricin e muitos outros (LLEWELLYN et al., 2006 apud ARAÓZ; MOLGÓ; MARSAC, 2009; LOVE, 2008).

Os sintomas de intoxicação humana são: formigamento, sensação de ardência nos lábios e boca, que logo depois aparece nos dedos das mãos e dos pés e se propaga para a extremidade dos braços, pernas e pescoço. Pode acontecer fraqueza muscular no pescoço e nos membros com ataxia (imobilidade) acompanhados por perda de coordenação e pode ocorrer morte por parada respiratória. Os sintomas podem começar 5 minutos após a ingestão e a morte pode ocorrer de 2 a 12 horas (BRANCO; AZEVEDO; TUNDISI, 2006). Em casos de doses não letais, os sintomas desaparecem entre 1 a 6 dias e os conhecimentos de efeitos crônicos são escassos (CARMICHAEL, 1994).

Em água doce, as saxitoxinas podem ser produzidas pelas seguintes cianobactérias: *Aphanizomenon spp*, *Anabaena circinalis* (CHORUS e BARTRAM, 1999), *Cylindrospermopsis raciborskii* (LAGOS et al., 1999), *Lyngbya wollei* (CARMICHAEL et al., 1997 apud HUMPAGE, 2008), *Planktotothrix spp* (POMATI et al., 2000), *Anabaena lemmermanii* (KAAS e HERINKSEN, 2000).

O tratamento de água convencional, ou seja, oxidação, coagulação, floculação, decantação, filtração, desinfecção, correção de pH e fluoretação (COPASA, 2011) não remove as STXs da água e estas por sua vez são bastante estáveis. O tempo necessário para degradar 50% dessas toxinas varia de uma a dez semanas, sendo frequentemente necessário mais de três meses para a degradação de 90% dessas moléculas (CHORUS e BARTRAM, 1999).

No Brasil, Castro et al. (2004) demonstraram que a estabilidade das saxitoxinas produzidas por *C. raciborskii* foi bastante alta, elas permaneceram ativas em média após trinta dias a uma temperatura de 25°C e após cinquenta dias em uma temperatura de 19°C. Também se mostraram inalteradas a um pH em torno de 9.

Os efeitos farmacológicos das saxitoxinas têm sido estudados e os valores da DL₅₀ para ratos podem ser observado na tabela 1, mas os dados da toxicidade ainda são inadequados para se determinar um limite de concentração máximo aceitável de saxitoxinas em água doce (CHORUS e BARTRAM, 1999). No entanto, Fitzgerald, Cunliffe e Burch (1999), baseados

em alguns estudos, propuseram 3µg/L como o limite máximo aceitável de saxitoxinas em água para consumo humano, valor este adotado pela Portaria 518/2004. Porém, este valor encontra-se em fase de revisão pelo Ministério da Saúde (Soares, comunicação pessoal).

Tabela 1 - Valores da DL₅₀ após uma única dose do extrato da toxina PSP (STX) em ratos em relação à via de administração.

Rota de Administração	DL ₅₀ (µg. PSP.Kg ⁻¹ por peso corporal)	
	Machos	Fêmeas
Intravenosa	3,4 (3,2 – 3,6)	-
Intraperitoneal	10,0 (9,7 -10,5)	8,0 (7,6 – 8,6)
Oral	263,0 (251 – 267)	-

Fonte: IPCS, (1984); adaptado de Wiberg and Stephenson, (1960 apud CHORUS E BARTRAM, 1999)

Os estudos dos efeitos de STXs em espécies aquáticas tem sido extenso em ambientes marinhos, e ainda escassos em organismos de água doce (FERRÃO-FILHO, 2009c).

Pereira et al. (2004) estimou o acúmulo de STXs produzidas por *Aphanizomenon issatschenkoi* no bivalve *Anodonta cynea* e concluíram que esses bivalves podem atuar como vetores de STXs através da cadeia alimentar. Sasner et al. (1984) detectaram acumulação de STXs, provenientes da cianobactéria *Aphanizomenon flos-aquae* nos bivalves *Ellipio campanatus* e *Corbicula fluminea*. Negri e Jones (1995) verificaram que o molusco *Alathyria condola* bioacumulou altos níveis de STXs (> 80µg/ 100g molusco) quando expostos a células de *Anabaena circinalis*. Os autores consideraram essa bioacumulação como um risco à saúde de animais que se alimentam destes moluscos, como peixes e aves e também aos seres humanos uma vez que os aborígenes na Austrália costumam consumi-lo.

Clemente et al. (2010) encontraram STXs (GTXs) bioacumuladas em músculos do peixe *Geophagus brasiliensis*, coletados em um reservatório brasileiro com florações e predominância de *C. raciborskii* em 3 estações do ano. Encontraram também outras alterações histopatológicas mas que poderiam ser atribuídas a outros compostos químicos presentes na água do reservatório.

Lefebvre et al. (2005) expuseram o peixe *Clupea harengus pallasii* a STXs e observaram que estes animais diminuíram sua resposta natatória espontânea, porém, após 4 a 24h de exposição contínua voltaram a nadar normalmente. Ferrão-Filho et al. (2007b) observaram que *Danio rerio* aumentou sua atividade natatória, quando exposto a água do reservatório do Funil (contendo STX) e quando exposto a cepa de *C. raciborskii* produtora de STXs (CYRF).

Os autores reportaram que o resultado não é compatível com o mecanismo de ação das STXs e que outras toxinas ou compostos com propriedades irritantes aos peixes poderiam estar presentes.

Em cladóceros temos os trabalhos de Haney et al. (1995) que notaram uma redução nos batimentos dos apêndices torácicos e um aumento de rejeição de partículas pelo pós-abdome de *Daphnia carinata* quando exposta a um filtrado de *A. flos-aquae* e STX purificada.

Ferrão-Filho et al. (2007b) demonstraram que *Daphnia pulex* teve sua atividade natatória (avaliados pela distância média percorrida e velocidade média) diminuída na presença de STXs. Ferrão-Filho et al. (2007a) avaliaram efeitos agudos de uma cepa de *C. raciborskii* produtora de STXs (cepa T3) e em amostras de água do reservatório do Funil/ Rio de Janeiro aos cladóceros *D. gessneri*, *D. pulex* e *Moina micrura*. Neste trabalho, *D. pulex* e *M. micrura* apresentaram inibição de seus movimentos natatórios, sendo que *D. pulex* foi a espécie mais sensível e *D. gessneri* não apresentou sensibilidade a presença de STXs. Tanto *D. pulex* quanto *M. micrura* recuperaram seus movimentos ao serem expostas em suspensões desprovidas de algas tóxicas (a maioria se recuperando após 48h). Ferrão-Filho et al. (2010) expuseram *D. pulex* e *M. micrura* por 3 horas em suspensões contendo uma cepa de *C. raciborskii* produtora de STXs (CYRF) e em amostras de água do reservatório do Funil/RJ. Os autores detectaram que estes organismos apresentaram sensibilidade a presença de STXs e capacidade de recuperação, e concluíram que ambos possuem potencial para serem utilizados em ensaios de toxicidade para detectar STXs.

Nogueira et al. (2004b) observaram efeitos adversos sobre o crescimento, a sobrevivência e também o acúmulo de STXs produzida por *A. issatschenkoi* no cladóceros *D. magna*. Soares et al. (2008) também observaram efeitos sobre crescimento e a reprodução de *D. magna* quando expostas a uma cepa de *C. raciborskii* produtora de STXs (CYRF). Os autores atribuíram esses efeitos a baixa qualidade nutricional de *C. raciborskii*. Costa (2005) estudou o efeito de STXs sobre aspectos do ciclo de vida de 3 espécies de cladóceros, *D. pulex*, *D. gessneri* e *M. micrura*. Segundo essa autora, as taxas de reprodução de *D. pulex* e *M. micrura* foram negativamente afetadas e as duas espécies apresentaram paralisia. Por outro lado, *D. gessneri* não apresentou imobilidade e obteve sua taxa de reprodução estimulada pela cepa de *C. raciborskii* produtora de STXs (cepa T3). Ainda segundo a autora, isso demonstra que as espécies apresentam diferentes sensibilidades a presença de STXs.

Outros estudos também apontam que alguns animais aquáticos também podem ter desenvolvido receptores hidrofílicos para saxitoxinas (RASTOGI e SINHA, 2009). A *saxiphilina*, que é uma proteína do soro sanguíneo, isolada originalmente em sapos-boi, tem

sido encontrada em répteis, anfíbios, peixes e artrópodes. Essa proteína seqüestra a toxina da corrente sanguínea, impedindo que ela se ligue aos canais de sódio (LEWIS et al., 2008). Esses animais podem colaborar na transferência de saxitoxinas via cadeia alimentar, pois a transferência de saxitoxinas já foi comprovada em ambientes marinhos (CASTONGUAY et al., 1997; CHEN e CHOU, 1998) como por exemplo nos trabalhos de Jiang et al. (2007) e Teegarden e Cembela (1996). Portanto, faz-se necessário o conhecimento das respostas das diversas espécies de animais aquáticos a presença das STXs.

2.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA, CRÔNICA E ORGANISMOS – TESTE

Desde a antiguidade, respostas de alguns organismos expostos às condições de estresse têm sido utilizadas para avaliar condições ambientais. Há relatos de que Aristóteles (384-322 a. C.) submeteu peixes de água doce à água do mar para estudar suas reações (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008).

Após a Revolução Industrial e a urbanização da sociedade, houve o aumento do número e da quantidade de substâncias químicas lançadas na atmosfera, nos ambientes terrestre e aquático. Gherardi-Goldstein et al. (1990) menciona que os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptáculos de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos d'água por meio das descargas de efluentes, emitidos no ar ou depositados no solo. Segundo Rand (1995 apud ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006) na década de 1930 foram implantados alguns testes de toxicidade com organismos aquáticos com o objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias e despejos líquidos.

Em 1969, o toxicologista René Truhaut sugeriu o termo Ecotoxicologia e o definiu como: *“o braço da toxicologia envolvida com os estudos dos efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais ou sintéticos, para constituintes dos ecossistemas, animal (incluindo o homem), vegetal e microbial, em um contexto integrado”* (TRUHAUT, 1977 apud KAHRU e DUBOURGIER, 2010).

A pressão da opinião pública, principalmente na década de 1970, corroborou para o desenvolvimento da ecotoxicologia e, para atender a demanda das indústrias em satisfazer a opinião pública, agências de proteção ambiental na Europa e Estados Unidos começaram a desenvolver os primeiros protocolos padronizados de testes de toxicidade (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008).

No Brasil, a primeira iniciativa em termos metodológicos na área da ecotoxicologia aquática se deu em 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das águas TC147 da *International Organization for Standardization* (ISO). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) participou desse programa com convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). E, a partir daí foram desenvolvidos e adaptados vários protocolos de ensaios de toxicidade aguda e crônica (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008).

A importância de um teste ecotoxicológico ou bioensaio é que ele complementa as análises físicas e químicas de um corpo hídrico, pois permite a verificação dos possíveis efeitos de uma substância aos organismos de um dado ecossistema. Segundo Zagatto e Bertolotti (2006), os ensaios de toxicidade podem ser utilizados para fins como:

- Determinar a toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos, entre outros;
- Estabelecer critérios e padrões de qualidade das águas;
- Estabelecer limites máximos de lançamento de efluentes líquidos em corpos hídricos;
- Avaliar a necessidade de tratamento de efluentes líquidos quanto às exigências de controle ambiental;
- Avaliar a qualidade das águas;
- Avaliar a toxicidade relativa de organismos aquáticos;
- Subsidiar programas de monitoramento ambiental;
- Estimar impactos provocados em acidentes ambientais.

Os procedimentos ecotoxicológicos tradicionais são os testes de toxicidade aguda e crônica e sua maior preocupação é caracterizar os efeitos adversos causados por um poluente (DAHMS; HAGIWARA; LEE, 2011).

O teste de toxicidade agudo tem como objetivo avaliar a dose ou a concentração de um agente tóxico que tenha capacidade de produzir efeitos aos organismos expostos em um período de tempo relativamente curto. Esse período de exposição pode variar dependendo do organismo e do seu ciclo de vida, e geralmente é de 24h para cladóceros e 96h para peixes.

Os bioensaios agudos permitem estimar os valores de CE_{50} (imobilidade a 50% da população) ou de CL_{50} (mortalidade a 50% da população), determinados por vários métodos estatísticos. Geralmente os valores de concentrações efetivas e letais são expressos em relação

a 50% dos organismos porque estas respostas são mais reprodutíveis, podem ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (COSTA et al., 2008). A vantagem dos bioensaios agudos é que são baratos, simples e confiáveis (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008).

Os testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste, em concentrações sub-letais (COSTA et al., 2008). O tempo de exposição deve ser maior que 10% da duração do ciclo de vida do organismo, uma vez que os lançamentos contínuos de efluentes aquáticos, ou o contato prolongado com substâncias tóxicas podem provocar efeitos crônicos que afetam suas funções biológicas como a reprodução, o crescimento e o comportamento. Geralmente os resultados dos bioensaios crônicos são expressos em CEO (concentração do efeito observado) ou CENO (concentração do efeito não observado, e valor crônico (média entre CEO e CENO) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Os testes de toxicidade podem ser classificados em estáticos, semi-estáticos e dinâmicos, de acordo com o método de adição das soluções-teste. (COSTA et al., 2008). No sistema estático, os organismos são expostos à mesma solução durante o período de ensaio e geralmente são aplicados em testes de curta duração, com substância não volátil ou pouco degradável ou ainda para agentes químicos com efeito tóxico agudo de imediato e persistente. No sistema semi-estático, os organismos-teste são periodicamente transferidos às novas soluções-teste ou há renovação parcial dessas soluções. Costuma ser empregado quando a substância não é muito estável, quando o teste é prolongado ou quando o organismo é pequeno e pode ser arrastado em sistemas dinâmicos. No sistema dinâmico ou de fluxo contínuo, as soluções-teste fluem continuamente através dos recipientes onde estão os organismos-teste e ele é especialmente recomendado para substâncias voláteis e/ou biodegradáveis em curtos períodos de exposição (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Quanto à escolha do organismo-teste, existem alguns critérios a serem considerados, tais como: sensibilidade a uma ampla gama de substâncias; abundância e disponibilidade; se possível, a espécie deve ser endógena para melhor representatividade do ecossistema; importância ecológica; facilidade de cultivo no laboratório; estabilidade genética; grande quantidade de informações disponível na literatura a respeito da biologia da espécie; ciclo de vida relativamente curto, entre outros. Outro aspecto importante à escolha de um organismo-teste é a avaliação da sensibilidade desse organismo, que deve ser feita através de testes de sensibilidade (testes agudos) com substâncias de referência específicas ao organismo

(COSTA et al., 2008; MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Os organismos mais comumente utilizados nos testes são algas, microcrustáceos, peixes e bactérias. As algas verdes e unicelulares de água doce *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* e *Pseudokirchneriella subcapitata* são frequentemente utilizadas em testes de toxicidade (ABNT, 2005).

Crustáceos de água doce da ordem *Cladocera* e do gênero *Daphnia* são bastante utilizados em testes de toxicidade devido a atenderem muitos critérios para uso como organismo-teste, como por exemplo: possuírem ampla distribuição nos corpos d'água, são espécies-chave em muitas cadeias alimentares, o ciclo de vida é curto e são partenogenéticos (estabilidade genética), são facilmente cultivados em laboratórios e sensíveis a vários contaminantes podendo, assim, serem considerados como bioindicadores. Várias espécies de *Daphnia* são utilizadas em testes de toxicidade e a mais utilizada é a *Daphnia magna* em regiões temperadas. No Brasil, a *Ceriodaphnia silvestrii*, uma espécie nativa, padronizada pela ABNT, vem sendo utilizada em ensaios de ecotoxicidade e *Daphnia similis* também vem sendo bastante utilizada em testes de toxicidade e apesar de não ser uma espécie nativa, é facilmente cultivada em laboratório e atende os critérios estabelecidos pelos procedimentos padrões para a seleção de espécies alternativas (BEATRICI, 2001).

Diversas espécies de peixes também são utilizadas como bioindicadores, sendo no Brasil a espécie mais utilizada o *Danio rerio*, vulgarmente conhecido como paulistinha ou peixe zebra e *Pimephales promelas*, popularmente conhecido como “Fathead minnow” (NBR 15088 apud COSTA et al., 2008). Alguns testes também são realizados com bactérias, dentre estes o Microtox® que utiliza a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*.

Existe uma variedade de testes de toxicidade já estabelecidos, sendo que alguns se encontram padronizados 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 Works Association (AWWA), Deutches Institut fur Normung (DIN) e International Organization for Standardization (ISO) (ZORATTO, 2007). A tabela 2 apresenta as principais normas brasileiras referentes a testes de toxicidade aquática.

No Brasil a legislação vigente, a Resolução do CONAMA 357/05, que estabelece os padrões de qualidade de águas continentais, estuarinas e marinhas, bem como a classificação e os usos preponderantes das águas superficiais é a mesma que regulamenta o lançamento de efluentes em corpos hídricos. Essa resolução possui algumas descrições referentes a ensaios

ecotoxicológicos, como em seu artigo 8º §4º requer que possíveis substâncias contaminantes que não estejam listadas, sejam investigadas com a utilização de ensaios ecotoxicológicos (BRASIL, 2005).

Tabela 2 - Testes de Toxicidade padronizados pela ABNT e CETESB.

ORGANISMO	EFEITO	ESPÉCIE	NORMAS BRASILEIRAS
Bactéria	Agudo	<i>Vibrio fischeri</i>	CETESB, L5.22740
Bactéria	Agudo	<i>Spirillum volutans</i> <i>Chlorella vulgaris</i> ,	CETESB, L5.22841
Alga	Crônico	<i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	ABNT, NBR 12648/2005
Microcrustáceo	Agudo	<i>Daphnia similis</i> , <i>Daphnia magna</i>	CETESB, L5.01844 e ABNT, NBR 12713/2009
Microcrustáceo	Agudo	<i>Artemia salina</i>	CETESB, L5.02146
Microcrustáceo	Crônico	<i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	CETESB, L5.02247 e ABNT, NBR 13373/2010
Peixe	Agudo	<i>Danio rerio</i> , <i>Pimephales promelas</i>	CETESB, L5.01949 e ABNT, NBR 15088/2011

Fonte: Costa et al. (2008), com atualizações.

2.4 CLADOCERA: *Daphnia laevis* - ECOLOGIA E USO COMO ORGANISMO-TESTE

Os *Crustacea* constituem uma classe do Filo dos *Artropodos* e são marinhos em sua maioria, alguns podendo habitar água doce ou salobra e poucos, como o tatuzinho-de-quintal, lugares úmidos na terra.

A subclasse *Branchiopoda* compreende, principalmente, os crustáceos de água doce, cujas formas mais comuns são pelágicas (STORER et al., 2002) filtradores, se alimentando de algas, bactérias e outras partículas em suspensão (RUPPERT; BARNES; FOX, 1996).

Os *Branchiopodas*, em geral, apresentam segmentação reduzida do corpo, tórax e abdômen fundidos em um tronco, de quatro a seis pares de apêndices na porção anterior, as quais funcionam como brânquias e estruturas filtradoras de alimento. Apresentam carapaça única, dobrada na porção dorsal (dando a impressão de estrutura bivalve), que não cobre a estrutura

cefálica, possuem olho composto e a maioria um ocelo. O primeiro par de antenas é comumente pequeno e não segmentado, tendo função quimiosensora. O segundo par de antenas é grande e usado para natação. As figuras 3 e 4 ilustram a anatomia de um daphnídeo (DODSON e FREY, 2001).

A reprodução na família *Daphnidae* geralmente é partenogenética e os machos são raros, aparecendo provavelmente quando as condições ambientais não estão muito favoráveis. Nesse caso, pode ocorrer reprodução sexuada e há geração de efípios, estrutura que abriga ovos de resistência (Figura 5). Os efípios freqüentemente são extremamente resistentes à dessecação e à temperatura e são capazes de eclodir meses ou anos após terem sido armazenados no seco ou no frio (STORER et al., 2002). Também se acredita que os efípios estejam envolvidos na dispersão das *Daphnias* (DODSON e FREY, 2001).

Os daphnídeos geralmente possuem desenvolvimento direto e seu desenvolvimento pós-embrionário é dividido em ínstars. A primeira fase inclui o desenvolvimento e amadurecimento sexual do organismo, quando ocorre sua primeira reprodução e a fêmea é denominada primípara. Na segunda fase, o indivíduo já adulto continua a sofrer ecdise, atingindo outro instar. Cada instar é considerado como uma unidade fisiológica do ciclo de vida dos cladóceros. A duração e o número de ínstars variam conforme a espécie e as condições ambientais (HERBERT, 1977 apud JACONETTI, 2005).

Em lagos eutróficos, grandes cladóceros como *Daphnias*, freqüentemente, são organismos dominantes (PINTO-COELHO et al., 2003) e, juntamente com outros microcrustáceos, ocupam um papel-chave nos ecossistemas aquáticos, tanto como predadores de algas e bactérias como fonte de alimentação para peixes, aves e outros organismos (DODSON e FREY, 2001; FONSECA, 1991)

Para Lynch (1989) algumas das características das *Daphnias*, como a reprodução partenogenética, a facilidade para o cultivo em condições controladas, a transparência da carapaça (facilitando medidas de crescimento e reprodução) as tornam populares para estudos em laboratório. Seu curto tempo de desenvolvimento e sua alta taxa intrínseca de aumento natural também corroboram para estudos laboratoriais. A maior parte do conhecimento ecológico de *Daphnias* vem de regiões de clima temperado (GILLOOLY; DODSON, 2000), sendo que espécies como *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* já são internacionalmente padronizadas para bioensaios.

Segundo Ferrão-Filho et al. (2009), é importante a padronização de um maior número de espécies nativas no Brasil, pois elas são mais representativas de nossos ecossistemas,

tornando as respostas dos bioensaios mais consistentes com o que ocorre no ambiente, tornando-os mais confiáveis e eficientes.

Dentre as três espécies de *Daphnia* de ocorrência no Brasil (*D.gessneri*, *D. laevis* e *D. ambigua*) (MATSUMURA-TUNDISI, 1984) *D. laevis* tem sido estudada como um possível organismo teste a ser padronizado para uso em ensaios de toxicidade. Dentre suas vantagens destacam-se o tamanho, podendo atingir 2mm de comprimento, ciclo de vida em média de 40 dias, a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e fotoperíodo de 12 horas sob condições de cultivo em laboratório (FONSECA, 1991). Trata-se de uma espécie de ocorrência em regiões tropicais e subtropicais e de ampla distribuição na América do Norte e Sul (MATSUMURA-TUNDISI, 1984).

Alguns dos estudos acerca de sua ecologia são os de Fonseca (1991); Eskinazi-Sant'Anna et al. (2002); Macedo e Pinto-Coelho (2000 a e b); entre outros, e como uso em bioensaios, podem ser citados os de Arauco, Cruz e Machado Neto (2005); Jaconetti (2005) e Rocha (2009). Todos os três trabalhos realizaram ensaios de toxicidade com compostos químicos orgânicos e inorgânicos visando avaliar os efeitos agudos e/ou crônicos em *D. laevis*.

Desta forma, a utilização da *D. laevis* como organismo-teste neste trabalho para se avaliar o efeito de cepas de *C. raciborskii* produtoras de STXs, poderá contribuir com os estudos acerca de sua ecologia e de seu potencial para utilização em bioensaios.

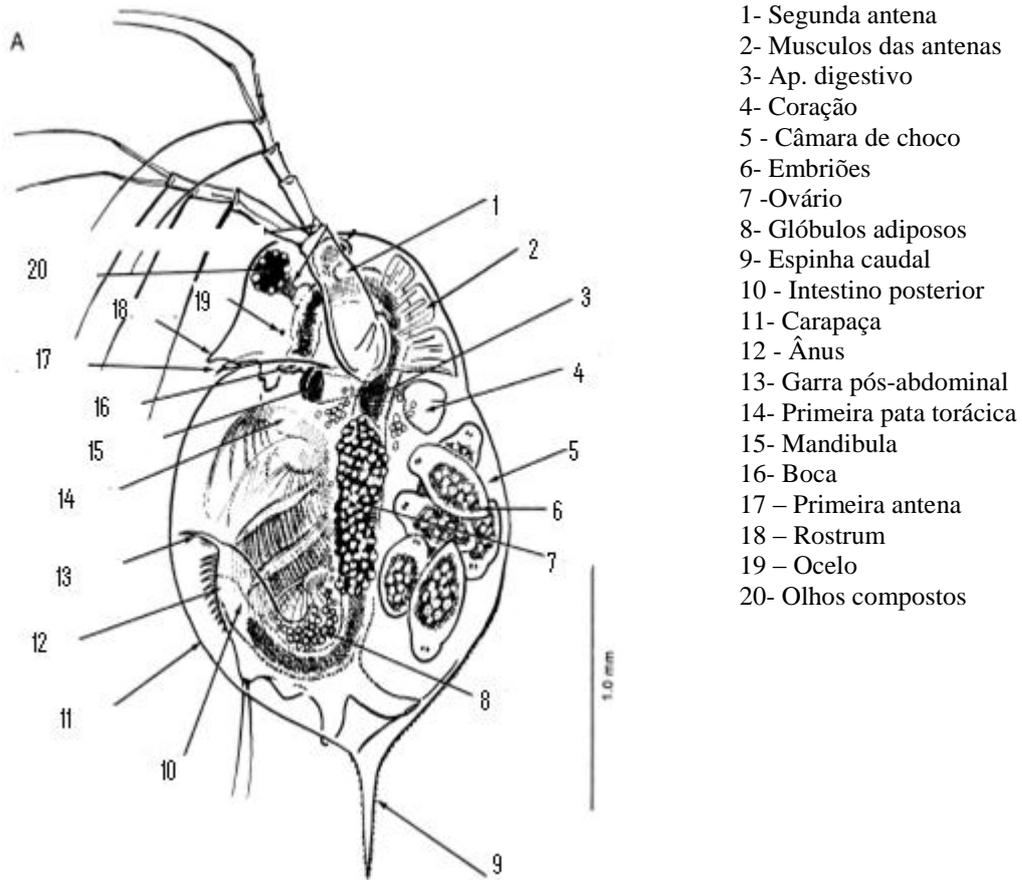


Fig. 3- A anatomia de um dafinídeo . *Daphnia pulicaria* Forbes, 1893. Fonte: Dodson e Frey,2001. Adaptado.

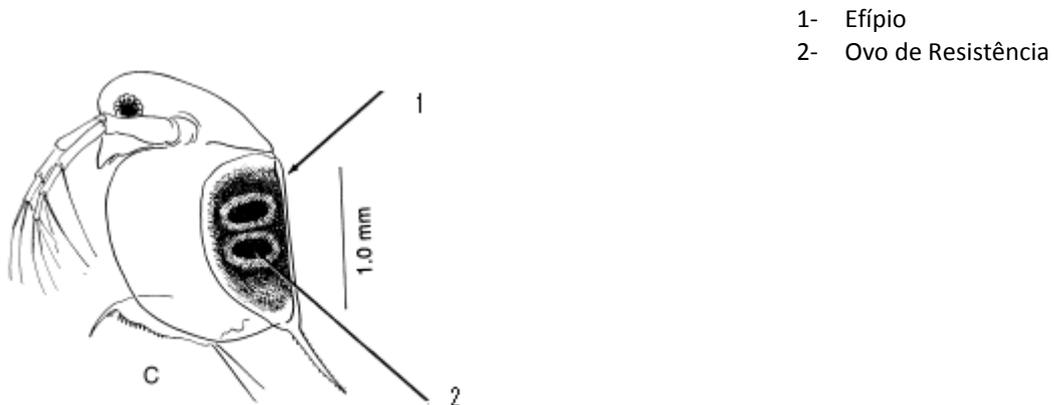


Fig. 4 – Efépio de *Daphnia pulicaria*. Fonte: Dodson e Frey, 2001. Adaptado.

3. JUSTIFICATIVA

Ferrão-Filho et al. (2009), relatam que é importante a padronização de um maior número de espécies nativas no Brasil, pois elas são mais representativas de nossos ecossistemas, tornando as respostas dos bioensaios mais confiáveis e eficientes. Neste sentido *Daphnia laevis* tem sido estudada como um possível organismo teste (FONSECA & RIETZLER, no prelo).

Segundo Sant'Anna et al. (2008), linhagens de *Cylindrospermopsis raciborskii* tem sido constatada por vários autores como produtoras de STXs, dentre eles: Bouvy et al. , 1999; Lagos et al., 1999; Nascimento et al., 2000; Jardim et al. , 2000 e 2001. Costa (2005) relata que diferentes espécies de cladóceros apresentam diferentes sensibilidades à presença de STXs. Neste sentido, a utilização da *D. laevis* como organismo-teste para se avaliar o efeito de cepas de *C. raciborskii* produtora de STX isolada do reservatório do Funil (Rio de Janeiro) será o tema abordado nesta dissertação, e que confere uma abordagem pioneira.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar efeitos de cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* produtora e não produtora de STXs sobre aspectos do ciclo de vida de *Daphnia laevis*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar efeitos agudos da concentração de STXs presente em diferentes concentrações celulares de cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* potencialmente produtoras de STXs sobre a mobilidade de *Daphnia laevis* e verificar se as concentrações de STXs encontradas nestes bioensaios são compatíveis com os dados descritos por outros autores em concentrações obtidas em ambientes naturais;
- Avaliar efeitos crônicos de diferentes concentrações celulares de cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* potencialmente produtoras e não produtoras de STXs sobre os parâmetros mobilidade, fecundidade, idade da primeira reprodução e sobrevivência de *Daphnia laevis*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ORIGEM, CULTIVO E DENSIDADE CELULAR DAS CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS

Ambas as linhagens foram gentilmente cedidas pelo banco de cultivo mantido no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/IBCCF/UFRJ, sob coordenação da Profa. Dra. Sandra Azevedo.

A cepa de *C. raciborskii* - CYRF foi originalmente isolada do reservatório do Funil, na cidade de Resende, Rio de Janeiro, como produtora de saxitoxinas e a cepa de *C. raciborskii* - NPC5-1, isolada de um reservatório de Custódia em Pernambuco, não é produtora de cianotoxinas.

Os cultivos em massa foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UNIFEI em meio ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964), com pH ajustado para 7,5, sistema de aeração contínuo, temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$, intensidade luminosa de 20 e 26 $\mu\text{moles f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 5).

Para a realização dos ensaios de exposição cr4nica, as culturas de CYRF foram mantidas sob cont4nua aeração, com reposição de meio de cultivo a cada quatro dias com intuito de manter a cultura na fase exponencial de crescimento. Portanto, a cada quatro dias, de 3 a 4 litros da cultura eram retirados, centrifugados e feita avaliação da densidade celular para uso nos bioensaios. Uma al4quota de cada extrato foi mantida em freezer para posterior an4lise por cromatografia l4quida de alta resolução (HPLC).

A avaliação da densidade celular de ambas as cepas, foi realizada utilizando-se um hemacit4metro de Fuchs-Rosenthal. Para se estabelecer o tamanho m4dio de cada c4lula e cada tricoma, foram feitas medições de no m4nimo 30 c4lulas e 100 tricomas . Desta forma, o n4mero de c4lulas/mL pode ser estimado pela divis4o do tamanho m4dio de tricomas pelo tamanho m4dio das c4lulas conforme express4o abaixo:

$$\text{C4ls/mL} = \frac{(\text{m4dia dos tricomas medidos}) \times \text{diluição} \times \text{fator de correção}}{\text{m4dia do tamanho das c4lulas}}$$



Figura 5 - Foto ilustrativa do cultivo de cepa de *C. raciborskii* em mariotes de 10L. Laboratório de Ecotoxicologia UNIFEI, Restani, 2010.

5.2 CULTURA E MANUTENÇÃO DE *Daphnia laevis*

O cladóceros *D. laevis* utilizado foi originalmente isolado da Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte/Minas Gerais e foi gentilmente fornecido pela Profa. Dra. Arnola Rietzler, do Instituto de Biologia - ICB da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG.

No laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UNIFEI, esses organismos foram cultivados em água de fonte natural (fornecida pela Comunidade Sol de Deus/Itajubá), com pH ajustado entre 7,2 e 7,4, dureza média de 34,0 ($\pm 3,23$) mg.L⁻¹.CaCO₃ e condutividade média de 87,28 ($\pm 13,31$) $\mu\text{S.cm}^{-1}$.

Os organismos foram mantidos em recipientes com capacidade para 2000 mL numa densidade de 25 organismos L⁻¹. Para a alimentação, diariamente era oferecida a concentração de 10⁵ céls.mL⁻¹, da clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata*, contada com auxílio da câmara Fuchs-Rosenthal, cultivada em meio Oligo, conforme NBR 12713(2009). A renovação da água de cultivo era efetuada a cada dois dias, e os recipientes eram mantidos em incubadora da marca Eletrolab, com temperatura de 23 \pm 2°C e fotoperíodo de 12h. Nos períodos que antecederam os bioensaios e durante o período em que os mesmos foram realizados, foram feitos testes de sensibilidade conforme a NBR 12713 (2009), mensalmente (Anexo A).

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE SAXITOXINAS

A quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/IBCCF/UFRJ. Para extração, foram adicionados 5 mL de ácido acético 500 mM sobre os extratos. Essas amostras ficaram sob agitação magnética por 2h, em agitador de bancada. Posteriormente, foram centrifugadas durante 30min a 10000 g. Os sobrenadantes foram recolhidos e filtrados em filtros de nylon (0,45µm – 13 mm diâmetro - Millipore). Cada amostra foi analisada para quantificação de STX e neoSTX de acordo com a metodologia de Oshima (1995). As toxinas foram identificadas e quantificadas pela comparação com tempo de retenção e área integrada geradas por padrões. Os padrões foram adquiridos do “Institute of Marine Bioscience, National Research Council of Canada” (Halifax, Canadá).

5.4 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

A metodologia utilizada nos bioensaios de exposição aguda foi a proposta por Ferrão-Filho *et al.* (2010). Esta metodologia foi desenvolvida especialmente com o objetivo de detectar efeito de neurotoxinas em Cladocera.

Esses ensaios consistiram de duas fases:

1. Fase de exposição: nesta fase, neonatos de *D. laevis*, entre 6 e 24h de idade, foram expostos a diferentes densidades celulares das cepas de *C. raciborskii*- CYRF (produtora de saxitoxinas) e de *C. raciborskii* - NPC5-1 (não produtora de cianotoxinas): 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células.mL⁻¹, além do controle (somente água de cultivo). Foram utilizados tubos de fundo chato com 20 mL de suspensão algal, contendo 10 neonatos em cada tubo, em trélicas. A atividade natatória dos organismos foi observada após 30 minutos, 1; 2; e 3 horas de exposição. (figura 6)
2. Fase de recuperação: após 3 horas de exposição, o controle e os indivíduos paralisados foram transferidos para novas soluções com apenas água de cultivo e *P. subcapitata*, numa concentração de 10^6 células.mL⁻¹. A atividade natatória desses indivíduos foi

observada em 15 e 24 horas de exposição. Ao final da fase de recuperação, o número de indivíduos com atividade natatória, de imobilizados e de mortos foi contabilizado.

Foram realizados um total de 5 ensaios agudos. Para análise estatística foi calculado a ET_{50} (tempo efetivo de paralisação a 50% dos organismos) por análise de regressão por probit, com o programa SPSS versão 2.0. Foram feitas análises de variância (ANOVA) a um critério de classificação e teste de Tukey, quando houve diferença significativa, para comparação das respostas das concentrações repetidas entre os testes. Essas análises também foram realizadas para comparar o efeito dose-resposta separadamente em cada teste. Para realização desses testes estatísticos o programa utilizado foi o *Graph Pad Prism* versão 5.04.

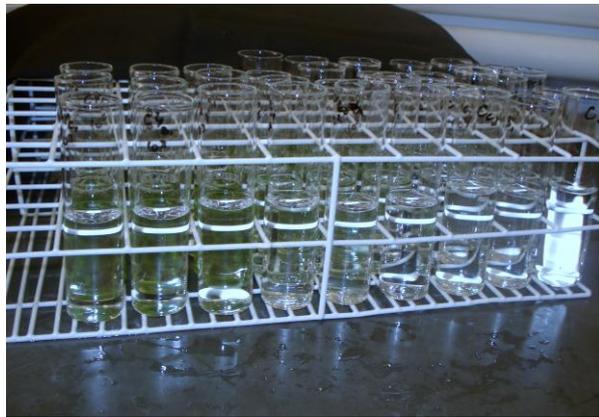


Figura 6 – Foto ilustrativa do bioensaio agudo com *D. laevis* e *C. raciborskii* Laboratório de Ecotoxicologia UNIFEI, Restani (2010).

5.5 BIOENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA

O efeito de *C. raciborskii* na sobrevivência e reprodução de *D. laevis* foi estudado mediante a exposição de neonatos de idade entre 6 e 24 horas, em soluções de cultivo, conforme delineamento experimental apresentado na tabela 3. Ao todo foram 10 tratamentos, sendo 4 com diferentes concentrações de CYRF e *P. subcapitata*, 4 com diferentes concentrações de NPCS-1 e *P. subcapitata*, o controle com apenas *P. subcapitata* e o tratamento sem nenhum tipo de alimento.

Tabela 3 – Diferentes concentrações de *P. subcapitata* e de *C. raciborskii* utilizadas no ensaio de exposição crônica com *D. laevis*.

Tratamento	Concentração de <i>P. subcapitata</i> (%)	Concentração de <i>C. raciborskii</i> (%) (CYRF OU NPC5-1)
A (controle)	100	-
B	75	25
C	50	50
D	25	75
E	-	100
F	-	-

As diluições necessárias de *C. raciborskii* e *P. subcapitata* foram calculadas de acordo com a contagem prévia da densidade celular dos concentrados realizadas com auxílio do hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, onde: 100% = $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹; 75% = $7,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹; 50% = $5,0 \times 10^5$ células.mL⁻¹; 25% = $2,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹.

O ensaio foi conduzido em béqueres com capacidade de 40 mL de solução algal, sendo mantido 1 organismo em cada recipiente (figura 7). Para cada tratamento foram utilizadas 10 réplicas, mantidas em incubadora Eletrolab com temperatura controlada para $23 \pm 2^\circ\text{C}$, luz difusa e fotoperíodo de 12h.

A duração do experimento foi de 15 dias, tempo este necessário para a ocorrência da terceira ninhada dos organismos expostos ao tratamento controle. A troca das soluções foi efetuada diariamente, juntamente com a observação do número de animais mortos, o tempo da primeira reprodução e o número de neonatos nascidos em cada tratamento. Para o preparo das soluções, a água de cultivo utilizada foi previamente filtrada em rede de plâncton com abertura de malha de 20 μm , para a remoção de material particulado e organismos.

Foi calculada a taxa intrínseca de aumento natural (r) para cada um dos tratamentos. Essa taxa pode ser considerada um coeficiente instantâneo de crescimento populacional. A curva de crescimento exponencial também foi traçada. A taxa intrínseca de aumento natural foi calculada pela seguinte expressão:

$$r = (\ln N_t - \ln N_0) / t$$

onde:

N_0 – número de indivíduos iniciais;

N_t – número de indivíduos no instante t;

t – duração do experimento

As análises estatísticas das diferentes concentrações de CYRF e NPC5-1 sobre os parâmetros sobrevivência; fecundidade média e idade da primeira reprodução foram feitas por análise de variância (ANOVA) a um critério de classificação. As diferenças significativas entre os tratamentos foram testadas por comparação múltipla, pelo teste de Tukey.

A taxa intrínseca de aumento natural (potencial biótico) também foi analisada por análise de variância a um critério de classificação (ANOVA – one way) e as diferenças significativas analisados pelo teste de Tukey. O programa utilizado para a realização dos testes estatísticos e para traçar a curva de crescimento exponencial foi o *Graph Pad Prism* versão 5.04.

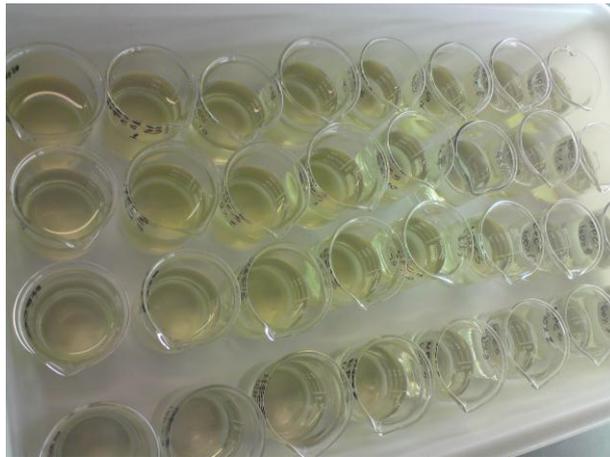


Figura7 - Foto ilustrativa do bioensaio crônico com *D. laevis* e *C. raciborskii*
Laboratório de Ecotoxicologia UNIFEI, Restani (2010).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 BIOENSAIO AGUDO

Ferrão-Filho et al. (2007a) em estudo com outros cladóceros descreveram que a ação das STXs age nas células nervosas que controlam os músculos das segundas antenas destes organismos, o que inibi a transmissão do impulso nervoso e causa imobilidade nestes organismos. Os efeitos dos bioensaios agudos observados em *D. laevis* expostas às cepas produtoras de STXs (CYRF) foi caracterizado pela paralisia dos movimentos natatórios. Os movimentos dos apêndices filtradores foram mantidos, mas os cladóceros ficaram imóveis no fundo dos tubos de ensaio, alguns poucos até apresentaram pequenos movimentos, mas foram incapazes de se locomover na coluna d'água. Para a cepa não produtora de saxitoxina (NPCS-1) e os organismos do tratamento controle, nenhum efeito de paralisia foi observado dentro do período de 3 horas. Esse fato sugere que a imobilidade é decorrente do efeito da saxitoxina sobre os organismos.

Nas concentrações mais baixas de CYRF (10^2 e 10^3 céls.mL⁻¹), ou as menores concentrações de STX e neoSTX (tabelas 4 e 5) houve uma variação nas respostas de imobilização entre os bioensaios realizados, mas de acordo com a análise de variância, ANOVA com os cinco ensaios realizados não houve diferença significativa entre os tratamentos com a mesma densidade celular ($p < 0,05$) - (Anexo B). Outros autores como Hietala et al. (1995 e 1997) e Laüren-määttä, Hietala e Walls (1997) verificaram que a sobrevivência, crescimento e reprodução de diferentes clones de *Daphnias* foram diferencialmente afetados por *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistinas. Portanto diferenças na sensibilidade entre clones de *D. laevis* podem ter ocorrido.

Tabela 4 - Concentrações de Neurotoxinas detectadas em CYRF para o bioensaio de 13/10/10

Conc. CYRF (céls.mL ⁻¹)	Concentrações de Neurotoxinas (ng.EqSTX.mL ⁻¹)	
	STX	neoSTX
10^6	$1,4 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$
10^5	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$
10^4	$1,4 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$
10^3	$1,4 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5}$
10^2	$1,4 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-6}$

Tabela 5 - Concentrações de Neurotoxinas detectadas em CYRF para os bioensaios de 21/10/10, 22/10/10, 25/10/10 e 26/10/10

Conc. CYRF(céls.mL ⁻¹)	Concentrações de Neurotoxinas (ng.EqSTX.mL ⁻¹)	
	STX	neoSTX
10 ⁶	1,4 x 10 ⁻²	5,5 x 10 ⁻³
10 ⁵	1,4 x 10 ⁻³	5,5 x 10 ⁻⁴
10 ⁴	1,4 x 10 ⁻⁴	5,5 x 10 ⁻⁵
10 ³	1,4 x 10 ⁻⁵	5,5 x 10 ⁻⁶
10 ²	1,4 x 10 ⁻⁶	5,5 x 10 ⁻⁷

Para os organismos de *D. laevis* expostos a concentração de 10³ céls.mL⁻¹ de CYRF, a paralisia total se estendeu até o período de 2 horas (figura 8), mas como os organismos expostos as concentrações maiores tiveram respostas muito rápidas, não foi possível o cálculo da EC₅₀. Os valores da ET₅₀ (tempo efetivo para imobilização de 50% dos indivíduos) foram calculados e são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Valores de ET₅₀ (tempo efetivo de imobilização a 50% dos indivíduos em horas) para *D. laevis* exposta a *C. raciborskii* produtora de saxitoxina (CYRF)

Bioensaio Agudo	Concentrações (céls.mL ⁻¹)				
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
1	2,76	0,47	0,29 (0,19-0,38)	0,28 (0,17-0,37)	0,28 (0,17-0,37)
2	0,00	0,86	0,51 (0,42-0,61)	0,28 (0,17-0,37)	0,28 (0,17-0,37)
3	3,41	1,14 (0,99-1,32)	0,54 (0,45-0,64)	0,35 (0,25-0,44)	0,28 (0,17-0,37)
4	0,00	0,71 (0,61-0,81)	0,34 (0,23-0,42)	0,28 (0,17-0,37)	0,28 (0,17-0,37)
5	2,58(2,30-2,95)	0,54 (0,43-0,64)	0,29 (0,19-0,38)	0,28 (0,17-0,37)	0,28 (0,17-0,37)

Ferrão-Filho et al. (2010) realizaram bioensaios similares aos do presente trabalho, com duração de três horas para *Daphnia pulex* e *Moina micrura*, com água do Reservatório do Funil e com a cepa CYRF e relataram uma resposta linear para as concentrações de STXs no seston entre 3,0 x 10⁻⁴ ng.EqSTX.mL⁻¹ e 3,0 x 10⁻³ ng.EqSTX.mL⁻¹ e para concentrações mais altas que 3,0 x 10⁻³ ng.EqSTX.mL⁻¹ houve estabilização na resposta, não havendo decréscimos no valor de ET₅₀. De acordo com esses autores, isso reflete uma saturação na resposta de absorção das toxinas por bioacumulação e, após certa concentração de toxina, os efeitos sofridos levam o mesmo tempo para ocorrer. Os resultados obtidos nos bioensaios com *D. laevis* corroboram aos encontrados por esses autores, pois observou-se que os cladóceros expostos as maiores concentrações de CYRF (conteúdo em, 10⁴, 10⁵ e 10⁶ céls.mL⁻¹) ou seja,

as maiores concentrações de STXs e neoSTXs (tabelas 4 e 5) apresentaram paralisia entre 30 min e 1 hora de exposição. Este efeito foi estatisticamente comprovado, quando comparado aos organismos do tratamento controle, pela ANOVA ($p < 0,05$) (Anexo B) (Figura 8).

A fase de recuperação (com somente água e *P. subcapitata*) corroborou os resultados obtidos na fase de exposição, ou seja, organismos expostos a maiores concentrações celulares da cepa CYRF, levaram mais tempo para recuperar os movimentos natatórios (24 horas ou mais), enquanto que apenas 15 horas foram suficientes para os organismos expostos as concentrações mais baixas. A figura 8 ilustra as respostas obtidas dos organismos expostos as diferentes concentrações da cepa CYRF, tanto para a fase de exposição quanto para a fase de recuperação. Apesar, dessa diferença no tempo de recuperação observado nos dados brutos, a ANOVA ($p < 0,05$) só demonstrou diferença significativa quanto ao tempo de recuperação com relação aos organismos expostos as concentrações mais altas de CYRF (10^5 e 10^6 céls.mL⁻¹) comparado ao tratamento controle e os expostos a concentrações mais baixas (10^2 e 10^3 céls.mL⁻¹) em dois dos bioensaios. (Anexo B).

Ferrão-Filho et al. (2007a) relatam que a recuperação depende da espécie de cladóceros testada, da densidade dos filamentos tóxicos na água e também do tempo de exposição. Assim, embora a taxa de mortalidade durante 24 horas, período de realização dos ensaios, tenha sido extremamente baixa, sendo nula em 4 bioensaios, para todos os tratamentos e de apenas 3,33% em um dos bioensaios para os organismos do tratamento de 10^4 céls.mL⁻¹ de CYRF. A dependência desses fatores para a recuperação de cladóceros pode trazer implicações para a sua sobrevivência em ambientes naturais. Havens (2008) descreve que a dinâmica temporal das florações de cianobactérias é variável – em alguns sistemas podem ser persistentes e em outros esporádicas. Assim, em sistemas onde as florações de cianobactérias produtoras de STXs são persistentes, a comunidade zooplânctônica poderá sofrer alterações permanentes.

Ferrão-Filho (2009a) detectou que no Reservatório do Funil mais de 90% da comunidade fitoplânctônica foi composta por cianobactérias durante a maior parte do período monitorado (junho 2002 a março 2006). Esse autor relata que desde 2004, quando as florações de cianobactérias tornaram-se mais constantes, houve redução na diversidade de fitoplâncton e, conseqüentemente, nos cladóceros de grande porte. Hessen, Donk e Gulati (2005) estudaram três lagos eutróficos nos Países Baixos com constantes florações de cianobactérias e constataram que esses lagos são caracterizados por pouca abundância de Daphnias.

No Brasil, florações de cianobactérias de *C. raciborskii* tem sido descritas por muitos autores (LAGOS et al., 1999; TUCCI e SANT'ANNA, 2003; MOLICA et al., 2005;

BARROS e BARBOSA, 2009; NUNES, LÁZARO e MARTINS, 2009; NISHIMURA, PÔMPEO e MOSCHINI-CARLOS, 2009; WERNER et al., 2009; ARAGÃO et al., 2010).

As concentrações de STXs em ambientes naturais podem sofrer variações. Ferrão-Filho (2009a) detectou concentrações de STXs no seston do Reservatório do Funil que variaram de zero (abaixo do limite de detecção) a $3,48 \text{ ng.EqSTX.mL}^{-1}$. Ferrão-Filho et al. (2010) encontraram nesse mesmo reservatório, concentrações no seston que variaram entre $3,0 \times 10^{-4} \text{ ng.EqSTX.mL}^{-1}$ a $3,48 \text{ ng.EqSTX.mL}^{-1}$. Clemente et al. (2010) encontraram na água do Reservatório Alagados diferentes concentrações de STXs conforme as estações do ano. Na primavera a concentração foi de $5,15 \times 10^{-3} \text{ ngEqSTX.mL}^{-1}$ (GTX-2,3 e 5), no verão de $4,384 \times 10^{-2} \text{ ng.EqSTX.mL}^{-1}$ (GTX 2,3,4 e 5) e no outono de $5,078 \times 10^{-2} \text{ ng.EqSTX.mL}^{-1}$ (GTX2,3,4 e 5). Molica et al. (2005) encontraram concentrações de $5,2 \times 10^{-2} \text{ ng.mL}^{-1}$ de STX e $5,1 \times 10^{-3} \text{ ng.mL}^{-1}$ de neoSTX em uma amostra de água no Reservatório Tapacurá/Pernambuco, no período que se estendeu do final de março até maio (2002), em que houve predominância de *C. raciborskii* na floração.

As concentrações de STXs estimadas nos bioensaios realizados com cepa CYRF e *D. laevis* foram compatíveis (quando os autores se referem a níveis de STX abaixo do limite de detecção) e alguns casos, até mais baixos dos que ocorrem em ambientes naturais, quando comparadas com os dados mencionados acima, uma vez que os valores estimados para estes bioensaios apresentaram variações entre $1,4 \times 10^{-2}$ e $1,4 \times 10^{-6} \text{ ng.STX.mL}^{-1}$ e de $1,2 \times 10^{-2}$ a $1,2 \times 10^{-6}$ ou ainda $5,5 \times 10^{-3}$ a $5,5 \times 10^{-7} \text{ ng.neoSTX.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos nos bioensaios corroboram com relatos de autores sobre a diminuição de espécies de grandes cladóceros em ambientes com florações de cianobactérias, conforme já mencionado.

D. laevis mostrou-se bastante sensível à presença de STXs de forma que sua sobrevivência em locais com florações de espécies de cianobactérias produtoras desta toxina estaria comprometida principalmente em casos de florações que se estendessem por grandes períodos. Desta forma, a utilização desta espécie nativa como organismo teste nos ensaios de toxicidade poderá ser incorporada na avaliação de efeitos de florações de cianobactérias.

Os resultados encontrados nos bioensaios crônicos e discutidos no próximo tópico corroboram com os encontrados nos bioensaios agudos.

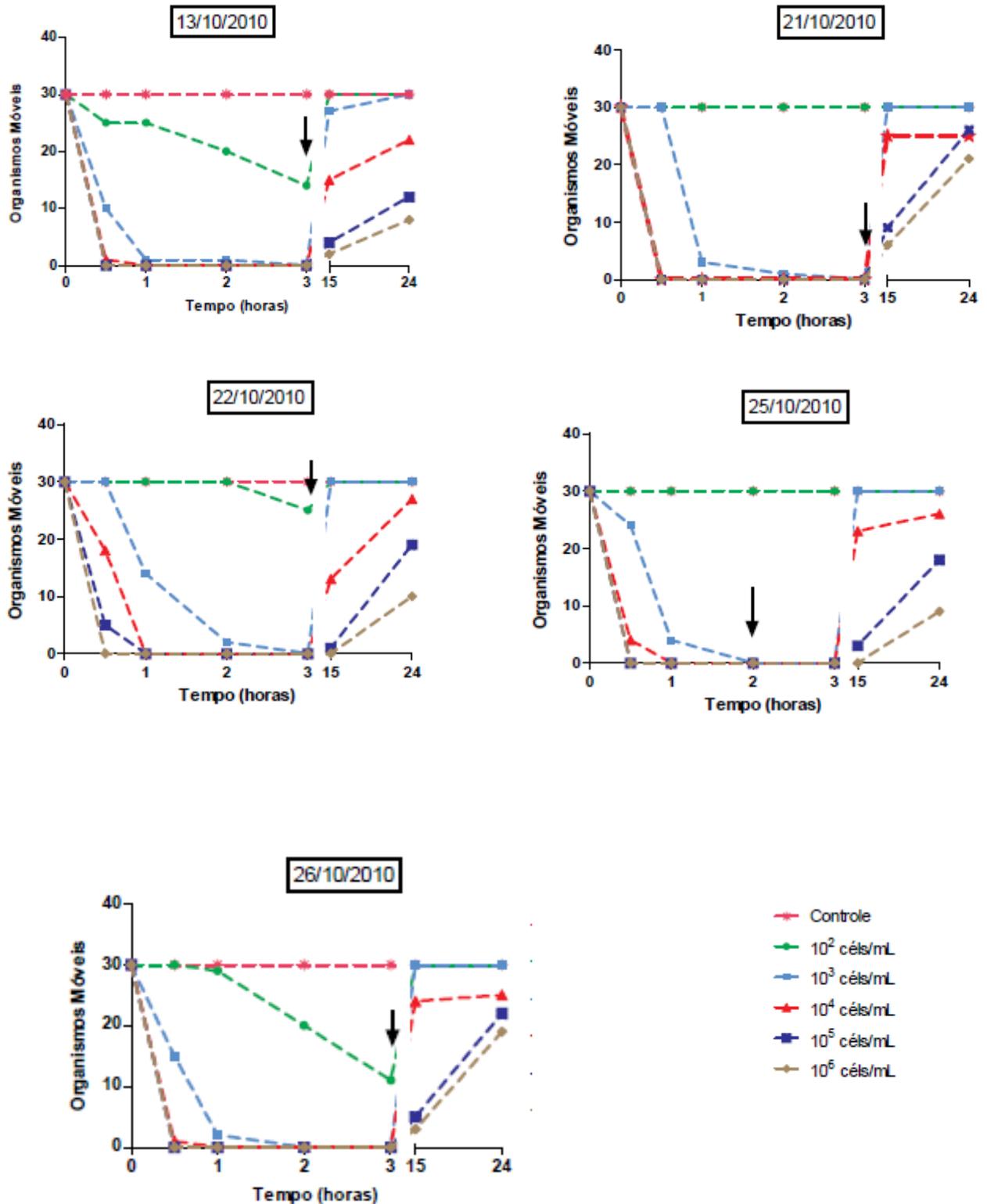


Figura 8 – Resultados de bioensaios agudos com *D. laevis* expostos à cepa CYRF em diferentes concentrações celulares. Estes bioensaios consistiram de duas fases: Fase de exposição – quando os cladóceros foram expostos por 3 horas em diversas concentrações de água e CYRF; e Fase de recuperação – quando os cladóceros foram expostos a água e *P. subcapitata* (concentração de 10^5 céls.mL⁻¹) por 24 horas. O controle foi exposto a somente água (Fase de Exposição) e água e *P. subcapitata* (fase de recuperação).

6.2 BIOENSAIO CRÔNICO

Cladóceros de água doce têm seu desenvolvimento e reprodução influenciados por fatores intrínsecos a cada espécie e também por fatores externos (MELÃO, 2011). Neste bioensaio, com *D. laevis*, submetida aos diferentes tratamentos com *C. raciborskii* e *P. subcapitata*, demonstrou sensibilidade as cepas de *C. raciborskii*. Na figura 9 observam-se os valores de fecundidade média para *Daphnia laevis* cultivados com diferentes proporções de alimento preparado com a clorofíceia *P. subcapitata*, e as cepas de *C. raciborskii*, produtora e não produtora de cianotoxinas. Evidencia-se uma diminuição significativa na fecundidade média dos organismos para quase todos os tratamentos, com exceção daqueles cultivados com 50% e 25% da cepa NPCS-1. Estas diferenças foram comprovadas estatisticamente por meio da ANOVA, teste de Tukey, $p < 0,05$. (Anexo C)

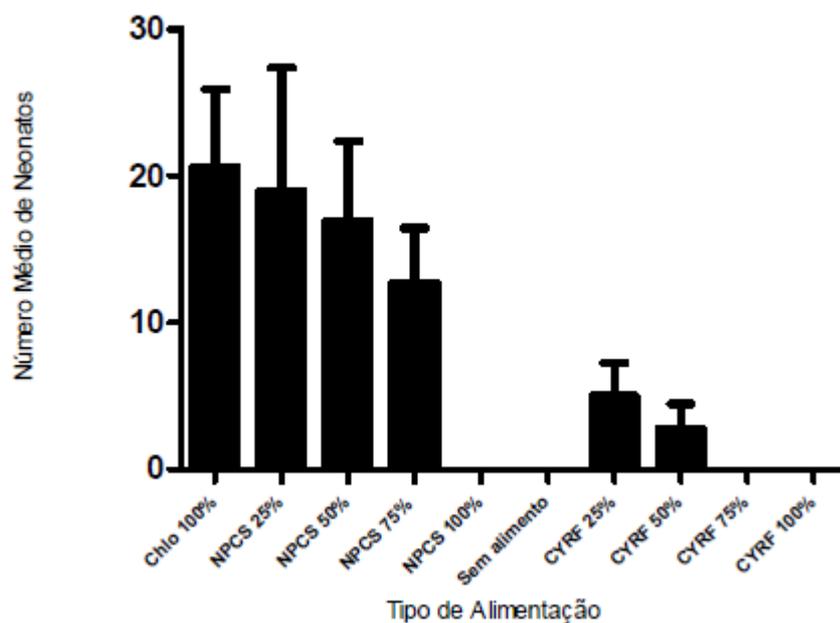


Figura 9 – Fecundidade média (\pm DP) para *D. laevis* submetida a diferentes tratamentos de *C. raciborskii* (cepas produtoras e não produtoras de STX).

Nos tratamentos com NPCS-1 100%, CYRF 75% e o sem alimento não houve a produção de filhotes, embora as fêmeas tenham atingido idade para a reprodução. O efeito na fecundidade média foi bem pronunciado nesses casos e também as fêmeas expostas a CYRF 100%, que nem atingiram a idade esperada para a reprodução.

Ferrão-Filho, Arcifa e Fileto (2003) em trabalho no Lago Monte alegre concluíram que as flutuações do zooplâncton neste ambiente poderiam estar relacionadas à quantidade e a qualidade do fitoplâncton desse ambiente. Alguns autores relatam o baixo valor nutricional das cianobactérias (ARNOLD, 1971; AHLGREN, LUNDSTEDT, FORSBERG, 1990; FERRÃO-FILHO, 2000). Le Cren e Lowe-McConnell (1980) relatam que a qualidade nutricional e a concentração dos alimentos interferem no desenvolvimento, crescimento e reprodução de uma espécie. Os resultados deste bioensaio poderiam, então, também ser explicados pela qualidade nutricional do alimento fornecido às *Daphnias* uma vez que a fecundidade das fêmeas está relacionada à oferta e à qualidade do alimento.

No entanto, em qualquer um dos tratamentos, excluindo-se os que continham 100% de *C. raciborskii*, tanto produtora como não produtora de cianotoxinas, os organismos receberam quantidade de *P. subcapitata* correspondente a 10^5 céls.mL⁻¹ conforme recomendado pela NBR 12713 (2009), e concentrações utilizadas na manutenção dos organismos em laboratório. Portanto, apenas o baixo valor nutricional das cianobactérias não explica a queda na fecundidade das *Daphnias*, uma vez que elas receberam quantidade suficiente de alimento com boa qualidade nutricional para sua manutenção.

Durante todo o período deste bioensaio, foi observada a imobilidade das fêmeas de *D. laevis* expostas à cepa produtora de STXs. Como as STXs são neurotoxinas que agem bloqueando os canais de sódio e conseqüentemente impedem a propagação do impulso nervoso, elas provocam a imobilidade nesta espécie de cladóceros, prejudicando assim, sua taxa de filtração, levando-as a deficiência nutricional, causando a queda na fecundidade. Porém, esse fato sozinho não explica a queda da fecundidade dos cladóceros expostos à cepa não produtora de STXs, uma vez que ela não provocou imobilidade nestes organismos.

Os resultados de sobrevivência das fêmeas de *D. laevis* durante a exposição crônica podem ser visualizados na figura 12. Nesta figura é possível evidenciar uma redução maior na sobrevivência das fêmeas expostas à CYRF em todas as concentrações quando comparadas ao controle. Quanto aos tratamentos com NPCS-1, também houve uma redução na sobrevivência sendo que os únicos tratamentos que não apresentaram diferença significativa com relação ao controle foram os tratamentos com NPCS-1 a 50% e a 25%. O tratamento sem alimento também teve sua sobrevivência reduzida. Esses resultados foram comprovados por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$) (anexo C).

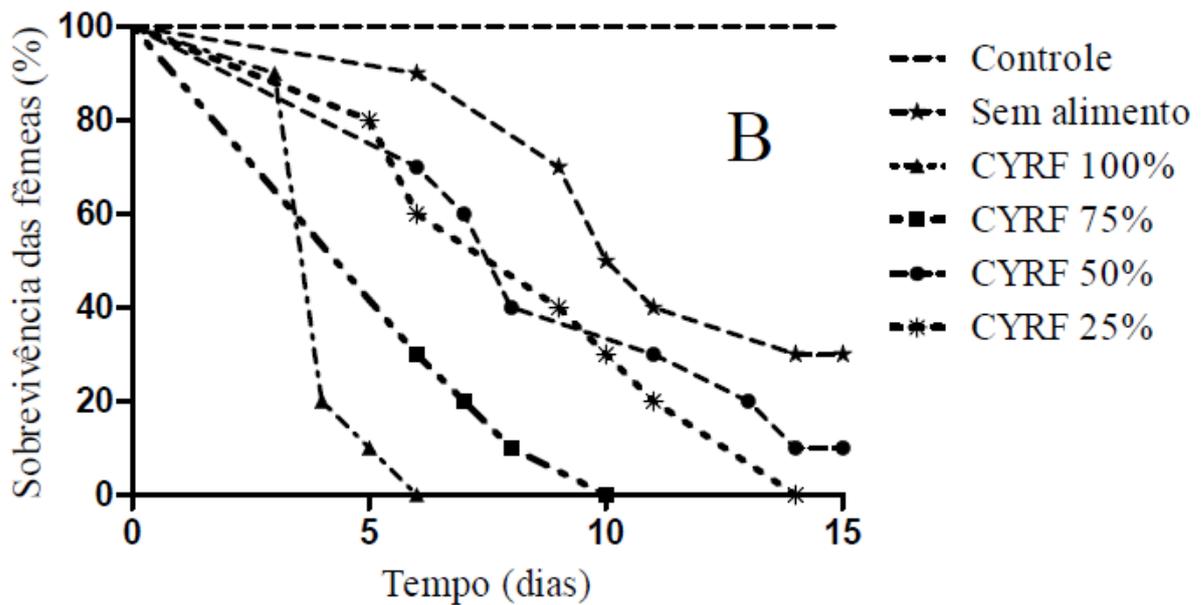
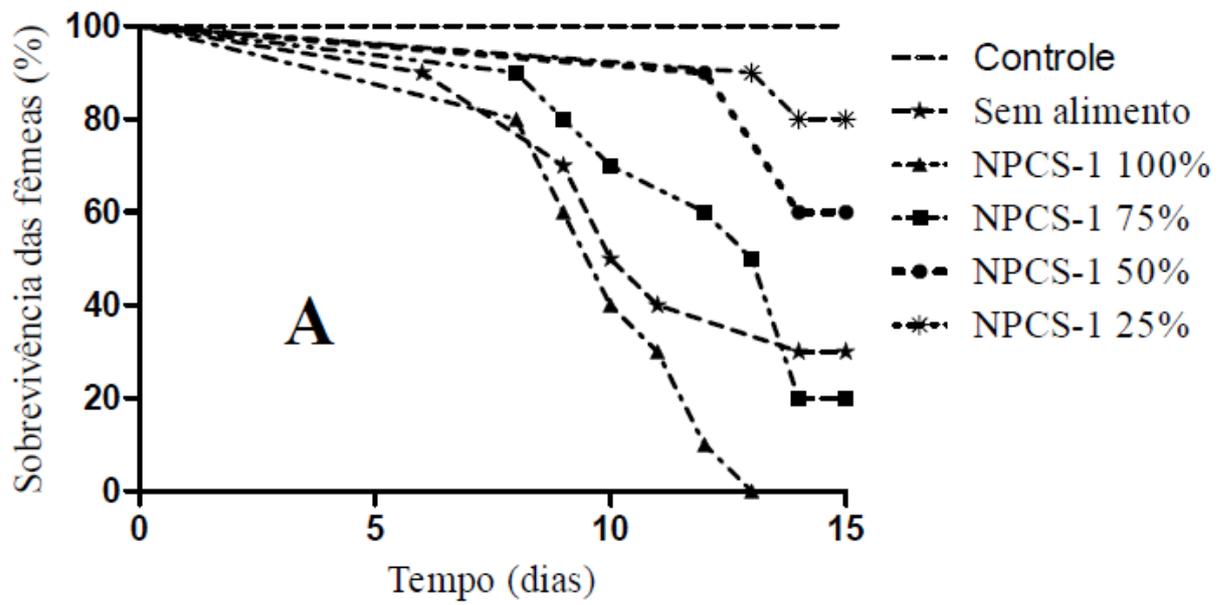


Figura 12- Porcentagem (%) de sobrevivência de fêmeas de *D. laevis* nas diferentes concentrações alimentares com cianobactérias. **A** – Diferentes proporções de NPCS-1 e *P. subcapitata*. **B** - Diferentes proporções de CYRF e *P. subcapitata*. Os tratamentos Controle e Sem Alimento se repetem para melhor visualização dos dados.

Porter e Orkut (1980) relatam que algas e cianobactérias com formas filamentosas, além de aumentar o gasto energético dos cládoceros pela movimentação excessiva para a rejeição de partículas do pós-abdomen podem também obstruir a câmara de filtração desses animais. Assim, os efeitos negativos à sobrevivência e a fecundidade de NPCS-1 sobre *D. laevis* poderiam também ser explicados por um efeito mecânico produzido pelos filamentos da cianobactéria, obstruindo sua câmara filtradora. Esse efeito pode ser ilustrado pela figura 13 abaixo:



Figura 13 – Foto ilustrativa de *D. laevis* alimentada com filamentos de *C. raciborskii*
 Laboratório de Ecotoxicologia UNIFEI, Restani, 2010
 As setas indicam filamentos de *C. raciborskii* presos às segundas antenas e no pós-abdomen de *D. laevis*. O aumento da lupa não pode ser definido.

Haney, Sasner e Ikawa (1995) reportaram e um aumento da rejeição de partículas pelo pós-abdomen além de uma redução nos batimentos dos apêndices torácicos de *Daphnia carinata* quando exposta a um filtrado de *Aphanizomenon flos-aquae* e saxitoxina purificada. Mas esses efeitos mecânicos também não explicariam muito bem, o bom desenvolvimento das *Daphnias* expostas aos tratamentos com NPCS-1 50% e 25% ($5,0 \times 10^5$ céls.mL⁻¹ e $2,5 \times 10^5$ céls.mL⁻¹ de NPCS-1 respectivamente).

Nogueira et al. (2004a) demonstraram que tanto a cepa de *C. raciborskii* produtora de cilindrospermopsina quanto uma não produtora de cianotoxina reduziram o crescimento e a sobrevivência de *D. magna*, embora a cepa produtora de cilindrospermopsina tenha sido mais efetiva. Costa (2005), observou sensibilidade para *D. gessneri* a uma cepa de *C. raciborskii* não produtora de cianotoxinas. Lüring (2003) também encontrou um resultado negativo de *Microcystis* não produtora de cianotoxinas para *Daphnia magna* que não pode ser atribuída a baixa qualidade nutricional, morfologia e inibição alimentar demonstrando que esta cepa estaria produzindo outras substâncias tóxicas as *Daphnias* que não seriam as microcistinas.

Segundo Lampert (1981) se os organismos sem alimento sobrevivem por mais tempo comparado aos expostos a cianobactérias é indício de que essas cianobactérias são tóxicas, e na figura 12 pode-se observar que a sobrevivência do tratamento sem alimento foi um pouco melhor do que para os tratamentos com *C. raciborskii* (excluindo-se os tratamentos com NPCS-1 a 50% e 25%).

Dessa forma, a presença de STXs provavelmente afeta a fecundidade e a sobrevivência de *D. laevis*, pois existe uma diferença significativa nas análises estatísticas feitas entre as mesmas concentrações das duas cepas de *C. raciborskii*. Mas há indícios de que a cepa não produtora de STXs deva possuir algum composto bioativo, ainda não identificado, que seja tóxico a esses cladóceros.

A taxa intrínseca de aumento natural (r) está diretamente relacionada à fecundidade. Neste trabalho, os resultados obtidos (tabela 7, figura 10) confirmaram estatisticamente, pela ANOVA e teste de Tukey (anexo C) as diferenças na fecundidade. Esses dois resultados por sua vez, bem como a sobrevivência, concordam com os resultados para o crescimento populacional (figura 11). Esses dois parâmetros (taxa intrínseca de aumento natural e curva de crescimento populacional) é que fornecem subsídios para prever qual seria o comportamento da população da espécie em questão sobre determinadas condições. Os resultados dos bioensaios obtidos no presente trabalho demonstram que florações extensivas de *C. raciborskii* em um corpo hídrico poderiam levar a população de *D. laevis* ali presente, ao declínio o que poderia acarretar em consequências drásticas ao meio uma vez que elas ocupam um papel chave em cadeias alimentares, tanto como predadoras de algas como fonte de alimentação para peixes e outros organismos. (FONSECA, 1991).

Tabela 7 – Valores de r para *D. laevis* nas diferentes concentrações alimentares com cianobactérias

Taxa Intrínseca de Aumento Natural	N_t	N_0	t (dias)	r (dias⁻¹)
<i>P. subcapitata</i> 100% (Controle)	1020	10	15	0,31
Sem Alimento	0003	10	15	- 0,08
NPCS-1 - 100%	0001	10	12	- 0,19
NPCS-1 – 75% + 25% Clorofícea	0337	10	15	0,23
NPCS-1 – 50% + 50% Clorofícea	0547	10	15	0,27
NPCS-1 – 25% + 75% Clorofícea	0751	10	15	0,29
CYRF - 100%	0001	10	05	- 0,46
CYRF – 75% + 25% Clorofícea	0001	10	09	- 0,25
CYRF – 50% + 50% Clorofícea	0012	10	15	0,012
CYRF – 25% + 75% Clorofícea	0041	10	15	0,09

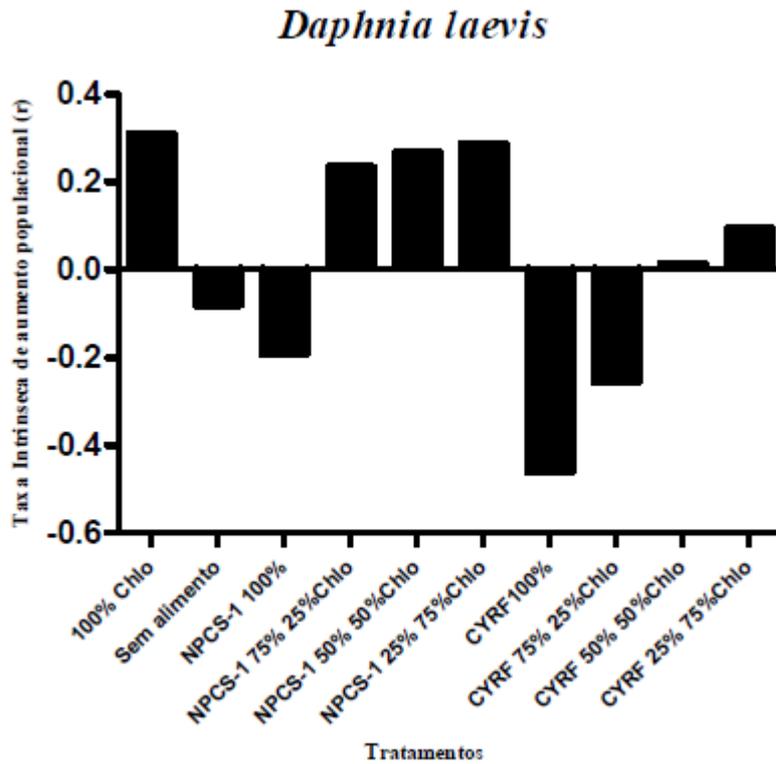


Figura 10 – Taxa intrínseca de aumento populacional (r). Valores obtidos *D. laevis* submetida a diferentes tratamentos de *C. raciborskii*, cepas produtoras e não produtoras de STX.

O tempo médio da primeira reprodução está representado na tabela 8. Observa-se que organismos expostos aos tratamentos com 75%, 50% e 25% da cepa NPCS-1 não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os organismos cultivados em apenas água de cultivo e *P. subcapitata* (controle). Tais diferenças foram estatisticamente confirmadas por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$) (Anexo C- Tabelas 28 e 29).

Tabela 8 – Tempo médio (\pm DP) da primeira reprodução de *D. laevis* nas diferentes concentrações alimentares com cepas de *C. raciborskii* (produtoras e não produtoras de STX).

Tratamentos	Tempo da Primeira Reprodução (dia \pm SD)
Controle	7 (\pm 0)
NPCS-1 - 100%	-
NPCS-1 - 75%	8 (\pm 0,5)
NPCS-1 - 50%	7,3 (\pm 0,483)
NPCS-1 - 25%	7,11 (\pm 0,333)
CYRF - 100%	-
CYRF - 75%	-
CYRF - 50%	10 (\pm 2) *
CYRF - 25%	9,5 (\pm 2,51) *
Sem Alimento	-

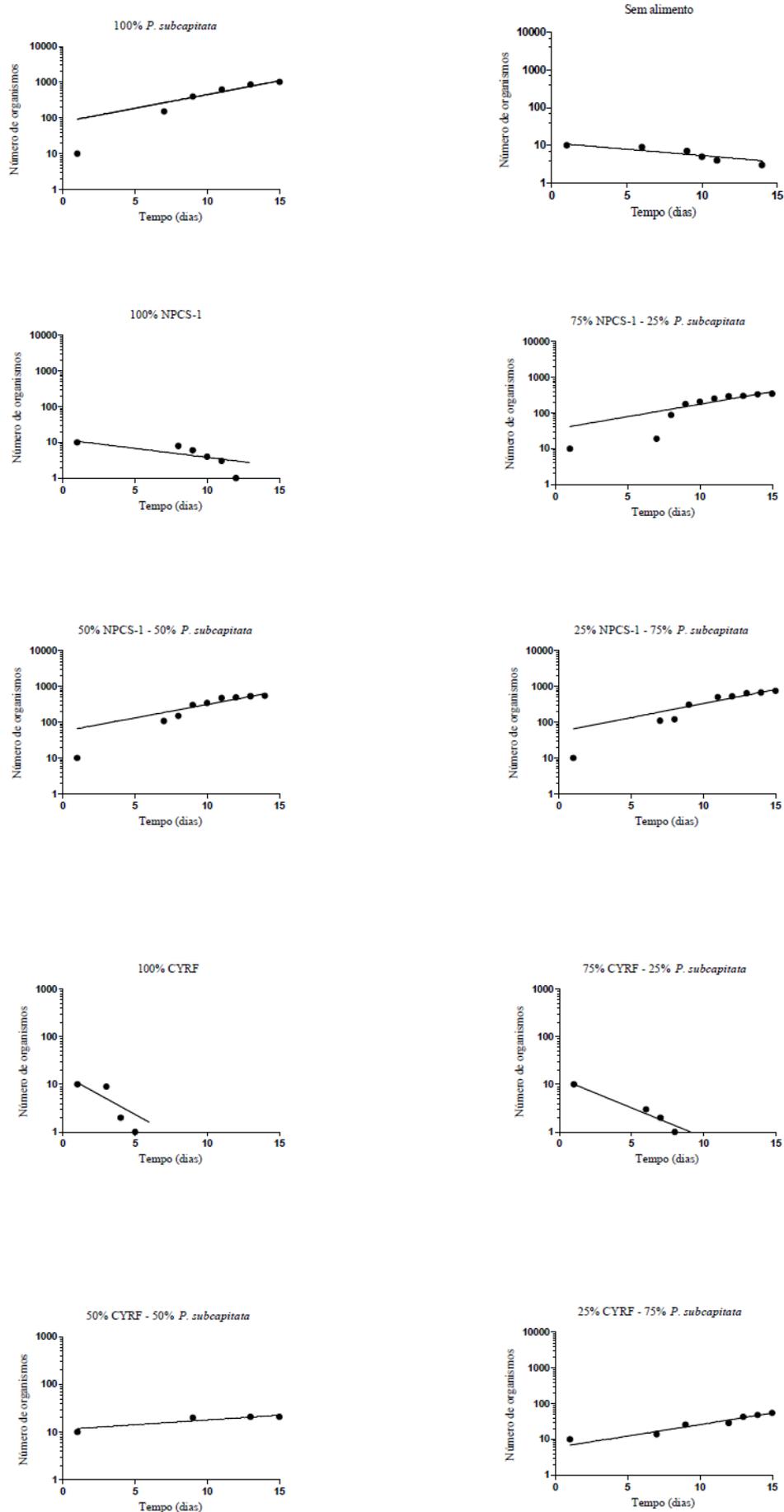


Figura 11- Curvas de Crescimento populacional de *D. laevis* submetidas a diferentes concentrações de *C. raciborskii*

O tempo de desenvolvimento pós-embriônico dos microcrustáceos é o tempo gasto para que um indivíduo atinja a maturidade e comece a procriar e é afetado principalmente pela qualidade e quantidade de alimento (MELÃO, 2011). Além da composição química, outros aspectos devem ser considerados quando se determina a qualidade nutricional de uma alga para o zooplâncton, como a sua morfologia, digestibilidade ao zooplâncton e a não-toxicidade da alga (AHLGREN et al., 1990). Há evidências, então, de que a presença da cepa de *C. raciborskii* produtora de STXs esteja afetando o desenvolvimento pós-embriônico das *Daphnias*, o que aparentemente não está ocorrendo com a cepa não produtora de toxina.

Uma hipótese é que metabólitos secundários, ainda não identificados, produzidos por NPC-1 possam estar se acumulando no organismo de *D. laevis*, portanto seus efeitos citotóxicos só se manifestem a partir de uma determinada concentração acumulada pela *Daphnia*. No entanto, existe a necessidade de investigações para a comprovação desses dados.

Efeitos crônicos na sobrevivência dos organismos foram demonstrados ao longo do período do ensaio. A sobrevivência dos tratamentos com NPC-1 a 50% e a 25% pode ser explicada pelas altas concentrações de *P. subcapitata* nesses tratamentos ($5,0 \times 10^5$ e $7,5 \times 10^5$ respectivamente), uma vez que a presença de alimentos nutritivos nos tratamentos com cianobactérias assim como sua concentração, interfere nos resultados dos testes (FERRÃO-FILHO, 2009b).

Uma das explicações seria a seletividade de alimentos. Pinto-Coelho et al (2003), encontraram em seus dados de campo, no Reservatório da Pampulha – Belo Horizonte que *D. laevis* pode coexistir por longos períodos de tempo com extensivas florações de *Microcystis sp.*, mas que suas reservas de lipídeos totais diminuam. Eskinazi-Sant'Anna et al (2002) em uma análise da dieta natural de *D. laevis* também no Reservatório da Pampulha, encontraram que cianobactérias estiveram praticamente ausentes em seu trato digestivo, sendo detectado apenas pequenas quantidades de colônias de *Microcystis aeruginosa* não digeridas em seus intestinos. Esses autores relatam que as cianobactérias presentes no reservatório foram *M. aeruginosa* e *Anabaena sp* e que essa espécie representavam menos de 15% do total de fitoplâncton. Demott (1988) relata que os mecanismos de seleção alimentar de copépodos dependem de quatro fatores, um deles é a concentração de alimento. *D. laevis* expostas às baixas concentrações de ambas as cepas de *C. raciborskii* (50% e 25%) apresentaram condições melhores, tanto para fecundidade como para sobrevivência, do que as expostas às concentrações mais altas (100% e 75%). Assim, esses resultados corroboram o fato de que *D. laevis* em condições de laboratório pode ser seletiva na sua fonte alimentar, e no ambiente isso também pode ser possível quando as condições forem similares. Esse resultado também

corroborar com a evidência de que a presença de STXs interfere na sobrevivência de *D. laevis*, pois comparando-se apenas os organismos expostos às concentrações mais baixas (50% e 25%) das duas cepas de *C. raciborskii* entre si, pode-se observar que houve diferenças nas respostas, sendo que os organismos expostos as cepas produtoras de STX tiveram seu desenvolvimento mais afetado. Assim, a absorção da STX em *D. laevis* exposta a baixas concentrações da cepa CYRF (50% e 25%) pode estar ocorrendo por via dérmica e não através da via digestiva. No entanto são necessários mais estudos para essas confirmações.

Soares et al. (2008) encontraram resultados diferentes aos do presente trabalho para organismos de *D. magna* expostos a cepa CYRF. No tratamento com 100% CYRF os organismos sobreviveram por nove dias enquanto que em seu tratamento sem alimento sobreviveram por apenas 7 dias. A conclusão dos autores foi de que a cepa CYRF não apresentou toxicidade a *D. magna*, mas foi um alimento de baixa qualidade nutricional. Nogueira et al. (2004b) encontram efeitos adversos de uma cepa de *Aphanizomenon issatschenkoi* produtora de STXs, na sobrevivência e no desenvolvimento de *D. magna* e também que essa espécie de *Daphnia* pode acumular STXs. Costa (2005) estudou o efeito de uma cepa de *C. raciborskii* produtora de STXs e verificou que a mesma não interferiu na sobrevivência dos cladóceros *D. pulex* e *Moina micrura*, embora tenham apresentado prejuízos em seus desenvolvimentos (crescimento e fecundidade) e, verificou também que *Daphnia gessneri* apresentou resistência a esta mesma cepa, não apresentando paralisia e nem tendo seu desenvolvimento afetado (crescimento e fecundidade).

Alguns estudos, como o de Christoffersen (1996 apud COSTA, 2005) sugerem que as suscetibilidades a cianotoxinas podem diferir em diferentes espécies de cladóceros e é esta diferença na sensibilidade entre as espécies que podem favorecer algumas em detrimento de outras em ambientes aquáticos com florações de cianobactérias, causando mudanças na dinâmica da população zooplânctônica. Dessa forma, devido à sensibilidade as cepas de *C. raciborskii* apresentadas por *D. laevis*, muito provavelmente estes organismos não consigam coexistir com florações dessa espécie de cianobactéria em ambientes naturais.

7. CONCLUSÕES

- 1 As concentrações de STXs estimadas para os bioensaios agudos foram compatíveis com o relato de alguns autores sobre as concentrações de STXs encontradas em ambientes naturais;
- 2 *D. laevis* tem potencial para ser utilizada como um organismo-teste em bioensaios agudos na avaliação de florações de *C. raciborskii*, produtoras de STXs, uma vez que esses organismos apresentaram paralisia dos movimentos natatórios na presença da mesma;
- 3 *D. laevis* apresentou uma resposta linear entre a concentração de STX a que foi exposta e seu tempo de recuperação;
- 4 As cepas de *C. raciborskii*, tanto a produtora como a não produtora de STXs, apresentaram efeitos crônicos adversos ao desenvolvimento de *D. laevis*, sendo mais acentuados aos organismos expostos a cepa produtora de STXs;
- 5 Há indícios de que a cepa não produtora de STXs (NPCS-1) possua outros metabólitos secundários ainda não identificados que são tóxicos a *D. laevis* e que possuam efeitos crônicos.

8. RECOMENDAÇÕES

- 1 Confeção de bioensaios agudos com diferentes tempos de exposição e concentrações de *C. raciborskii* produtora de STXs com o intuito de verificar a relação entre exposição à STXs e tempo de recuperação de *D. laevis*;
- 2 Realização de trabalhos para confirmar a seletividade alimentar de *D. laevis*;
- 3 Realização de estudos que visem identificar metabólitos secundários que não as cianotoxinas, produzidos por cepas de *C. raciborskii* que apresentem toxicidade para *D. laevis*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLGREN, G.; LUNDSTEDT, M.B.; FORSBERG, C. Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. **Journal of Plankton Research**, v. 12, n.4, p. 809-818, 1990
- ALÍPIO, A.C.N. **Estudo da expressão diferencial de proteínas em resposta à presença de cálcio na cianobactéria *C. raciborskii***. 2008. 59f. Monografia (Graduação) – UFRJ, Rio de Janeiro, 2008
- APELDOORN, M. E. V; VAN EGMOND, H.P.; SPEIJERS, G.I. A.; BAKKER, G.J. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, Netherlands, v.51 p.7-60, 2007
- ARAGÃO, N.K.C.V. BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, H.S.B.; MOURA, A. N. Cianobactérias formadoras de florações em reservatórios do agreste e sertão de Pernambuco, Brasil. **X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX UFRPE**, Recife, 2010
- ARAÓZ, R.; MOLGÓ, J; MARSAC, N. T. Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon**, v. 56, p.1-16, 2010
- ARAUCO, L. R. R.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G. Efeito da Presença de Sedimento na Toxicidade Aguda do Sulfato de Cobre e do Triclorfon para Três Espécies de *Daphnia*. **Pesticidas: R.ecotoxicol. Meio Ambiente**, Curitiba, v. 15, p.55-64, 2005
- ARNOLD, D.E. Ingestion, assimilation, survival, and reproduction by *daphnia pulex* fed seven species of blue-green algae. **Limnology and oceanography**, v. 16, n. 6, p.906-918, 1971
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: Ecotoxicologia Aquática -Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2009
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS . **NBR 12648**: Ecotoxicologia Aquática -Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 2005
- ATLAS de Microalgas e Cianobactérias de Águas Continentais Brasileiras. Instituto de Botânica: Secretaria de Estado do Meio Ambiente de São Paulo, 2007

AZEVEDO, S. M. F. O. Toxinas de Cianobactérias: Causas e Conseqüências para a Saúde Pública. **Medicina On Line**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p.1-19, 1998

AZEVEDO, S.M.F.O.;CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMEN, E.M.; KENNET, L.R.; LAU,S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru/Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p.441-446, 2002

BARROS, C.F.A.; BARBOSA, F.A.R. Ocorrência de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju no sistema lacustre do médio Rio Doce. **Oecologia: Livro de Resumos IV Simpósio em Ecologia**, Vitória, 2009

BEATRICI, A. C.. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera) submetida a três diferentes dietas.** 2001. 18 f. Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Instituto de Biociências, UFRGS, 2001

BOUVY, M.;MOLICA,R.; OLIVEIRA,S.; MARINHO, M.; BECKER, B. Dynamics of a toxic cyanobacterial Bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of Northeast Brazil. **Aquatic Microbial Ecology**, v.20, p. 285-297, 1999

BRANCO, S. M.; AZEVEDO, S.M.F.O.; TUNDISI, J. G.. Água e saúde humana. In: REBOUÇAS, A. C; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G. **Águas Doces no Brasil**. São Paulo, 2006 Cap. 8, p. 241-267

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Resolução CONAMA nº 357 de 03/2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF., 18 mar. 2005, 2005b.

BRASIL. Portaria 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, D.F., 26 março 2004.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, n. 1, p.78-86, 1994

CARNEIRO, R. L.. **Ecofisiologia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria): Influências da intensidade e qualidade da luz e da dureza da água sobre o crescimento e a produção saxitoxinas.** 2009. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biofísica Carlos Chagas, UFRJ, Rio de Janeiro, 2009

CASTONGUAY, M.; LEVASSEUR, M.; BEAULIEU, J.L.; GRÉGOIRE, F.; MICHAUD, S.; BONNEAU, E.; BATES, S.S.. Accumulation of PSP toxins in Atlantic mackerel: seasonal and ontogenetic variations. **Journal of Fish Biology**, p. 1203-1213, 1997

CASTRO, D.; VERA, D.; LAGOS, N.; GARCIA, C.; VÁSQUEZ, M. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. **Toxicon**, v. 44, p.483-489, 2004

CHEN, C. Y.; CHOU, H. N. Transmission of the paralytic shellfish poisoning toxins, from dinoflagellate to gastropod. **Toxicon**, v. 36, p.515-522, 1998

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. Londres: WHO, 1999

CLEMENTE, Z.; BUSATO, R.H.; RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M.M.; RAMSDORF, W. A.; MAGALHÃES, V. F.; WOSIACK, A. C.; ASSIS, H.C.S. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. **Toxicon**, v.55, p.396-406, 2010

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E. L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p.1820-1830, 2008

COSTA, S. M. **Efeitos de saxitoxinas produzidas por *Cylindrospermopsis raciborskii* e de outras cianotoxinas sobre cladóceros (Branchiopoda)**. 2005 Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, 2005

DAHMS, H.U.; HAGIWARA, A.; LEE, J.S. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. **Aquatic Toxicology**, v. 101. p. 1-12, 2010

DEMOTT, W.R. Discrimination between algae and detritus by freshwater and marine zooplankton. **Bulletin of Marine Science**, v.43, n.3, p. 486-499, 1988

DODSON, S. I.; FREY, D. G.. Cladocera and other branchiopoda. In: THORP, J. H.; COVICH, A. P. (Comp.). **Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates**. USA: Elsevier Science, 2001 cap. 21, p. 850-865

ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M.; MAIA-BARBOSA, P.M.; BARBOSA, F.A.R. On the natural diet of *Daphnia laevis* in the eutrophic Pampulha Reservoir (Belo Horizonte, Minas Gerais). **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n.3, p. 1-9, 2002

FALCONER, I. R.; HUMPAGE, A. R.. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water Supplies: Cylindrospermopsins. **Environmental Toxicology**, v. 21, p.299-304, 2006.

FERNANDES, V. O.; CAVATI, B.; OLIVEIRA, L.B.; SOUZA, B.A. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e conseqüências das florações. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p.247-258, 2009

FERRÃO-FILHO, A.S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.13, n. 2, p. 272-312, 2009c

FERRÃO-FILHO, A.S.; ARCIFA, M. S.; FILETO, C. Influence of seston quantity and quality on growth of tropical cladocerans. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 65, n.1, 2005

FERRÃO-FILHO, A.S.; SOARES, M.C.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO, S.M.F.O. A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Pollution**, p. 1-10, 2010

FERRÃO-FILHO, A.S.; SOARES, M.C.S.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO, S.M.F.O. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 479–489, 2009b

FERRÃO-FILHO, A.S.; COSTA, S.M.; RIBEIRO, M.G.L.; AZEVEDO, S.M.F.O. Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on the swimming movements of Cladocerans. **Environmental Toxicology**, p. 161-168, 2007^a

FERRÃO-FILHO, A.S.; CUNHA,R.; MAGALHÃES, V.F.; SOARES, M.C.S.; BAPTISTA, D.F. Evaluation of sub-lethal toxicity of Cyanobacteria on the swimming activity of aquatic organisms by image analysis. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n.2, p. 93-99, 2007b

FERRÃO-FILHO, A.S.; SOARES, M.C.; ROCHA, M.I.A.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO,S.M.F.O . Florações de cianobactérias tóxicas no reservatório do Funil: dinâmica sazonal e conseqüências para o zooplâncton. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.13, n. 2, p. 346-365, 2009a

FERRÃO-FILHO, A.S.; AZEVEDO, S.M.F.O.; DEMOTT, W.R. Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. **Freshwater Biology**, v. 45, p. 1–19, 2000

FITZGERALD, D.; CUNLIFFE, D.; BURCH, M.. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking-water in south Australia. **Environmental Toxicology**, v. 14, n.1, p.203-207, 1999

FONSECA, A. L. **A Biologia das Espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia silvestrii* (crustacea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces Poeciidae) e o Comportamento destes em Testes de Toxicidade Aquática com Efluentes Industriais.** 1991. 210 f. Dissertação (Mestrado) - UFSCAR, São Carlos, 1991

FUNARI, E; TESTAI, E. Humam health risk assessment related to cyanotoxins exposition. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n.2, p.97-125, 2008

GERARDHI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, R. P. A.; RAMOS, M.L.L.C. **Procedimentos para utilização de Testes de Toxicidade no controle de efluentes líquidos.** São Paulo: CETESB, 1990

GILLOOLY, J.; DODSON, S. I. Latitudinal patterns in the size distribution and seasonal dynamics of new world, freshwater cladocerans. **Limnology and Oceanography**, v. 45, p.22-30, 2000

GOMES, A. M. A.; SAMPAIO, P.L.; FERRÃO-FILHO, A.S.; MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; SANTOS, V.B.; DOMINGOS, P.; AZEVEDO, S.M.F.O. Florações de cianobactérias tóxicas em uma lagoa costeira hipereutrófica do Rio de Janeiro/RJ (Brasil) e suas consequências para saúde humana. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p.329-345, 2009

GORHAM, P.R. MCLACHLON, J.R.; HAMMER, V.T.; KIM, W.K.. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **Verhandlungen der internationale Vereinigung für theorestische und angewandte Limnologie**, v.15, p.796-804, 1964

HANDEE, S. ROHRLACK, T.; BALLOT, A.; ROBERG,K; SKULBERG, R.; BECK, M.; WIEDNER, C. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. **Harmful Algae**, v. 7, p.629-701, 2008

HANEY, J. F.; SASNER, J. J.; IKAWA, M. Effects of products released by *Aphanizomenon flos-aquae* and purified saxitoxin on the movements of *Daphnia carinata* feeding appendages. **Limnology and Oceanography**, v. 40, n. 2, p. 263-272, 1995

HAVENS, K. E. Cyanobacteria Blooms: Effects on Aquatic Ecosystems. In: K.HUDNELL, H.. **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs.** USA, 2008 cap. 33, p. 733- 747

- HESSEN, D.O.; DONK, E.V., RAMESH, G. Seasonal seston stoichiometry: effects on zooplâncton in cianobactéria-dominated lakes. **Journal of Plankton Research**, v. 27, n. 5 p. 449-460, 2005
- HIETALA, J.; LAURÉN-MÄÄTTÄ, C.; WALLS, M. Life history responses of *Daphnia* clones to toxic *Microcystis* at different food levels. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n.7, p. 917-926, 1997
- HIETALA, J.; REINIKAINEN, M.; WALLS, M. Variation in life history responses of *Daphnia* to toxic *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Plankton Research**, v.17, p. 2307-2318, 1995
- HUMPAGE, A. Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. In: HUDNELL, H. K. (Comp.). **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**. USA, 2008 cap. 16, p. 383-415
- IBELINGS, W. B.; CHORUS, I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater seafood and its consequences for public health: A review. **Environmental Pollution**, v. 150, p.177-192, 2007
- JACONETTI, P. C. M. **Validação de Ensaios Ecotoxicológicos com organismos Autoctones *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii***. 2005. 206 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Nuclear - Materiais, Ipen, São Paulo, 2005
- JARDIM, F. A.; AZEVEDO, S.M.F.O. Cianobactérias em águas para abastecimento público e o cumprimento da Legislação Brasileira. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia**, v. 35, n. 3, p.86-91, 2006
- JARDIM, F.A.; MACHADO, J.N.A.; SCHEMBRI, M.C.A.C; AZEVEDO, S.M.F.O.; SPERLING; E.V. A experiência da COPASA no monitoramento, detecção e adoção de medidas mitigadoras para as cianobactérias tóxicas em estações de tratamento de água, Minas Gerais, Brasil – **XXVII Congresso Internacional de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Porto Alegre, Brasil, 2000
- JARDIM, F.A.; MOREIRA, A.A.; VIANA, T.H.; LADERA, M.M.; VIANA, L.N.L. Detecção de toxicidade em cianobactérias como ferramenta para monitoramento e tomada de decisões no sistema de tratamento de água de Montes Claros, MG. – **XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. João Pessoa: Brasil, 2001
- JIANG, T.J; NIU, D.W.T.; XU, Y. Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from the cladoceran (*Moina mongolica*) to larvae of the fish (*Sciaenops ocellatus*). **Toxicon**, v. 50, p. 639-645, 2007

KAAS, H.; HENRIKSEN, P.. Saxitoxins (PSP toxins) in Danish lakes. **Water Research**, v. 34, n. 7, p.2089-2097, 2000

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A. Ecological and Molecular Investigations of Cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p.1-9, 2001

KAHRU, A.; DUBOURGIER, H. C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v. 269, p.105-119, 2010

LAGOS, N.; ODonera, H.; ZAGATTO, P.A.; ADRINOLO, D.; AZEVEDO, S.M.F.O; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v. 37, p. 1359-1373, 1999

LAMPERT, W. Toxicity of the blue-green *Microcystis aeruginosa*: Effective defence mechanism against grazing pressure by *Daphnia*. **Verhandlungen der internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie**, v.21, p.1436-1440, 1981

LAURÉN-MÄÄTTÄ, C.; HIETALA, J.; WALLS, M. Responses of *Daphnia pulex* populations to toxic cyanobacteria. **Freshwater Biology**, v. 37, p. 635-647, 1997

LE CREN, E.D., LOWE-MCCONNELL, R.H. *The functioning of freshwater ecosystems*. Cambridge: Cambridge University Press, 1980

LEFEBVRE, K.A.; ELDER, N.E.; HERSHBERGER, P.K.; TRAINER, V.L.; STEHR, C.M.; SCHOLZ, N.L. Dissolved saxitoxin causes transient inhibition of sensorio motor function in larval Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). **Marine Biology**, v.147, p. 1393–1402, 2005

LEWIS, P; FRITSCH, I.; GAWLEY, R.E.; HENRY, R.; KIGHT, A.; LAY JR, J.O.; LIYANAGE, R.; MCLACHLIN, J. Dynamics of saxitoxin binding to saxiphilin c-lobe reveals conformational change. **Toxicon**, v. 51, p.208-217, 2008

LOVE, A. H. Determining important parameters related to cyanobacterial alkaloid toxin exposure. In: K.HUDNELL, H.. **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**. USA, 2008 cap. 18, p. 453-463

LÜLING, M. *Daphnia* growth on microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa* in different mixtures with the green alga *Scenedesmus obliquus*. **Limnology and Oceanography**, v.48, n.6,p. 2214-2220, 2003

LYNCH, M. The evolution of cladoceran life histories. **O. Rev. Biol.** v. 55, p. 23-42, 1980

MACEDO, C. F.; PINTO-COELHO, R. M. Efeitos das Algas *Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus quadricauda* no crescimento e no índice lipídico de *Daphnia laevis* e *Moina micrura*. **Acta Scientiarum**, v. 2, n. 22, p.397-401, 2000 a

MACEDO, C. F.; PINTO-COELHO, R.M. Taxas de Filtração de *Daphnia laevis* e *Moina micrura* em Relação às clorofíceas *Scenedesmus quadricauda* e *Ankistrodesmus gracilis*. **Acta Limnologia Brasiliensis**, Belo Horizonte, v. 12, p.1-10, 2000 b

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 12, p.355-381, 2008

MATSUMURA-TUNDISI, T. Occurrence of species of the genus *Daphnia* in Brazil. **Hydrobiologia**. v. 112, p. 161-165, 1984

MELÃO, M.G.G. Desenvolvimento e aspectos reprodutivos de cladóceros e copépodos de águas continentais brasileiras. In: POMPÊO, M. L. M. (Ed.) **Perspectivas na Limnologia do Brasil** . Disponível em: < ww.ib.usp.br/limnologia/Perspectivas/arquivo%20pdf/Capitulo%203.pdf > Acesso :20/01/11 19:02: 46

MOLICA, R. J. R.; OLIVEIRA, E.J.A.; CARVALHO, P.V.V.C.; COSTA, A.N.S.F.; CUNHA, M.C.C.; MELO, G.L.; AZEVEDO, S.M.F.O. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, v. 4, p.743-753, 2005

NASCIMENTO, S.M. MOLICA, R.J.R.; BOUVY, M.; FERREIRA, A. SILVA, L.H.S.; HUSZAR, V.L.; AZEVEDO, S.M.F.O. Toxic cyanobacterial blooms in the Tapacurá reservoir, northeast Brazil – **IX International Conference on Harmful Algal Bloom**, Tasmânia, 2000

NEGRI, A. P.; JONES, G. J. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussels *Alathrya condola*. **Toxicon**, v. 33, n. 5, p.667-678, 1995

NEILAN, B. A.; PEARSON, L.A.; MOFFITT, M.C.; MIHALI, K.T.; KAEBERNICK, M.; KELLMAN, R.; POMATI, F. The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. In: HUDNELL, H.K. (Comp.). **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**. Usa, 2008 cap. 17, p. 417-452

NISHIMURA, P.Y.; POMPEO, M.L. M., MOSCHINI-CARLOS, V. AS. Cianobactérias na Transposição Billings-Guarapiranga (Sao Paulo/Sp): Uma Análise Preliminar. **Oecologia: Livro de Resumos IV Simpósio em Ecologia**, Vitória, 2009

NOGUEIRA, I.C.G.; PEREIRA, P.; DIAS, E.; PFLUMACHER, S.; WIEGAND, C.; FRANCA, S.; VASCONCELOS, V.M. Accumulation of paralytic shellfish toxins (PST) from the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* by cladoceran *Daphnia magna*. **Toxicon**, v. 44, p.773-780, 2004b

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

NUNES, T.S.; LÁZARO, G.C.S.; MARTINS, F.C.O. Biodiversidade de cianobactérias e degradação do rio pequeno (manancial de abastecimento de linhares, espírito santo): a dupla face de uma mesma questão. **Oecologia: Livro de Resumos IV Simpósio em Ecologia**, Vitória, 2009

OSHIMA, Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. **Journal of AOAC International**, v. 78, p. 528-532, 1995

PADISAK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv Für Hydrobiologie**, v. 4, p.563-593, 1997

PEREIRA, P. DIAS, E.; FRANCA, S.; PEREIRA, E.; CAROLINO, M.; VASCONCELOS, V. Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfish toxins by the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p.339–350, 2004

PINTO-COELHO, R. M.; BEZERRA-NETO, J.F.; GIANE,A.; MACEDO, C.F.; FIGUEIREDO, C.C.; CARVALHO, E.A. The Collapse of a *Daphnia laevis* (Birge, 1878) population in Pampulha Reservoir, Brasil. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 3, n.15, p.53-70, 2003

PINTO-COELHO, R. M. Eutrophication effects on seasonal patterns of zooplankton in Pampulha lake, Brazil. **Freshwater Biology**, Belo Horizonte, v. 40, p.842-845, 1998

PINTO-COELHO, R.M.; GRECO, M.K. B.. Teores de metais pesados em organismos planctônicos e na macrófita *Eicchornia crassipes* na represa da Pampulha, Belo Horizonte, MG. **A Água em Revista**, Belo Horizonte, v. 12, p.64-69, 1998

POMATTI, F.; SACCHI, S.; ROSSETTI, C.; GIOVANNARDI, S.; ODonERA, H.; OSHIMA, Y.; NEILAN, B.A. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix sp* FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Phycology**, v. 36, p. 553-562, 2000

PORTER K.G.; ORCUTT J.D. Nutritional adequacy, manageability and toxicity as factors that determine the food quality of green and blue-green algae for *Daphnia*. In: W.C. KERFOOT(ed). **Evolution and Ecology of Zooplankton Communities**. New England: Hanover University Press, 1980, p. 268-281

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 27, p.521-539, 2009

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogans, 2001

ROCHA, G. S.. **Efeito do Alimento Contaminado com Cobre sobre o ciclo de vida e produção secundária de *Daphnia laevis***. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia e Recursos Naturais, UFSCAR, São Carlos - SP, 2009

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D.; FOX, Richard S. (Ed.). **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca Brasil, 1996

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**. Stuttgart v.126, p.251-265, 2008

SASNER, J.J.; IKAWA, M.; FOXALL, T.L. Studies on *Aphanizomenon* and *Microcystis* toxins. In: E. P. RAGELIS (ed.), *Seafood Toxins*. Washington: ACS publications, 1984, p. 391-406

SERGEEV, V.N.; GERASIMENKO, L. M.; ZAVARZIN, G. A.. The Proterozoic History and Present State of Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 71, n. 6, p.623-637, 2002

SIGEE, D. C. **Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment**. England: John Wiley & Sons Ltda, 2005

SILVA, R. C. **Acúmulo e depuração de cilindrospermopsina (cianotoxina) e seu efeito no crescimento em tilápias juvenis (*Oreochromis niloticus*)**. 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, 2008

SOARES, M.C. S.; LÜRLING, M.; PANOSSO, R.; HUSZAR, V. Effects of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on feeding and life-history characteristics of the grazer *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1183-1189, 2008

STORER, T. I. ; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C.; NYBAKKEN, J.W. (Ed.). **Zoologia Geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002

TEEGARDEN, G. J.; CEMBELLA, A. D. Grazing of toxic dinoflagellates, *Alexandrium* spp., by adult copepods of coastal Maine: Implications for the fate of paralytic shellfish toxins in marine food webs. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 196, p. 145-176, 1996

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C.L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n.1, p. 97-112, 2003

WERNER, V.R.; NEUHAUS, E.B.; GIORDANI, A.T.; SUSSELA, R.; MAIZONAVE, R.M. *Cylindrospermopsis raciborskii* (wolosynka) seenayya et subba rajua, cianobactéria potencialmente tóxica em mananciais do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Oecologia: Livro de Resumos IV Simpósio em Ecologia**, Vitória, 2009

YOUNG, F. M.; MICKLEM, J.; HUMPAGE, A. R.. Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 25, n. 3, p.374-380, 2008

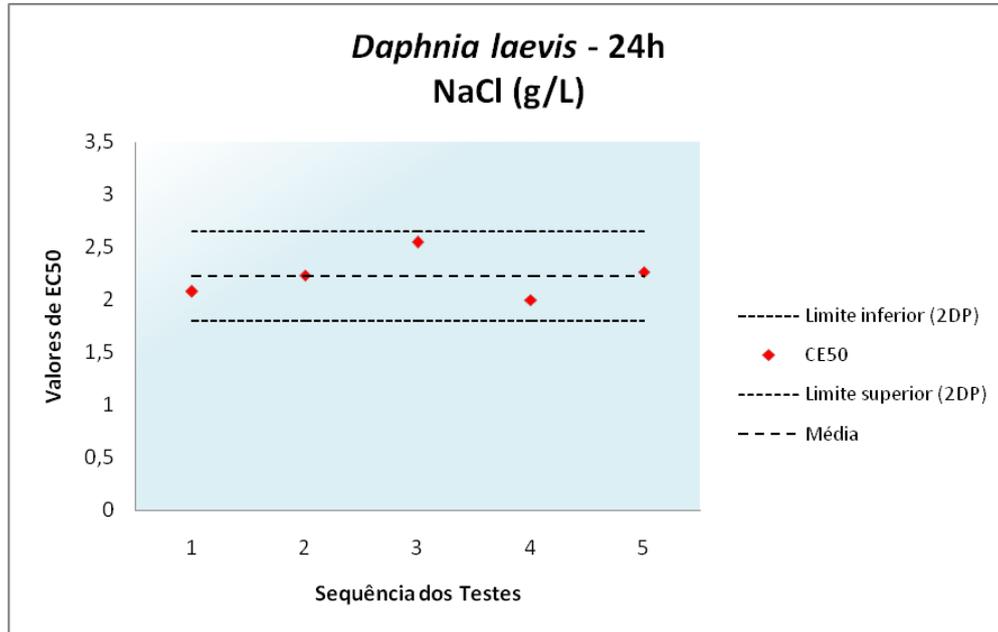
ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos SP: Rima, 2006

ZORATTO, A. C.. **Avaliação ecotoxicologia de compostos naturais produzidos por *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* no Vale do Rio doce, Minas Gerais**. 2007. 158 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia, UFSCAR, São Paulo SP, 2007

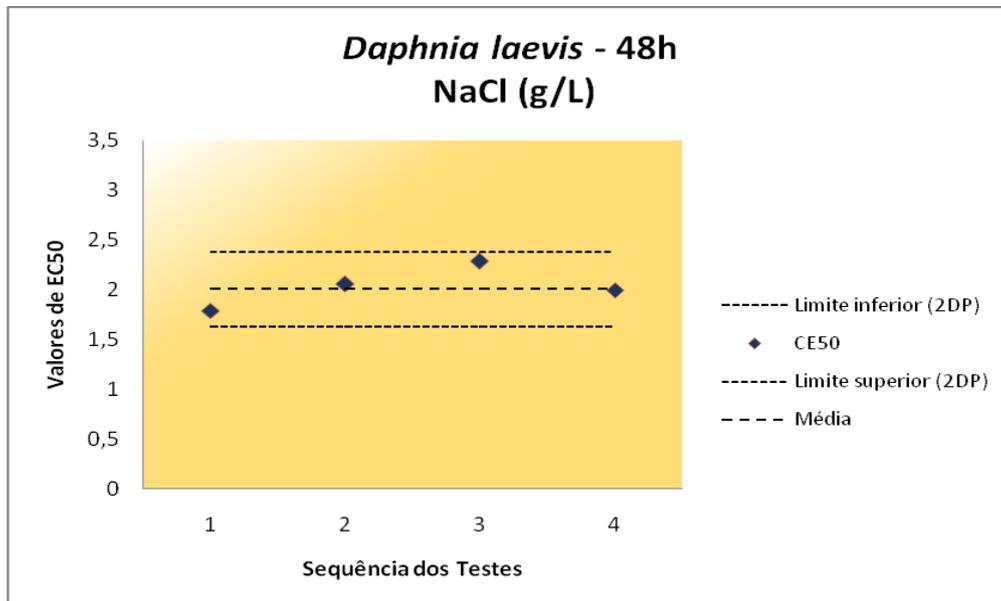
<<http://www.copasa.com.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=98>> Acesso: 15/02/11 19:34:40.

ANEXOS

**ANEXO A - RESULTADOS DOS TESTES DE SENSIBILIDADE
CARTA CONTROLE**



Valores de EC₅₀ em 24 horas para *D. laevis* submetida a NaCl.



Valores de EC₅₀ em 24 horas para *D. laevis* submetida a NaCl

ANEXO B – RESULTADOS ESTATÍSTICOS PARA OS BIOENSAIOS AGUDOS

Resultado da ANOVA para as os Bioensaios Agudos com *D. laevis* expostas em diferentes concentrações de CYRF

ANOVA Table	df	MS	F	P (<0,05)
Treatment (between columns)	25	407,1	2,788	0,0001
Residual (within columns)	104	146		
Total	129			

Tratamento estatístico do efeito de recuperação dos organismos em cada teste

Resultado da ANOVA para fase de recuperação do bioensaio agudo com *D. laevis* e CYRF em 13/10/2010

ANOVA Table	df	MS	F	P(<0,05)
Treatment (between columns)	5	257,4	19,55	0,0012
Residual (within columns)	6	13,17		
Total	11			

Resultado do Teste de Tukey para fase de recuperação do bioensaio agudo com *D. laevis* e CYRF em 13/10/2010

Tukey's Multiple Comparison Test	q	Significant? P < 0,05?
Controle vs 10 ⁵	8,574	Yes
Controle vs 10 ⁶	9,744	Yes
10 ² vs 10 ⁵	8,574	Yes
10 ² vs 10 ⁶	9,744	Yes
10 ³ vs 10 ⁵	7,99	Yes
10 ³ vs 10 ⁶	9,159	Yes

Resultado da ANOVA para fase de recuperação do bioensaio agudo com *D. laevis* e CYRF em 21/10/2010

ANOVA Table	df	MS	F	P(<0,05)
Treatment (between columns)	5	104,3	2,436	0,1544
Residual (within columns)	6	42,83		
Total	11			

Resultado da ANOVA para fase de recuperação do bioensaio agudo com *D. laevis* e CYRF em 22/10/2010

ANOVA Table	df	MS	F	P (<0,05)
Treatment (between columns)	5	248,3	4,806	0,0411
Residual (within columns)	6	51,67		
Total	11			

Resultado da ANOVA para fase de recuperação do bioensaio agudo com *D. laevis* e CYRF em 25/10/2010

ANOVA Table	df	MS	F	P(<0,05)
Treatment (between columns)	5	254,3	9,687	0,0077
Residual (within columns)	6	26,25		
Total	11			

Resultado do Teste de Tukey para fase de recuperação do bioensaio agudo com *D. laevis* e CYRF em 25/10/2010

Tukey's Multiple Comparison Test	q	Significant? P < 0,05?
Controle vs 10^6	7,039	Yes
10^2 vs 10^6	7,039	Yes
10^3 vs 10^6	7,039	Yes

Resultado da ANOVA para fase de recuperação do bioensaio agudo com *D. laevis* e CYRF em 26/10/2010

ANOVA Table	df	MS	F	P(<0,05)
Treatment (between columns)	5	153,3	3,37	0,0856
Residual (within columns)	6	45,5		
Total	11			

ANEXO C - RESULTADOS DO TRATAMENTO ESTATÍSTICO PARA O BIOENSAIO CRÔNICO

Resultado da ANOVA para fecundidade média em *D. laevis* nas diferentes concentrações alimentares

ANOVA	df	MS	F	P
Tratamentos	9	1571	59,6	< 0,0001
Residual	203	26,35		
Total	212			

* df – Grau de liberdade; MS- média quadrática; F- fator; P- nível de significância de 95% (<0,05)

Resultado do Teste de Tukey para fecundidade média em *D. laevis* nas diferentes concentrações alimentares

Teste de Tukey	q	Significante? P < 0,05
Controle 100% vs Sem alimentação	16,36	Yes
Controle 100% vs NPCS 100%	16,36	Yes
Controle 100% vs NPCS 75%	9,487	Yes
Controle 100% vs CYRF 100%	19,24	Yes
Controle 100% vs CYRF 75%	19,24	Yes
Controle 100% vs CYRF 50%	9,463	Yes
Controle 100% vs CYRF 25%	11,86	Yes

* q- Valor crítico; P – Nível de significância

Resultado da ANOVA para taxa intrínseca de aumento natural em *D. laevis* nas diferentes concentrações alimentares com cianobactérias

ANOVA	df	MS	F	P (<0,05)
Treatmentos	9	276757	9,693	< 0,0001
Residual	65	28551		
Total	74			

* df – Grau de liberdade; MS- média quadrática; F- fator; P- nível de significância de 95% (<0,05)

Resultado do Teste de Tukey para taxa intrínseca de aumento natural em *D. laevis* nas diferentes concentrações alimentares com cianobactérias

Teste de Tukey	q	Significante? P < 0,05
Controle vs NPCS-1 - 100%	7,606	Yes
Controle vs NPCS-1 - 75%	5,059	Yes
Controle vs CYRF - 100%	6,991	Yes
Controle vs CYRF - 75%	7,007	Yes
Controle vs CYRF - 50%	7,533	Yes
Controle vs CYRF - 25%	8,109	Yes
Controle vs Sem alimentação	7,304	Yes

* q – Valor crítico; P- nível de significância

Resultado da ANOVA para o tempo da primeira reprodução de *D. laevis* nas diferentes concentrações alimentares com cianobactérias

ANOVA	df	MS	F	P
Treatmentos	9	50,54	61,79	< 0,0001
Residual	44	0,8179		
Total	53			

* df – Grau de liberdade; MS- média quadrática; F- fator; P- nível de significância de 95% (<0,05)

Resultado do Teste de Tukey para o tempo da primeira reprodução de *D. laevis* nas diferentes concentrações alimentares com cianobactérias

Teste de Tukey	q	Significante? P < 0,05?
Controle vs NPCS-1 - 100%	14,13	Yes
Controle vs CYRF - 100%	14,13	Yes
Controle vs CYRF - 75%	14,13	Yes
Controle vs CYRF - 50%	7,929	Yes
Controle vs CYRF - 25%	6,608	Yes
Controle vs Sem alimento	14,13	Yes

* q – valor crítico; P- nível de significância

Resultado da ANOVA para a sobrevivência *D. laevis* nas diferentes concentrações alimentares com cianobactérias

ANOVA	df	MS	F	P
Treatmentos	9	1,378	14,42	< 0,0001
Residual	90	0,09556		
Total	99			

* df – Grau de liberdade; MS- média quadrática; F- fator; P- nível de significância de 95% (<0,05)

Resultado do Teste de Tukey para a sobrevivência de *D. laevis* nas diferentes concentrações alimentares com cianobactérias

Teste de Tukey	q	Significante? P < 0,05?
Controle vs Sem alimento	7,161	Yes
Controle vs CYRF - 100%	10,23	Yes
Controle vs CYRF - 75%	10,23	Yes
Controle vs CYRF - 50%	9,207	Yes
Controle vs CYRF - 25%	10,23	Yes
Controle vs NPCS-1 - 100%	10,23	Yes
Controle vs NPCS-1 - 75%	8,184	Yes

* q – Valor crítico; P- nível de significância