

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

**Kelly Afonsina Fernandes**

**Efeitos agudos e alterações morfológicas em larvas de *Astyanax altiparanae*  
Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) expostas à extratos de  
cianobactérias produtora e não produtora de microcistina-LR**

Itajubá/MG  
Setembro de 2016

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

**Kelly Afonsina Fernandes**

**Efeitos agudos e alterações morfológicas em larvas de *Astyanax altiparanae*  
Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) expostas à extratos de  
cianobactérias produtora e não produtora de microcistina-LR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Meio ambiente e Recursos Hídricos para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

**Área de concentração:** Diagnóstico, monitoramento e gestão ambiental.

**Subárea:** Ecotoxicologia Aquática

**Orientador (a):** Dra. Ana Lúcia Fonseca

**Coorientadora:** Dra. Andreia Maria da Anunciação Gomes

Itajubá/MG

Setembro de 2016

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:  
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem.  
O que Deus quer é ver a gente  
aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais,  
no meio da alegria, e inda mais alegre  
ainda no meio da tristeza!A vida inventa!  
A gente principia as coisas, no não saber por que,  
e desde aí perde o poder de continuação  
porque a vida é mutirão de todos,  
por todos remexida e temperada.  
O mais importante e bonito, do mundo, é isto:  
que as pessoas não estão sempre iguais,  
ainda não foram terminadas,  
mas que elas vão sempre mudando.  
Afinam ou desafinam. Verdade maior.  
Viver é muito perigoso; e não é não.  
Nem sei explicar estas coisas.  
Um sentir é o do sentente, mas outro é do sentidor."

A gente quer passar um rio a nado, e passa:  
mas vai dar na outra banda é um ponto muito mais em baixo,  
bem diverso do em que primeiro se pensou.  
Viver nem não é muito perigoso?  
Dói sempre na gente, alguma vez, todo amor achável,  
que algum dia se desprezou..  
Qualquer amor já é um pouquinho de saúde,  
um descanso na loucura."

Fragmentos do livro "Grande sertão Veredas"  
(Guimarães Rosa)

Dedico este trabalho a meus pais, irmãos e minha avó. O amor que nos une é o mesmo que me deu forças durante essa jornada e que me serve de inspiração todos os dias.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e continuarei agradecendo todos os dias por ter me contemplado com seu desafio. Obrigado pelas oportunidades, pelo aprendizado, pelas pessoas que conheci através desse trabalho, pelo conhecimento agregado, enfim tudo somou para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço à minha família, pelo amor, carinho e dedicação! Meu pai, minha mãe e meus irmãos, obrigada por estarem por perto mesmo estando tão longe geograficamente. Obrigado por acreditarem em mim, sem vocês nada disso seria possível!

À minha orientadora Ana Lúcia Fonseca, pelo apoio, incentivo e principalmente pela confiança. Ter sido orientada por uma pessoa que além de grande profissional, é extremamente humana, foi uma honra. A minha coorientadora Andreia Gomes que esteve junto durante esse processo, sempre agregando conhecimento e me auxiliando nas decisões. Foi minha orientadora e amiga. Obrigada pelos conselhos e pelo carinho todo esse tempo que passamos juntas!

Às amigas de Belo Horizonte/MG que estiveram sempre do meu lado, Jenni, Cys e Lú obrigada pela amizade! Às amigas Cibele, Carol, Liziara, Eryka, Jéssica e Marcela, obrigada pela companhia durante o tempo que passei em Itajubá/MG.

A toda equipe do Cepta/ICMBio de Pirassununga, principalmente ao José Augusto Senhorini, George Yasui e Leonardo Luiz Calado, obrigada por pela colaboração e por terem me recebido tão bem. Aos colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia de Peixes, obrigada pela colaboração pelo companheirismo durante a reprodução do Lambari, passei momentos incríveis na cia de vocês. Ao professor Dr. George, pela colaboração no trabalho, pelo espaço concedido no laboratório e principalmente pelo conhecimento prático que me direcionou muito bem durante os experimentos.

Ao Julio, que foi meu melhor amigo e minha melhor companhia. Obrigada pela paciência, pelo carinho e pela confiança, eu aprendi muito ao seu lado. Obrigada a turma do alojamento em especial a Lúcia, Geovanna, Cris e Priscila.

Ao Calado em especial, que foi meu coorientador e amigo durante essa trajetória. O seu otimismo me impulsionou em vários momentos difíceis foi um prazer pode dividir esse momento com você.

Meus agradecimentos a equipe de profissionais que deu inicio a um grande projeto no qual pude contribuir com essa parcela. Obrigada à Professora e Dra. Gisela Umbuzeiro, ao Dr. Bruno Fiorelini, ao Dr. Ernani Pinto e Dr. Theodore Henry.

Obrigada à toda equipe do Laboratório de Ecotoxicologia coordenado pela Prof.<sup>a</sup> Ana Lúcia Fonseca e do laboratório de Botânica coordenado de Prof.<sup>a</sup> Andreia Gomes da Universidade Federal de Itajubá/MG em especial as biólogas Elaine e Tânia.

Obrigada à toda equipe do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Prof. Ernani Pinto. Obrigada em especial a Kazumi que me ajudou no processo de quantificação dos extratos e o Prof. Ernani pelo confiança e incentivo.

Obrigada a todos os amigos e colegas da turma do Memarh 2014 que participaram desse momento. Obrigada, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro durante a pesquisa.

## RESUMO

FERNANDES, K. A. Efeitos agudos e alterações morfológicas em larvas de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) expostas à extratos de cianobactérias produtora e não produtora de microcistina-LR. 2016. 63f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Itajubá, Minas Gerais. 2016.

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos agudos de extratos de duas cepas de *Microcystis aeruginosa*, produtora e não produtora de microcistina-LR (MC-LR) sobre larvas de *Astyanax altiparanae*. As cepas foram cultivadas em meio ASM-1 até crescimento exponencial máximo, sendo posteriormente centrifugadas e liofilizadas. A quantificação de MC-LR foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As larvas de *A. altiparanae* foram obtidas através de reprodução semi-natural realizada entre outubro e fevereiro (2015/2016). Os ensaios foram realizados em cinco repetições, com cinco casais de reprodutores diferentes. As larvas eclodidas foram expostas em tubos de ensaio de 10 mL contendo uma larva/mL nas concentrações de 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL de ambos os extratos, além do tratamento controle que foi mantido em água reconstituída, totalizando 50 larvas por concentração. Para os tratamentos da cepa produtora de MC-LR, as concentrações correspondentes MC-LR foram de 0,1 mg/mL (0,5 µg/mL), 0,2 mg/mL (1,0 µg/mL), 0,3 mg/mL (1,5 µg/mL), 0,4 mg/mL (2,0 µg/mL), 0,5 mg/mL (2,5 µg/mL). Os experimentos foram mantidos em estufa a 26°C e fotoperíodo de 12:12h com leituras em 24, 48, 72 e 96 horas. O cálculo da Concentração Letal (CL50) foi realizado por regressão não-linear. Os valores de CL50 por tempo de exposição foram, 0,40 mg/mL (24h), 0,32 mg/mL (48h), 0,27 mg/mL (72h) e 0,24 mg/mL (96h) para o extrato da cepa produtora de MC-LR e 0,42 mg/mL (24h), 0,37 mg/mL (48h), 0,33 mg/mL (72h) e 0,32 mg/mL (96h) para o extrato da cepa não produtora de MC-LR. Através da análise de variância foi possível constatar que não houve diferença significativa nos valores de CL50 entre os ensaios da cepa produtora e não produtora de MC-LR. A mortalidade de larvas foi avaliada por tempo de exposição e o período de 24 horas foi estatisticamente diferente dos demais, neste período foi registrado a maior taxa de mortalidade nos dois ensaios. Essa diferença foi confirmada nas concentrações 0,4 mg/mL e 0,5 mg/mL, sendo que em 96h essas duas concentrações representaram mais de 90% de mortalidade de larvas. Para as larvas sobreviventes nas concentrações de 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL e 0,3 mg/mL de ambos os extratos, foi analisado qualitativamente as alterações morfológicas como: edema na região pericardial, edema na região gastrointestinal, curvatura na cauda e alterações na coluna vertebral. No ensaio do extrato produtor de MC-LR, as anomalias edema na região do pericárdio (EPCR) e gastrointestinal (EGI) ocorreram em todas as concentrações e alterações na cauda (CC) foi menos expressiva, ocorrendo apenas na concentração 0,2 mg/mL. As alterações morfológicas registradas nas larvas do ensaio com extrato não produtor de MC-LR, foram, escoliose (ESC) e lordose (LOR) para todos os tratamentos, curvatura na cauda (CC) e edema na região do pericárdio apareceram apenas na concentração 0,3 mg/mL, este foi o único tratamento no qual as larvas apresentaram os cinco tipos de anomalias. Além da toxina MC-LR, outros compostos podem estar associados aos efeitos tóxicos observados nas larvas de *A. altiparanae*, como mostrado no ensaio com extratos da cepa não produtora de MC-LR.

**Palavras-chaves:** Malformações, Lambari-do-rabo-amarelo, embrio-larvais, microcistinas

## ABSTRACT

FERNANDES, K. A. Acute and morphological effects on larvae of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000 (Teleostei, Characidae) exposed to producing cyanobacterial extracts and non producing microcystin-LR. 2016. 62f. Thesis (MA) - University of Itajubá, Minas Gerais. 2016.

This study aimed to evaluate the acute effects of extracts from two strains of *Microcystis aeruginosa*, producing and non-producing microcystin-LR (MC-LR) on larvae of *Astyanax altiparanae*. Strains were grown in ASM-1 medium until maximum exponential growth, after being centrifuged and lyophilized. Quantification of MC-LR was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Larvae of *A.altiparanae* were obtained through semi-natural reproduction carried out between October and February (2015/2016). Assays were performed in five replicates of five couples of different players. The hatched larvae were exposed in 10 mL test tubes containing a larva / mL at concentrations of 0.1mg / mL, 0.2mg / mL, 0.3mg / mL, 0.4mg / mL 0, 5 mg / mL of both extracts, besides the control treatment that was kept in reconstituted water, totaling 50 larvae per concentration. For treatments of the producing strain MC-LR, the corresponding MC-LR concentrations were 0.1 mg/mL (0.5 µg/mL). 0.2 mg/mL (1.0 µg/mL). 0.3 mg/mL (1.5 µg/mL). 0.4 mg/mL (2.0 µg/mL). 0.5 mg/mL (2.5 µg/mL). The experiments were maintained in an oven at 26 ° C and a photoperiod of 12: 12h with readings 24, 48, 72 and 96 hours. The calculation of the lethal concentration (LC50) was performed by non-linear regression. The LC50 values with exposure time were 0.40 mg/mL (24), 0.32 mg/mL (48 h) 0.27 mg/mL (72h) and 0.24 mg/mL(96h) to extract producing strain MC-LR and 0.42 mg/mL(24), 0.37 mg/mL(48 h) 0.33 mg/mL(72h) and 0.32 mg/mL(96h) to extract strain not producing MC-LR. Through variance analysis it was found that there was no significant difference in LC50 values between tests of the production strain and not a producer of MC-LR. The mortality of larvae was evaluated by exposure time and the 24 hours was statistically different from the others, this period was recorded the highest mortality rate in the two tests. This difference was confirmed at concentrations of 0.4 mg/mL and 0.5 mg/mL, and 96h in these two concentrations accounted for over 90% mortality of larvae. For the surviving larvae at concentrations of 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL and 0.3 mg/mL of both extracts was possible to qualitatively analyze the morphological changes such as edema in the pericardial area, swelling of the gastrointestinal tract bending the tail and changes in the spine. In the trial of MC-LR producer extract, anomalies edema in pericardium region (EPCR) and gastrointestinal (EGI) occurred at all concentrations and a change in the tail (CC) was less frequent, occurring only in the concentration 0.2 mg/mL. Morphological changes recorded in the larvae of the test with extract not producer of MC-LR, were scoliosis (ESC) and lordosis (LOR) for all treatments, bend the tail (CC) and swelling of the pericardium region appeared only in the concentration 0.3 mg/mL, this was the only treatment in which the larvae had five types of anomalies. In the MC-LR toxin, other compounds can be linked to the toxic effects observed in larvae of *A. altiparanae*, as shown in the assay with extracts of non-producing strain MC-LR.

**Key words:** Malformations, yellow tetra, embryo-larval, microcystins

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estrutura Geral das microcistinas .....	16
<b>Figura 2</b> Cultivos das cepas de <i>Microcystis aeruginosa</i> produtora e não produtora de microcistina-LR.....	23
<b>Figura 4</b> Exemplar da espécie <i>Astyanax altiparanae</i> .....	26
<b>Figura 5</b> - Preparo das soluções estoque para uso nos ensaios de exposição aguda a partir dos extratos liofilizados da cepa produtora de MC-LR (MIRS-04) e não produtora (NPCD-1)....	28
<b>Figura 6</b> - Preparo das concentrações para uso nos ensaios de exposição aguda de larvas de <i>A. altiparanae</i> a partir dos extratos da cepa produtora de MC-LR (MIRS-04) e não produtora (NPCD-1) de microcistina- LR.....	28
<b>Figura 7</b> Curva concentração-resposta (CL50) das larvas de <i>A. altiparanae</i> expostas às diferentes concentrações de células da cepa de cianobactéria produtora de MC-LR (MIRS-04) em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. ....	33
<b>Figura 8</b> Curva concentração-resposta (CL50) das larvas de <i>A. altiparanae</i> expostas às diferentes concentrações de células da cepa de cianobactéria não produtora de MC-LR (NPCD-01) em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. ....	34
<b>Figura 9</b> Variação dos valores de mortalidade das larvas de <i>A. altiparanae</i> expostas as diferentes concentrações celulares das cepas não produtora de MC-LR (A) e produtora de MC-LR (B).....	35
<b>Figura 10</b> Variação dos valores de mortalidade das larvas por tempo de exposição da cepa não produtora de MC-LR (A) e produtora de MC-LR (B) em 24, 48, 72 e 96 horas .....	36
<b>Figura 11</b> Larvas do tratamento controle.....	39
<b>Figura 12</b> Ilustração das alterações morfológicas* em larvas de <i>Astyanax altiparanae</i> resultante da exposição (96h) aos extratos das cepas produtora e não produtora de MC-LR.	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Valores de Concentração Letal (CL50) e intervalos de confiança obtidos para larvas de <i>A. altiparanae</i> expostas aos extratos cepa produtora e não produtora de MC-LR, em diferentes tempos de exposição. ....	31
<b>Tabela 2</b> Resultado do Teste de Tukey (Q) para avaliar as diferenças de CL50 dos dois ensaios com os extratos das cepa produtora e não produtora de MC-LR entre os tempos de exposição. ....	31
<b>Tabela 3</b> Resultado do Teste de Tukey (Q) para avaliar as diferenças de mortalidade das larvas de <i>A. altiparanae</i> entre os tratamentos com extratos não produtores e produtor de MC-LR após 96 horas de exposição. ....	35
<b>Tabela 4</b> Resultado do Teste de Tukey (Q) para avaliar a diferença de mortalidade das larvas de <i>A. altiparanae</i> por tempo de exposição dentro os tratamentos com extrato não produtor e produtor de MC-LR. ....	36
<b>Tabela 5</b> Presença das alterações morfológicas observadas nas larvas de <i>A. altiparanae</i> expostas aos extratos da cepa produtora e não produtora de MC-LR. ....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 Objetivo geral .....	14
2.2 Objetivos específicos .....	14
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
3.1 Cianobactérias e cianotoxinas.....	15
3.2 Microcistinas e efeitos em peixes .....	17
3.3 Ensaio ecotoxicológicos.....	19
3.4 <i>Astyanax altiparanae</i> (Lambari-do-rabo-amarelo).....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
<b>4.1 Cultivos das cepas de cianobactérias produtora e não produtora de microcistina-LR (MC-LR)</b> .....	23
4.2 Extração e Quantificação de MC-LR nos extratos celulares .....	24
4.3 Aquisição e manutenção dos espécimes de <i>Astyanax altiparanae</i> .....	25
4.4 Reprodução semi-natural de <i>Astyanax altiparanae</i> .....	26
4.5 Bioensaio .....	27
4.5.1 Preparo das concentrações de extrato celular aquoso da cepa produtora de MC-LR e não MC-LR .....	27
4.6 Ensaio de toxicidade aguda com as larvas de <i>Astyanax altiparanae</i> .....	28
4.7 Alterações morfológicas .....	29
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
5.1 Análise da toxicidade aguda (CL50).....	30
5.2 Alterações morfológicas ocorridas em larvas de <i>Astyanax altiparanae</i> expostas aos extratos produtores e não produtores de MC-LR.....	37
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e urbano desencadeia vários impactos ambientais, principalmente nos ecossistemas aquáticos. Após a revolução industrial a exploração dos recursos naturais foi intensificada, devido a necessidade de ocupação e transformação do espaço terrestre pelo homem associados aos cursos d'água. Com isso, problemas decorrentes da poluição dos corpos hídricos tornaram-se recorrentes, devido a falta de planejamento urbano, alta demanda de água para abastecimento, além dos contaminantes frequentemente lançados nos recursos hídricos em prol do desenvolvimento econômico e social (TUCCI, 2008).

A poluição da água se caracteriza por qualquer mudança física, química ou biológica, podendo resultar em alterações na cor, no sabor ou no odor, desencadeando efeitos adversos para os seres humanos e para a biota aquática. Como consequência da poluição, o ambiente aquático acaba comportando altas concentrações de nitrogênio e fósforo. O aumento desses elementos caracteriza o processo da eutrofização, que ocorre comumente em águas continentais (ESTEVES, 2011). Este processo proporciona o aumento da produtividade primária fomentando o crescimento excessivo de plantas aquáticas e florações de algas, principalmente cianobactérias as quais podem produzir toxinas (CALIJURI; SANTOS; ALVES, 2006).

Algumas atividades de origem antrópicas contribuem para que ocorra este fenômeno, atividades agrícolas, pelo uso intensivo de fertilizantes químicos, nitrogenados e fosfatados que são lixiviados para os rios, lagos e zonas costeiras. O despejo *in natura* de efluentes agrícolas, industriais e urbanos, apontados como principais fontes de degradação dos ecossistemas aquáticos. No entanto, nas últimas décadas, outras atividades vêm se destacando pela exploração dos recursos hídricos e merecem ser analisadas nesse âmbito.

A piscicultura, uma das especialidades da aquicultura, é uma atividade milenar que consiste em cultivar peixes. Essa atividade cresceu substancialmente nas últimas décadas em todo planeta, devido ao declínio da pesca extrativista e pelo aumento na demanda por pescado (ARANA, 2004, FAO, 2015). Contudo, certas práticas adotadas dentro piscicultura tem gerado problemas que comprometem a qualidade da água e conseqüentemente os organismos que são cultivados neste sistema.

Os tanques de criação de peixes são geralmente caracterizados por altas concentrações de nutrientes, que podem estar associados às técnicas de fertilização empregadas (MACEDO; SIPAUBA-TAVARES, 2010). Estas técnicas são importantes sob o ponto de vista econômico

por possibilitar o aumento da biomassa dos peixes, mas quando mal administradas podem comprometer a qualidade da água e dos peixes cultivados (SANTOS; BRACARENSE, 2008). O enriquecimento artificial desses ambientes, resultante do excesso de ração, fertilizantes, medicamentos, entre outros produtos usados para aumentar a produção de peixe também pode conduzir à eutrofização e conseqüentemente florações de cianobactérias (BUFORD, 1997; ARANA, 2004). Esta atividade é e será indubitavelmente impactante aos corpos hídricos devido às alterações no estado trófico das águas necessárias para seu desenvolvimento.

Um dos maiores problemas referente a florações de cianobactérias diz respeito a produção de toxinas e alterações nos parâmetros físico-químicos da água. Entre essas toxinas identificada a partir de florações de cianobactérias, as microcistinas (MCs) são as mais reportadas (DOMINGOS et al., 1999; CATHERINE et al., 2013; PAPADIMITRIOU et al., 2013; GURBUZ et al., 2016). As MCs são produzidas principalmente por espécies de *Microcystis* sp. e são conhecidas pelo o efeito hepatotóxico, causando intoxicação parcial podendo resultar em mortes. Além de ser alvo de preocupação constante, pois já foi encontrada em tanques de piscicultura no Brasil (PANOSSO et al., 2007). Diante desse fato, torna-se cada mais necessário monitorar ambientes de cultivo de peixes, assim como de outros organismos aquáticos que são comercializados.

Neste sentido, a qualidade da água se torna a principal variável a ser analisada nestes sistemas, considerando ainda que, existe populações tradicionais que sobrevive da pesca. Os peixes, por estarem confinados em tanques de cultivo, ficam mais vulneráveis a sofrerem algum tipo de intoxicação, podendo acumular poluentes ou cianotoxinas circundante na água, e transferi-los via cadeia trófica. As conseqüências dessa exposição podem resultar em morte precoce desses organismos ou danos físicos e fisiológicos, decorrentes da bioacumulação e assim, acarretar prejuízos econômicos e impor riscos à saúde pública.

No presente estudo, a espécie *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (lambari–do–rabo–amarelo) foi selecionado como organismo modelo, por ser uma espécie nativa da região Neotropical de fácil cultivo e manuseio em laboratório. O gênero *Astyanax* se encontra amplamente distribuído nos rios da América Latina e possui importância ecológica e econômica (LIMA et al., 2003). As espécies desse gênero são importantes fonte de alimento para várias espécies de peixes carnívoros (AGOSTINHO; GOMES, 1997), além de serem apreciados como petisco pela população humana.

Essas características merecem ser avaliadas do ponto de vista ambiental, visando criar subsídios para utilização do Lambari como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos, uma vez que a maioria dos testes de monitoramento ambiental realizados no Brasil são com

espécies exóticas, como por exemplo o *Danio rerio* Hamilton, 1822 (OECD, 2013). Portanto, este estudo se propôs avaliar os efeitos de cepas de cianobactérias da espécie *Microcystis aeruginosa* em larvas de *A. altiparanae*, afim de entender as consequências dessa exposição para peixes e outros organismos aquáticos em fase de desenvolvimento inicial.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos agudos de extratos de cepas de cianobactérias *M. aeruginosa* produtora e não produtora de MC-LR em larvas de *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae).

### 2.2 Objetivos específicos

- Calcular a Concentração Letal (CL50) para larvas expostas em concentrações celulares de extratos de cianobactérias produtora e não produtora de MC-LR durante 24, 48, 72 e 96 horas de exposição;
- Comparar as diferenças entre os valores de CL50 obtidos por tempos de exposição nos ensaios com cepa produtora e cepa não produtora de MC-LR;
- Analisar a mortalidade das larvas *A. altiparanae* entre as concentrações dos tratamentos com extratos da cepa produtora e não produtora de MC-LR;
- Avaliar a diferença de mortalidade das larvas *A. altiparanae* por tempo de exposição aos extratos da cepa produtora e não produtora de MC-LR;
- Analisar qualitativamente as alterações morfológicas causadas pelas diferentes concentrações de extratos das cepas produtora e não produtora MC-LR sobre as larvas de *A. altiparanae* após 96 horas de exposição.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Cianobactérias e cianotoxinas

As cianobactérias, descritas como algas azuis ou verde-azuladas, são microrganismos procariotos fotossintetizantes pertencentes ao domínio Bacteria capazes de habitar diversos ambientes, dentre estes os dulcícolas, salobros, marinhos e terrestres (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989). Não só a diversidade de habitats, mas também a diversidade morfológica é uma característica marcante deste grupo. Pois são microrganismos encontrados tanto nas formas unicelulares como em coloniais ou filamentosas e suas células variam de tamanho dependendo da espécie. As formas unicelulares são observadas nas espécies de *Chroococcus*, enquanto que espécies de *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* são filamentosas (CALIJURI; SANTOS; ALVES, 2006). Outra característica que pode ser observada na morfologia desses organismos é a ocorrência individual (*e.g.* espécies de *Synechococcus* e *Aphanothece*), agrupadas em colônias ou ainda serem observadas em pequenos agrupamentos envolvidos por mucilagem (*e.g.* espécies de *Microcystis*, *Gomphospheria* e *Merismopedia*) (CALIJURI; SANTOS; ALVES, 2006).

Por serem produtores primários de matéria orgânica e fixadores de nitrogênio atmosférico, as cianobactérias possuem alta relevância no contexto ecológico dos sistemas aquáticos (HOWARTH et al., 1988). Por ocuparem esse nicho é que são favorecidas pelo aumento de nutrientes dos corpos d'água, quando formam florações. O principal problema dos “blooms” ou florações de cianobactérias é que pode resultar na produção de cianotoxinas (REYNOLDS et al., 1981; CALIJURI; SANTOS; ALVES, 2006; O'NEIL et al., 2012; DESCY et al., 2016).

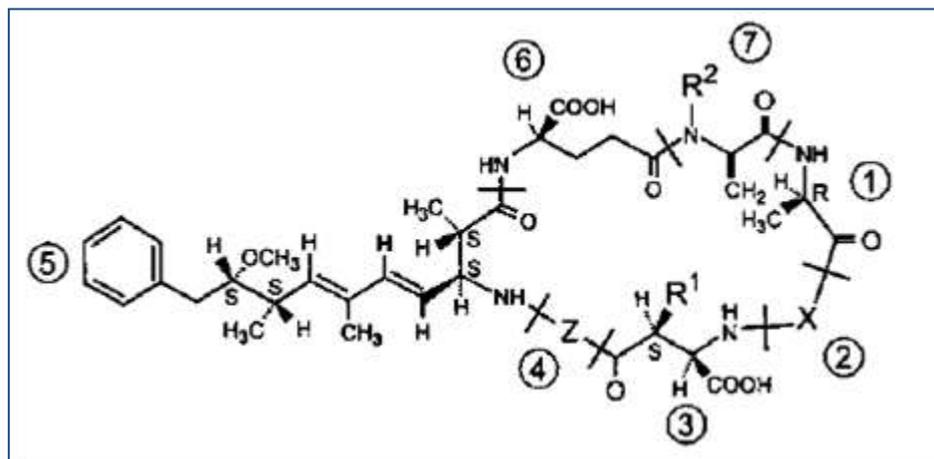
As cianotoxinas constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com diferentes propriedades toxicológicas (CHORUS, 2001). A maioria delas são endotoxinas, ou seja, liberam a toxina para o meio externo após o rompimento da parede celular, ou sob a ação de algicidas, como o sulfato de cobre (CHORUS, 2001). Além disso, possuem estruturas químicas distintas, compreendendo peptídeos, compostos heterocíclicos (alcalóides) ou compostos lipídicos (SIVONEN; JONES, 1999). Os lipopolissacárideos das cianotoxinas integram a parede celular de todos esses organismos, podendo ser classificados de acordo com ação farmacológica como hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas (SINGH; DHAR, 2013; DURAI; BATOOL; CHOI, 2015). As cianotoxinas provocam vários impactos ambientais, tais como: mortandade de peixes, efeitos adversos à saúde humana, além de

contribuir para a perda de biodiversidade nos ecossistemas aquáticos (PERETYATKO et al. 2012). Os casos mais recorrentes de intoxicação envolvendo cianobactérias estão relacionados com as microcistinas (MCs).

As MCs são um grupo de heptapéptido monocíclico, contendo sete aminoácidos (D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha), sendo os mais numerosos das cianotoxinas compreendendo mais de 85 análogos (CHORUS; BARTRAM, 1999). Estes sete aminoácidos estão envolvidos por dois ácidos L-amino, três ácidos comuns, D-aminoácidos ou seus derivados, mais dois D-aminoácidos. Estes dois D-aminoácidos são: 3S-amino-9S-metoxi-2,6,8S-trimetil-10-ácido-fenildeca-4,6-dienóico (Adda) e N-metildeidroalanina (MDHA) (CHORUS, 2001).

Os sete aminoácidos são numerados com porções variáveis mostradas como X, Z, R1 e R2, as s posições de X e Z representam os aminoácidos das variantes de MCs (Figura 1) (BUTLER et al., 2009). As variações estruturais mais frequentes nas moléculas de MCs ocorrem nas posições dois e quatro, resultados de substituições de L-Aminoácidos e desmetilações de resíduos nas posições três e sete (MERILUOTO, 1997). A classificação das variantes segue a combinação de letras que representam suas variações, contendo leucina e arginina (LR) ou tirosina e metionina (YM), com microcistina contendo L-arginina ambas nas posições X e Y (RR) (SIVONEN; JONES, 1999).

**Figura 1** Estrutura Geral das microcistinas



Os números de 1 a 7, indicam a posição dos aminoácidos variantes (BUTLER et al., 2009).

Este grupo de MCs também é conhecido pela extensa informação toxicológica disponível, sendo MC-LR a mais abordada nos casos de intoxicação (FALCONER, 2005). Em seres humanos a intoxicação por MCs pode ser caracterizada por mal estar, vômitos, cefaleia, gastroenterite, além de danos aos hepatócitos, com conseqüente hemorragia intra-hepática,

choque hipovolêmico e hepatomegalia, podendo levar a morte (CHORUS; BARTRAM, 1999; DROBAC et al., 2013).

O caso de intoxicação mais grave envolvendo seres humanos ocorreu em 1996 em Caruaru, Pernambuco/Brasil, onde pacientes que faziam tratamento em uma clínica de hemodiálise, apresentaram distúrbios visuais, náuseas, vômitos, fraqueza muscular e insuficiência hepática aguda, após o tratamento, levando à morte de 60 pacientes (AZEVEDO, 1996). A morte dos doentes renais foi provocada por MC- LR que estavam presente na água utilizada no tratamento. Este evento ficou conhecido como “Tragédia de Caruaru” (AZEVEDO et al., 2002).

As cianobactérias potencialmente tóxicas estão amplamente distribuídas no Brasil e são representadas por 32 espécies pertencentes às ordens Choococales (12 espécies), Oscillatoriales (10 espécies) e Nostocales (10 espécies) (SANT’ANNA et al., 2008). Dentro dessa diversidade, as pertencentes aos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* e *Oscillatoria* são as que realmente preocupam devido grau de toxicidade (SKULBERG et al., 1993, GOMES et al., 2009). Contudo, o gênero *Microcystis* e a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* são as de maior ocorrência no país, sendo também produtoras em potencial das toxinas MCs e saxitoxinas (STXs), respectivamente (AZEVEDO et al., 1994; DOMINGOS et al., 1999; COSTA et al., 2006; SANT’ANNA et al., 2008).

### 3.2 Microcistinas e efeitos em peixes

As MCs foram identificadas a partir do isolamento de *Microcystis aeruginosa* através de bioensaios com células de cianobactérias, causadoras de sérios danos ao fígado de ratos testados em laboratório (BISHOP et al., 1959). Posteriormente outros estudos mostraram a ocorrência de outros gêneros de cianobactérias produtores de MCs, como *Planktothrix*, *Anabaena* e *Nostoc* (WHO, 1998). Dentro do grupo das hepatotoxinas, as MCs são geograficamente predominantes e frequentemente encontradas em ambientes de água doce (CHORUS; BARTRAM, 1999; HUMBERT et al., 2013; MARMEN et al., 2016).

As MCs tem feito hepatotóxico, tendo como órgão alvo o fígado de vertebrados, podem promover a desorganização dos microfilamentos de actina que compõe parte do citoesqueleto, levando a uma densa agregação dos microfilamentos para o centro da célula, resultando na perda do suporte celular (RUNNEGAR et al., 1987). Por serem moléculas hidrofílicas e com

pouca capacidade para ultrapassar as membranas lipídicas, tornam-se potentes inibidoras das proteínas fosfatases P1A e P2A, quando captadas pelas células deste órgão (RUNNEGAR et al., 1995).

As MCs são solúveis em água, metanol e etanol, resistentes a hidrólise química ou oxidação em pH neutro e bastante estáveis à luz natural. Embora sejam estáveis quimicamente, sua degradação microbiana pode ser um processo rápido e, sua degradação fotoquímica também já foi relatada (TSUJI et al., 1994; WELKER; STEINBERG, 1999). Entretanto a degradação fotoquímica é de menor relevância, pois geralmente os corpos d'água com elevadas concentrações de MCs são eutróficos, apresentando portanto uma maior turbidez, o que dificulta a penetração da luz.

A maioria dos organismos pode entrar em contato com as células ou mesmo com as toxinas de cianobactérias. A intoxicação de peixes por MCs, por exemplo, se dá a partir da concentração de alguns microgramas por litro ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), por meio da ingestão acidental de células ou de organismos que se alimentaram delas (TENCALLA et al., 1994; TENCALLA; DIETRICH, 1997; FISCHER; DIETRICH, 2000; PAVAGADHI; GONG; BALASUBRAMANIAN, 2013). Uma vez absorvidas pelos peixes, desencadeiam processos de perturbação da atividade celular inibindo a ação de proteínas fosfatases (P1A e P2A) (TENCALLA; DIETRICH, 1997; BOARU et al., 2006).

As proteínas fosfatases P1A e P2A são essenciais no desenvolvimento embrionário dos peixes, pois regulam os processos importantes no seu desenvolvimento (GÖTZ et al., 2000). Os peixes em geral possuem pouca capacidade de desintoxicação de MCs, podendo acumular concentrações elevadas e provocar efeitos tóxicos no seu organismo (MOHAMED; HUSSEIN, 2006; LI; GATLIN, 2007). A exposição de organismos aquáticos às MCs aumenta a probabilidade de acumulação de toxinas na cadeia trófica aquática (MOHAMED; CARMICHAEL; HUSSEIN, 2003; PAVAGADHI; BALASUBRAMANIAN, 2013).

Nos bioensaios de exposição aguda, os efeitos tóxicos das MCs podem resultar na morte súbita, enquanto testes de exposição crônica podem resultar no estresse prolongado desses organismos, pelas alterações em níveis bioquímicos e metabólicos. Peixes que receberam doses de cianotoxinas por injeção intraperitoneal ou por alimento contaminado desenvolveram sintomas de intoxicação semelhantes aos dos mamíferos em experimentação laboratorial (PAVAGADHI; GONG; BALASUBRAMANIAN, 2013).

A partir de testes laboratoriais com peixes foi possível estudar e avaliar a toxicidade de MCs em fases distintas do ciclo de vida desses organismos. O contato com MCs por meio da ingestão, absorção branqueal e injeção intraperitoneal permitiram avaliarem os efeitos tóxicos,

como, hepatotóxicidade e letalidade, observado em espécies de Truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) e embriões do peixe Medaka (*Latipes oryzias*) TENCALLA et al. (1994; JACQUET et al., 2004). Outros efeitos, como, redução na taxa de sobrevivência, atraso no crescimento, malformações, diminuição dos níveis hormonais, efeitos teratogênicos e interferências nas distribuições de algumas proteínas, foram observados em embriões de Zebrafish (*Danio rerio*) expostos a MC-LR (WANG et al., 2005; CAZENAVE et al., 2005; XIE et al. 2015). Segundo Malbrouck e Kestemont (2006) os estágios iniciais de vida de espécies de peixes são os mais sensíveis à exposição de MCs comparados aos peixes adultos, devida à fina camada epitelial.

Estudos *in situ* também tem relatado a intoxicação de peixes por MCs em lagos artificiais com relatos de florações de cianobactérias, sendo detectada MCs no organismo detes animais. Em um estudo realizado no Lago artificial Karla na Grécia, foram encontradas quantidades consideráveis de MCs no fígado, rins, cérebro, intestino e músculos, de espécimes *Cyprinus carpio* que eram cultivadas neste local (PAPADIMITRIOU et al., 2013). Assim como, na Lagoa Jacarepaguá localizado em sudeste do Brasil, foram detectado MC nas gônadas, no fígado e na bÍlis de espécies de Tilápia (*Oreochromis ssp.*) cultivadas nesta Lagoa (HAUSER-DAVIS et al., 2015). Em outro estudo, também envolvendo peixes cultivados em lagos artificiais, neste caso no Lago Eđirdir da na Turquia detectadaram MCs no fígado e músculo de duas espécies de peixes (GURBUZ et al., 2016).

Através de vários estudos sobre intoxicação por MCs, pesquisas envolvendo peixes tem sido abordada com maior frequência na literatura. Isso porque esses organismos estão em contato direto com a água e ocupam diferentes níveis da cadeia trÓfica, sendo, portanto, afetados diretamente por diversos contaminantes (KOPP; HETESA, 2000; ZURAWELL et al., 2005; MITSOURA et al., 2013).

### **3.3 Ensaio ecotoxicológicos**

A ecotoxicologia é um ramo da ciência que estuda os efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre populações e comunidades que integram um ecossistema (KENDALL et al., 2001). A maioria dos agentes tÓxicos e substâncias químicas que são lançados no ambiente são de origem antrópica. O grupo de poluentes mais encontrado no ambiente pertence aos agrotÓxicos (herbicidas, inseticidas e fungicidas), íons inorgânicos (metais), solventes orgânicos, substâncias radioativas, produtos farmacêuticos entre outros (CONNELL et al., 2009). Devido a diversidade e complexidade desses poluentes e a interação

com os fatores bióticos e abióticos sobre a resposta a estes compostos, viu-se necessária a integração com outras disciplinas de forma a expandir o conhecimento da Ecotoxicologia.

Neste âmbito, a Ecotoxicologia Aquática avalia os efeitos adversos de substâncias químicas em organismos representativos do ecossistema aquáticos (CONNELL et al. 2009). Neste sentido, a realização de testes para investigar o efeito tóxico de diversos contaminantes presentes no ambiente na biota aquática é de suma importância em programas de biomonitoramento, pois estes, sofrem direta e indiretamente com contaminação, através de descargas de efluentes industriais e domésticos ou contaminantes advindos do ar e do solo (COSTA et al., 2008). Portanto, o uso de ensaios de toxicidade estima o grau de impacto que um determinado poluente pode causar no corpo receptor através de experimentos laboratoriais ou *in situ*.

Para avaliar os efeitos tóxicos contidos na coluna d'água são utilizados organismos aquáticos pertencentes a diferentes níveis tróficos, como: os produtores (algas), consumidores primários (microcrustáceos), consumidores secundários (peixes) e decompositores (bactérias) (RIBO, 1997).

A toxicidade dos poluentes varia em função do tempo de exposição e de suas concentrações, sendo dividida em efeitos agudos e crônicos. Nos ensaios de exposição aguda, os organismos são expostos por um curto período de tempo (24 a 48h para Cladoceras, e 96h para peixes) em no mínimo cinco concentrações do contaminante, além do tratamento controle (somente água de diluição). Os valores são expressos em CL50 ou CE50 (Concentração letal ou efetiva a 50% da população), juntamente com os seus respectivos limites inferiores e superiores. Portanto, os valores de CL50 ou CE50, referem-se a um intervalo, que podem ser determinados por vários métodos estatísticos (COSTA et al., 2008). Em geral, os métodos de análises estatísticas resultam em dados transformados em uma curva dose-resposta, a partir de uma função matemática conhecida ou esperada antes dos valores de CL50 e CE50 serem estimados (ABNT, 2016).

Nos ensaios de exposição crônica são utilizadas cinco concentrações, sendo estas inferiores aos valores de CL50, além do tratamento controle por um tempo de exposição prolongado. Este tempo varia bastante dependendo do ciclo de vida de cada organismo-teste, que normalmente situa-se em pelo menos 1/3 do ciclo de vida da espécie. Os resultados dos ensaios crônicos são expressos como CENO (Maior Concentração testada de Efeito não Observado), CEO (Menor Concentração testada de Efeito Observado) e o Valor Crônico (VC), que é a média aritmética entre o CENO e CEO (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os valores numéricos de efeito agudo ou crônico, expressos como CL50, CE50, CENO, CEO e VC, exprimem uma relação inversa à toxicidade, ou seja, quanto menor o valor numérico mais tóxico (ABNT, 2016). Os testes ecotoxicológicos podem ser realizados com organismos aquáticos ou terrestres seguindo um protocolo elaborado conforme vários critérios, tais como organismos de ampla distribuição geográfica, de fácil cultivo/manutenção em laboratório, de grande relevância ecológica, alta sensibilidade a várias substâncias, estabilidade genética (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Diversos órgãos de proteção ambiental desenvolveram protocolos com diversos organismos para uso com amostras de água, sedimento, efluentes domésticos e industriais etc. Dentre estes órgãos destacam-se *Environmental Protection Agency* (USEPA/EUA), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) e *International Organization for Standardization* (ISO). No Brasil, o órgão responsável pelo desenvolvimento de tais protocolos é a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (COSTA et al., 2008).

### **3.4 *Astyanax altiparanae* (Lambari-do-rabo-amarelo)**

O gênero *Astyanax* é o gênero mais comum e diversificado da família Characidae, sendo bastante representativo na região neotropical. Este gênero agrupa várias espécies, das quais muitas estão presentes nas bacias hidrográficas brasileiras (GARUTTI; BRITISKI 2000).

Garutti (1995) fez uma revisão sistemática e filogenética de algumas espécies do gênero *Astyanax* (Osteichthyes, Characidae), englobando exemplares das bacias dos rios Paraná, São Francisco e da Amazônica. Como resultado desta revisão taxonômica do grupo *Astyanax bimaculatus* Linnaeus (1758), uma nova espécie foi classificada como, *Astyanax altiparanae* (GARUTTI; BRITISKI, 2000).

O nome popular dessa espécie varia conforme a região sendo reconhecida como “tambiu”, “piaba”, “piabinha”, “lambari-do-rabo-amarelo”. Este organismo possui um tamanho médio de 10 a 15 cm de comprimento podendo pesar até 60 gramas aproximadamente. O seu hábito alimentar é predominantemente onívoro e possui facilidade de adaptação a vários ambientes como, por exemplo, lagoas, pequenos riachos e grandes rios (NAKATANI et al., 2001, GARUTTI; BRITISKI, 2000; PORTO-FORESTI et al., 2005).

As fêmeas dessa espécie são facilmente distinguidas dos machos por possuírem corpo maior e mais arredondadas comparadas aos machos, e sua primeira maturação sexual ocorre

próximo de 69 mm de comprimento total (CT), além destas diferenças, os machos possuem uma espicula na nadadeira anal (NAKATANI et al., 2001; PORTO-FORESTI et al., 2005; SATO et al., 2006; CASTILHO-ALMEIDA, 2007)

A reprodução é sexuada com fecundação externa e a desova é intermitente. Estes organismos realizam pequenas migrações e apresentam cuidado com a prole e com os ovos. O diâmetro médio dos ovócitos maduros é de 0,77mm e os ovos recém-fecundados apresentam diâmetro médio de 0,90mm. A diferenciação do embrião inicia-se cerca de 8 horas após a fecundação (fase de somitogênese) e as larvas eclodem 24 horas após a fecundação, à uma temperatura de 26,0°C aproximadamente, medindo cerca de 2,15mm comprimento padrão (CP) (AGOSTINHO et al., 1999; NAKATANI et al., 2001).

Alguns fatores ambientais podem influenciar o período reprodutivo das espécies de peixes (VAZZOLER, 1996). Em espécimes de *A. altiparane* mudanças na temperatura e no índice pluviométrico podem ser fatores determinantes no período reprodutivo que normalmente começa em setembro podendo se estender até março (NAKATANI et al., 2001)

Esses aspectos facilitam a perpetuação da espécie em ambientes diversificados, incluindo ambientes confinados e com espaço limitado como os de laboratório. Por estes e outros motivos algumas espécies do gênero *Astyanax* tem chamado atenção por parte de alguns pesquisadores para estudos diversos, tendo este organismo como modelo experimental (MORELLI et al., 1983; CIPRIANO et al., 2004; CASTILHO-ALMEIDA, 2007; RAMSDORF, 2007; SILVA; PIRES JUNIOR; GRISOLIA, 2010; PEREIRA-SANTOS, 2014; YASUI et al., 2015, STEVANATO, 2016). L

Além disso, para estudos de biomonitoramento e ensaios ecotoxicológicos, o lambari se torna um organismo promissor por se mostrar sensível às alterações ambientais e por ser bastante exigente quanto ao teor de oxigênio dissolvido (SANCHES, 2014). Adicionalmente, espécies do gênero *Astyanax* são bastante interessantes sob ponto de vista econômico, para a aquicultura e indústria de enlatados (DUTRA et al., 2012).

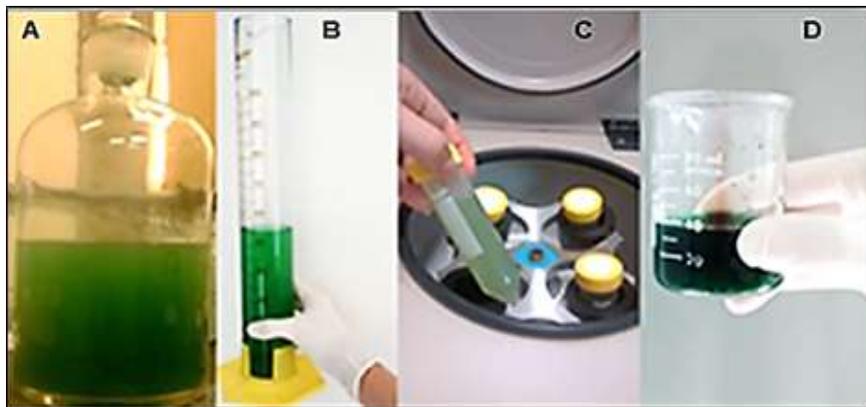
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultivos das cepas de cianobactérias produtora e não produtora de microcistina-LR (MC-LR).

As cepas de *M. aeruginosa* Kützing (1846) produtora (MIRS-04) e não produtora (NPDC-01) de MC-LR foram isoladas de ambientes naturais. A NPCD-01 foi isolada de um afluente do complexo lagunar de Jacarepaguá localizado no bairro da Cidade de Deus, Rio de Janeiro, e a, MIRS-04 foi isolada do Reservatório de Samuel localizado em Rondônia. Estas cepas foram adquiridas do banco de cultura de microalgas e cianobactérias do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias - LECT, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-IBCCF/UFRJ. No Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal de Itajubá-UNIFEI/MG, os cultivos foram mantidos em mariotes com capacidade de 10L por 15 a 20 dias em meio ASM-1 (GORHAM et al., 1964). Para proporcionar o crescimento exponencial máximo, os cultivos foram mantidos sob as seguintes condições: pH entre 7,5 e 8,0; temperatura de 20 à 24°C; intensidade luminosa de 40  $\mu\text{mol.fotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  medida com auxílio de Luxímetro (LM 8000 Digital Instruments); fotoperíodo de 12 horas e aeração contínua.

Após ter alcançado o crescimento exponencial máximo, as culturas foram interrompidas e centrifugadas a 3.500 rpm por 20 minutos (Figura 2). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a biomassa concentrada foi congelada a 20°C para posterior processo de liofilização (Figura 3).

**Figura 2** Cultivos das cepas de *Microcystis aeruginosa* produtora e não produtora de microcistina-LR



Cultivo em frasco Mariotte (A), medição do volume dos cultivos (B), centrifugação (C) e concentrado celular (D). Fonte: O autor

**Figura 3** Processo de liofilização

Liofilização (A), pesagem do resultante da biomassa liofilizada (B)

Fonte: O autor

As amostras liofilizadas foram pesadas e transferidas para pequenos frascos âmbar e armazenadas em freezer para posterior quantificação da concentração de MC-LR contida no extrato da cepa produtora de MC-LR e certificar a ausência de MC-LR no extrato da cepa não produtora. A quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta precisão com detector Diode Array (HPLC-DAD) no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Instituto de Farmácia da Universidade de São Paulo (USP).

#### 4.2 Extração e quantificação de MC-LR nos extratos celulares

Foram pesadas amostras de aproximadamente 25mg dos extratos celulares seco/liofilizado e condicionadas em microtubos de plástico de 2 mL. Após a pesagem, adicionou-se 1,5 mL de metanol 90%. As amostras foram submetidas à uma sonda de ultrassom (Omni Sonic Ruptor 400 Ultrasonic Homogenizer - OMNI International, EUA) com intensidade de 30% durante um minuto para que ocorresse a lise celular.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm, 15° C, por 15 minutos e o sobrenadante retirado. Após três ciclos de repetições da extração, os sobrenadantes coletados foram secos sob nitrogênio e o extrato ressuspenso em 1 mL de metanol 50% e, por fim, filtrado em Membrana de Transferência de fluoreto de polivinilidene (PVDF) com poro de 0,45 µm para a análise cromatográfica. As amostras foram analisadas e quantificadas por

cromatografia líquida de alta precisão com detector Diode Array (HPLC-DAD, Shimadzu®) em coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 µm ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel, água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL/min. A análise foi conduzida em gradiente, seguindo metodologia descrita por Lawton et al. (1994).

Os cromatogramas gerados foram monitorados em  $\lambda_{\text{máx}}$  238 nm. Uma corrida com a mistura de MC-LR padrão foi realizada para auxiliar na detecção dessa cianotoxina pela comparação dos tempos de retenção e espectro no UV-VIS. A quantificação do extrato da cepa produtora de MC-LR foi identificada pela comparação entre os tempos de retenção com padrões analíticos de MC-LR (curvas de calibração) e quantificadas pela integração das áreas dos picos cromatográficos. O mesmo se fez para confirmar a ausência de MC-LR no extrato não produtor. A quantificação resultou o valor de 5µg/mL de MC-LR no extrato produtor e confirmou a ausência dessa toxina no extrato da cepa não produtora.

### **4.3 Aquisição e manutenção dos espécimes de *Astyanax altiparanae***

Durante a estação reprodutiva de *A. altiparanae* (Figura 4) entre os meses de outubro e fevereiro (2015/2016), os exemplares adultos desta espécie foram coletados na Cachoeira de Emas (21° 58'S, 47 ° 26 'W), no rio Mogi Guaçu, em Pirassununga, São Paulo e mantidos nos tanques de piscicultura do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais CEPTA/ICMBio. Os espécimes aptos à reprodução foram selecionados de acordo com os aspectos reprodutivos secundários, ou seja, fêmeas com ventre cheio/arredondado, papila urogenital inchada e avermelhada e os machos ativos para liberação de sêmen (WOYNAROVICH; HÓRVATH, 1983; PEREIRA-SANTOS, 2014).

Depois destas observações os reprodutores foram levados para o laboratório de Biotecnologia de Peixes do CEPTA. No laboratório, os peixes foram separados em lotes de dois machos para cada fêmea e colocados em aquários com capacidade de 20 litros. Os exemplares foram mantidos em água de torneira com adição de anti-cloro. Os mesmos foram mantidos a uma temperatura de  $\pm 26^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12h e oxigênio dissolvido de 7,7 e 8,0 mg/L. Após a captura, os organismos permaneceram em repouso por 6 horas antes das induções hormonais

**Figura 3** Exemplar da espécie *Astyanax altiparanae*



Fonte: O autor

#### 4.4 Reprodução semi-natural de *Astyanax altiparanae*

Decorrido o período de aclimação dos peixes, foi preparada uma solução de hormônio OVOPEL<sup>®</sup> [(D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-Net) – mGnRH +metaclopramide] em uma concentração de 3mg kg<sup>-1</sup>. Para o reparo da solução hormonal, primeiro fez a pulverização do Ovipel, depois acrescentou-se soro fisiológico (NaCl/0,9%) fez-se a homogenização da solução para depois ser injetada nos reprodutores (WOYNAROVICH; HÓRVATH, 1983).

Os reprodutores foram retirados dos aquários e transferidos para recipientes com água e adição de anestésico Mentol (~100 mg/L<sup>-1</sup>, Êxodo Científica, Brasil). Após a ação anestésica, aplicou-se uma dose/mL da solução hormonal por quilograma peixe, a injeção foi administrada intraperitoneal próxima à base da nadadeira ventral, com seringas graduadas de 1 ml (HARVEY; CAROLSFELD, 1993; WOYNAROVICH; HÓRVATH, 1983). Depois os peixes foram devolvidos para os aquários e aguardou-se o tempo para a desova. Estes procedimentos foram adotados a fim de assegurar o bem-estar do animal.

Percorridas aproximadamente seis horas após a indução hormonal, os peixes foram observados e avaliados de acordo com o comportamento de corte. Antes de acontecer à desova os peixes mantinham natação sincronizada de forma que seus corpos ficavam próximos e lateralmente alinhados, esses sinais eram evidências que a desova estava prestes a acontecer. Ocorrida à desova, todos os ovos foram recolhidos dos aquários com auxílio de pipetas e divididos em placas de Petri de vidro (100 mm de diâmetro) revestida com albumina bovina sérica (BSA/0,1%), para facilitar o manejo dos embriões devido à adesividade dos

ovos. Os embriões ficaram se desenvolvendo em meio estéril em água reconstituída (12 mM NaCl, 1mM KCL, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>).

Durante a fase do desenvolvimento embrionário, alguns procedimentos foram adotados para garantir o desenvolvimento dos embriões até a eclosão. Quando mortos, os embriões eram retirados de imediato para evitar a contaminação da água pela liberação de amônia e o meio Água reconstituída renovado pelo menos a cada duas horas para garantir a oxigenação da água com embriões. Passado essa fase, de desenvolvimento embrionário, as larvas eclodidas foram selecionadas para serem submetidas aos ensaios com os extratos das duas cepas de *M. aeruginosa*.

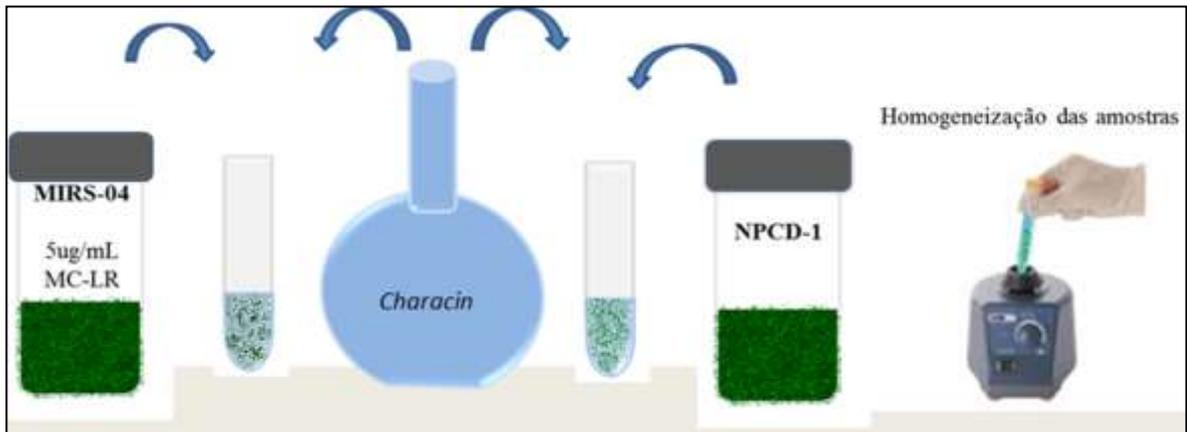
## 4.5 Bioensaio

### 4.5.1 Preparo das concentrações de extrato celular aquoso da cepa produtora de MC-LR e não MC-LR

Para a realização dos ensaios de toxicidade aguda foram utilizadas amostras de extratos liofilizados das cepas produtora de MC-LR (MIRS-04) e não produtora de MC-LR (NPCD-1). As concentrações utilizadas nos ensaios, foram preparadas a partir de soluções estoque com concentração celular de 20mg/mL para ambos os extratos e diluídas em meio *Água reconstituída*, essa concentração correspondeu a 100 µg/mL de MC-LR para a cepa produtora de MC-LR (Figura 5).

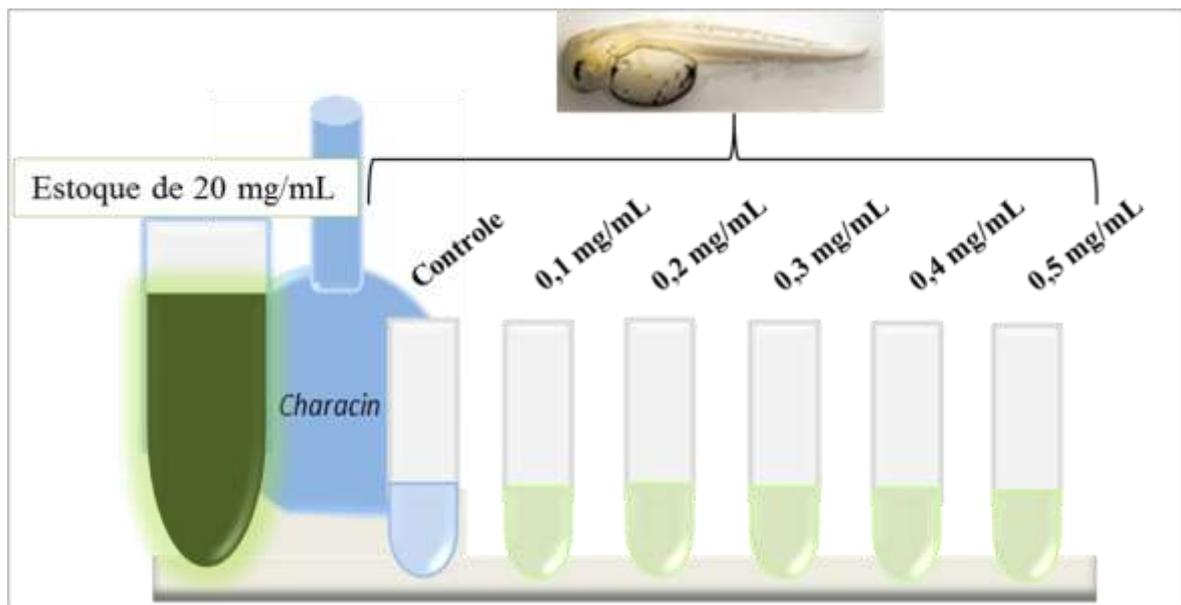
As concentrações testadas neste estudo foram baseadas inicialmente em valores de escala logaritmo e destas estabeleceu concentrações inferiores a 1mg/mL. Portanto as concentrações de 0,5 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,2 mg/mL e 0,1 mg/mL se tornaram fixas para todos os experimentos (Figura 6). Essas concentrações celulares corresponderam a 0,1µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2,0µg/mL e 2,5µg/mL de MC-LR.

**Figura 4** - Preparo das soluções estoque para uso nos ensaios de exposição aguda a partir dos extratos liofilizados da cepa produtora de MC-LR (MIRS-04) e não produtora (NPCD-1).



Fonte: O autor

**Figura 5** - Preparo das concentrações para uso nos ensaios de exposição aguda de larvas de *A. altiparanae* a partir dos extratos da cepa produtora de MC-LR (MIRS-04) e não produtora (NPCD-1) de microcistina- LR



Fonte: O autor

#### 4.6 Ensaio de toxicidade aguda com as larvas de *Astyanax altiparanae*

As larvas de *A. altiparanae* recém-eclodidas utilizadas nos ensaios foram compostas por cinco desovas diferentes, ou seja, cada repetição correspondia a uma reprodução com casais de peixe diferente (2 machos/fêmea). Este procedimento foi adotado com intuito de avaliar uma possível variabilidade genética, nas larvas expostas às condições idênticas com

extratos de *M. aeruginosa* (produtora de MC-LR e não produtora). Uma seleção das mesmas foi realizada, usando como parâmetro algumas características, como: corpo uniforme, motilidade, batimento cardíaco constante e saco vitelínico em condições normais (NAKATANI et al., 2001). Estes critérios foram adotados para garantir que possíveis alterações fossem consequência da exposição às substâncias (extratos) das cepas *M. aeruginosa* a qual as larvas estavam expostas e não resultados de má formação congênita.

As larvas foram então submetidas às cinco concentrações celulares dos extratos da cepa produtora de MC-LR e não produtora de MC-LR em tubos de ensaios com capacidade de 10 mL, numa proporção de uma larva/1mL em cinco réplicas, totalizando 50 larvas por concentração, incluindo o tratamento controle (somente em Água reconstituída).

Todos os tratamentos foram mantidos nas mesmas condições, em uma Estufa Incubadora para B.O.D (demanda bioquímica de oxigênio), com temperatura controlada de  $26 \pm 1$  ° C e fotoperíodo de 12 horas durante 4 dias (96h). As leituras do número de larvas sobreviventes e mortas foram realizadas dentro de 24, 48, 72 e 96 horas. A cada observação, larvas mortas eram retiradas e contadas. Durante estas observações, também foram anotadas as anormalidades aparentes nas larvas sobreviventes de todos os experimentos, para posterior análise morfológica.

#### **4.7 Alterações morfológicas**

Para avaliar as alterações morfológicas foram realizadas observações visuais, assim como registros fotográficos foram feitos aleatoriamente para um grupo de larvas sobreviventes após 96 horas de exposição. Com auxílio do estereomicroscópio (Nikon SMZ 1500, Nikon, Tokyo, Japão) equipado com uma câmera CCD (Nikon DS-Fi, Nikon, Japão) as imagens foram realizadas e salvas por meio do software NIS – AR Elements (Nikon, Tokyo, Japão). Tais alterações foram classificadas como presente (1) ou ausente (0).

A metodologia aplicada para caracterizar as anormalidades nas larvas seguiram a proposta elaborada por Kist et al. (2011) e OECD (2013) que descrevem alterações morfológicas em peixes na presença de substâncias que interferem nas características morfológicas e fisiológicas. Foi possível observar cinco tipos de anomalias: edema no pericárdio e edema gastrointestinal, ambos classificados devido a um inchaço anormal na região abdominal; alterações na coluna vertebral, lordose e escoliose, nomeadas pela curvatura do eixo horizontal do corpo e; curvatura na cauda.

Cabe ressaltar que nos dois primeiros ensaios, ou seja, as duas primeiras repetições tanto para cepa produtora quanto cepa não produtora de MC-LR, realizava-se observações de todos os tratamentos após 96h de exposição. No entanto as imagens fotográficas eram retiradas apenas das larvas que apresentava alguma anomalia, como uma forma de representação. Posteriormente, procurou-se padronizar a forma de avaliar alterações morfológicas nas larvas decorrente da exposição aos extratos de ambas as cepas. De forma que nos três últimos experimentos, cessado às 96 horas de exposição, escolhia-se uma amostra de larvas aleatoriamente de cada tratamento e fotografava. Depois, por meio das imagens fazia-se as observações quanto as alterações morfológicas. Nesta análise, foram trabalhadas apenas três concentrações de cada ensaio baseado no maior número de sobreviventes mais tratamento controle.

#### **4.7 Análise de Dados**

A confecção das curvas concentração/resposta para os diferentes tempos de exposição de ambos os extratos (produtor de MC-LR e não produtor), foi realizada por meio do software GraphPad Prism Versão 6.0, bem como estimou os valores de CL50. Para tanto, inicialmente realizou-se uma análise de regressão não-linear com intuito de definir uma curva sigmoideal completa.

Como análise complementar, foi aplicado uma análise variância (ANOVA) seguidas pelo teste de *Tukey* no software R Statistical versão 3.1.2 (R CORE TEAM, 2012) para avaliar as diferenças na mortalidade das larvas de *A. altiparanae* entre as concentrações dos extratos, entre os períodos de exposição (24 a 96h) e testar a diferença entre os valores CL50 obtidos por tempo de exposição.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Análise da toxicidade aguda (CL50)**

Nos ensaios de toxicidade aguda observou-se que os valores de CL50 foram bastante semelhantes para os tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96 horas, embora os valores numéricos de CL50 da cepa produtora de MC-LR tenham sido levemente mais baixos (Tabela

1). Porém, quando os valores de CL50 da cepa produtora e da cepa não produtora de MC-LR são comparados, não se observa uma diferença significativa ao nível de  $p < 0,05$  (Tabela 2).

Evidenciou-se no presente estudo que ambos os extratos provocam efeitos agudos nas larvas de *A. altiparanae*, independente da presença da MC-LR para as concentrações testadas. Estes resultados estão representados nas curvas das concentrações/resposta destes ensaios (Figuras 7 e 8), nos quais percebe-se que ao final dos experimentos (96h de exposição) houve alta taxa de mortalidade ( $> 90\%$ ) para as larvas expostas as concentrações de 0,4 e 0,5 mg/mL para ambos os extratos (Figura 9), indicando que estas foram significativamente mais tóxicas para estes organismos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3). Além disso, nota-se que os tratamentos controle, para ambos os ensaios, apresentaram valores de mortalidade inferiores a 10% durante todos os experimentos (Figura 9), o que valida os resultados dos ensaios conforme recomendado pela OECD (2013), evidenciando o bom estado nutricional das larvas de *A. altiparanae* utilizadas nos experimentos.

**Tabela 1** Valores de Concentração Letal (CL50) e intervalos de confiança obtidos para larvas de *A. altiparanae* expostas aos extratos cepa produtora e não produtora de MC-LR, em diferentes tempos de exposição.

Tempo de exposição	Cepa produtora de MC-LR	Cepa não produtora de MC-
	CL50 (mg/mL)	LR CL50 (mg/mL)
24h	0,40 (0,36-0,44)	0,42 (0,39-0,44)
48h	0,32 (0,29-0,35)	0,37 (0,35-0,39)
72h	0,27 (0,24-0,30)	0,33 (0,32-0,36)
96h	0,24 (0,21-0,26)	0,32 (0,28-0,35)

**Tabela 2** Resultado do Teste de tukey (Q) para avaliar as diferenças de CL50 dos dois ensaios com os extratos da cepa produtora (A) e não produtora de MC-LR (B) entre os tempos de exposição.

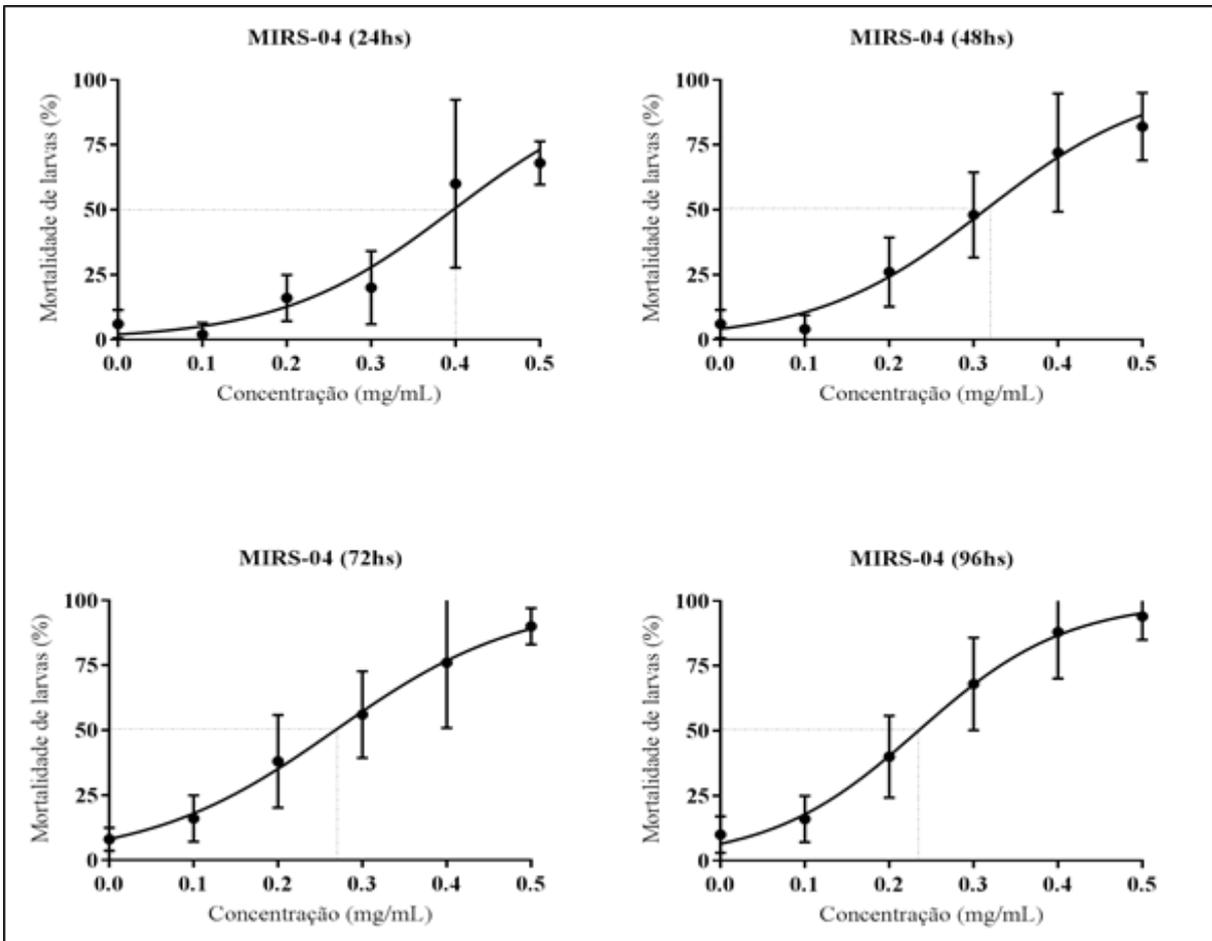
CL50 por hora	Q	p Valor
24h(B) -24h(A)	-0.0285	1,0
48h(B) -48h(A)	-0.0005	1,0
72h(B) -72h(A)	-0.0095	1,0
96h(B) -96h(A)	-0.0195	1,0
24h(B) -96h(A)	-0.1235	0,0*
72h(A) -24h(A)	-0.1140	0,0*
96h(A) -24h(A)	-0.1520	0,0*
96h(B) -24h(A)	-0.1040	0,0*

\*Valores estatisticamente significativos ao nível de  $p < 0,05$

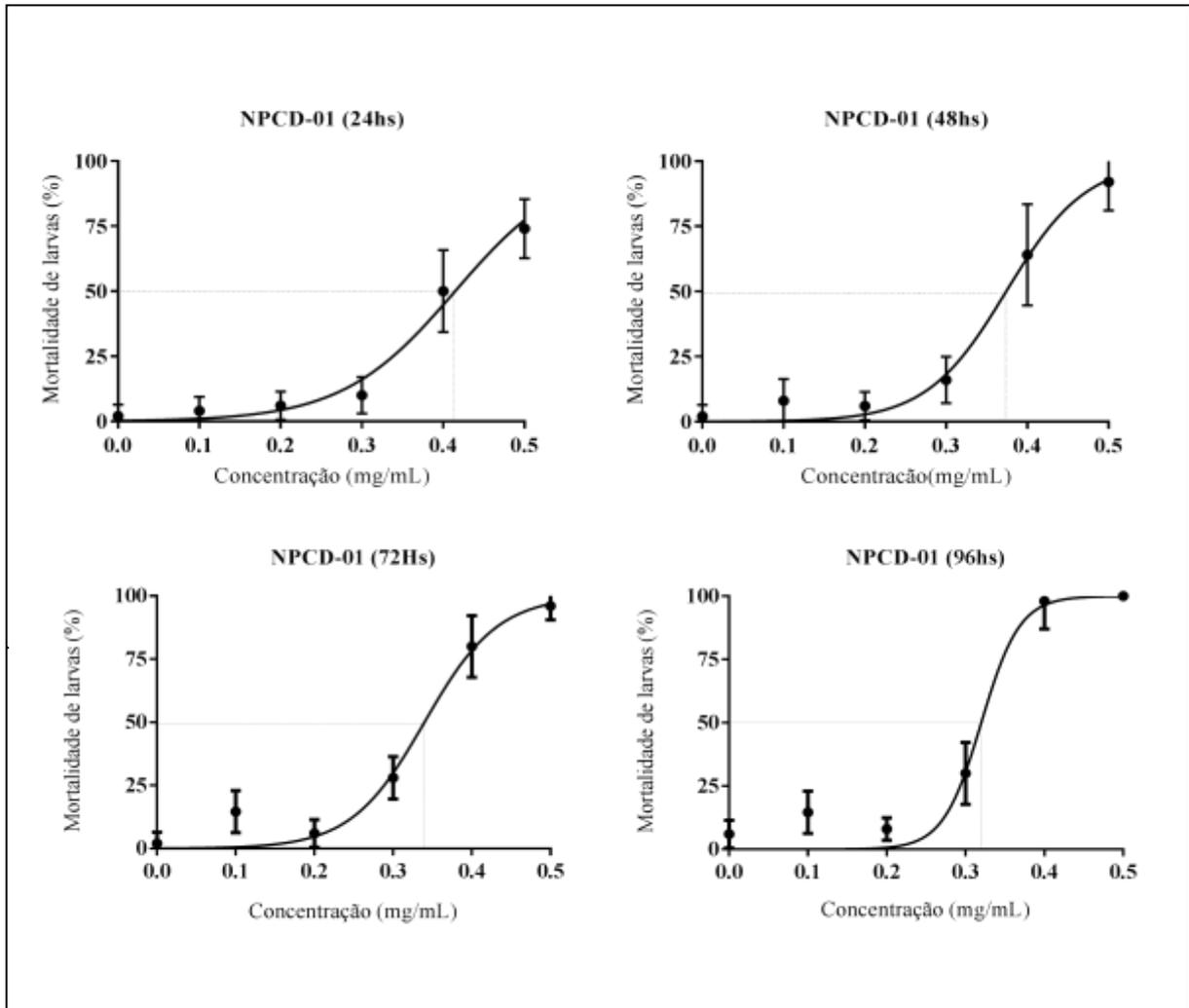
Nos resultados de efeito agudo obtidos pela exposição das larvas ao extrato da cepa produtora de MC-LR foi observado que na concentração celular de  $0,3\text{mg/mL} = 1,5\mu\text{g MC-LR/mL}$ , houve aproximadamente 50% de mortalidade das larvas em 48h de exposição e que este valor foi aumentando até atingir 68% de mortes em 96h. Portanto, esta concentração de MC-LR, apresentou também um efeito tóxico acentuado nas larvas de *A. altiparanae*. Nas demais concentrações observou-se que para  $0,2\text{ mg/mL} = 1,0\ \mu\text{g MC-LR/mL}$  e  $0,1\text{ mg/mL} = 0,5\ \mu\text{g MC-LR/mL}$  houve 40% e <25% de mortalidade, respectivamente, ao final do experimento (Figura 7). Considerando, que 40% de mortalidade em ensaios de exposição aguda, também é considerado efeito tóxico, concluiu-se que larvas de *A. altiparanae* só sobreviveriam para o período de exposição testado, em concentrações equivalentes igual  $0,5\ \mu\text{g MC-LR/mL}$  ou inferiores a esta, o que possivelmente provocaria efeitos crônicos.

Nos ensaios com extratos da cepa não produtora de MC-LR as concentrações celulares de  $0,3\text{ mg/mL}$ ,  $0,2\text{ mg/mL}$  e  $0,1\text{ mg/mL}$ , apresentaram letalidades inferiores a 30% durante as 96 de exposição (Figura 8). Como mencionado anteriormente, houve efeito tóxico para ambos os extratos testados, com e sem MC-LR, no entanto as respostas das larvas de *A. altiparanae* foram mais pronunciadas no extrato com MC-LR, considerando as mesmas concentrações celulares.

**Figura 6** Curva concentração-resposta (CL50) das larvas de *A. altiparanae* expostas às diferentes concentrações de células da cepa de cianobactéria produtora de MC-LR (MIRS-04) em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição.

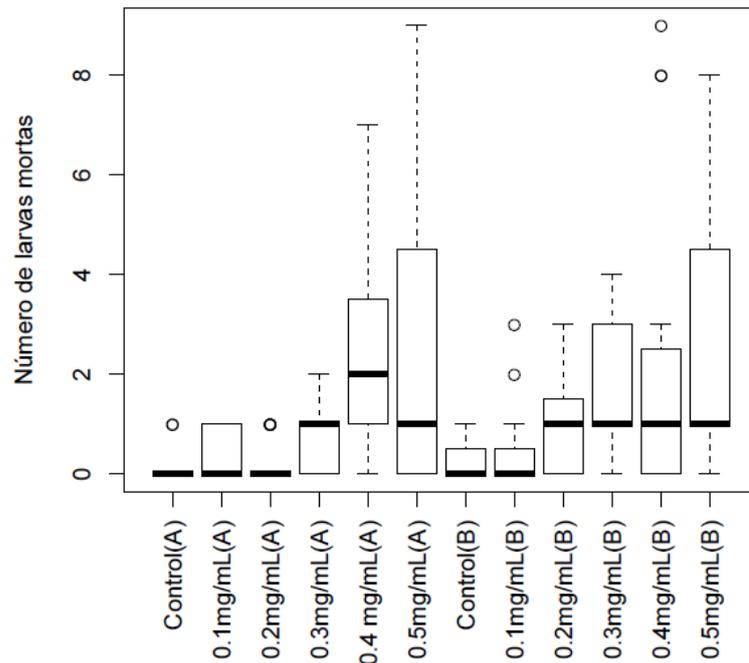


**Figura 7** Curva concentração-resposta (CL50) das larvas de *A. altiparanae* expostas às diferentes concentrações de células da cepa de cianobactéria não produtora de MC-LR (NPCD-01) em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição.



Por meio da análise de variância buscou-se testar se houve diferença estatística na mortalidade de larvas quanto à exposição às diferentes concentrações celulares das cepas produtora e não produtora de MC-LR. Esta análise mostrou que as concentrações celulares de 0,4 e 0,5 mg/mL diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) do controle e do tratamento com concentração celular de 0,2mg/mL para o extrato não produtor de MC-LR (Figura 9, Tabela 3). No experimento com a cepa produtora de MC-LR, os tratamentos com concentrações celulares de 0,4 e 0,5 mg/mL também apresentaram diferenças significativas quando comparadas com controle (Figura 10, Tabela 3). As concentrações de 0,4mg/mL e 0,5mg/mL representaram letalidade para mais de 90% das larvas no decorrer de 96h de exposição e isso ocorreu nos ensaios realizados para as duas cepas.

**Figura 8** Variação dos valores de mortalidade das larvas de *A. altiparanae* expostas as diferentes concentrações celulares das cepas não produtora de MC-LR (A) e produtora de MC-LR (B)



As linhas espessas representam a mediana; as caixas, os intervalos e os pontos representam 75, 90 e 95% da variabilidade dos dados, respectivamente durante 96 horas de exposição.

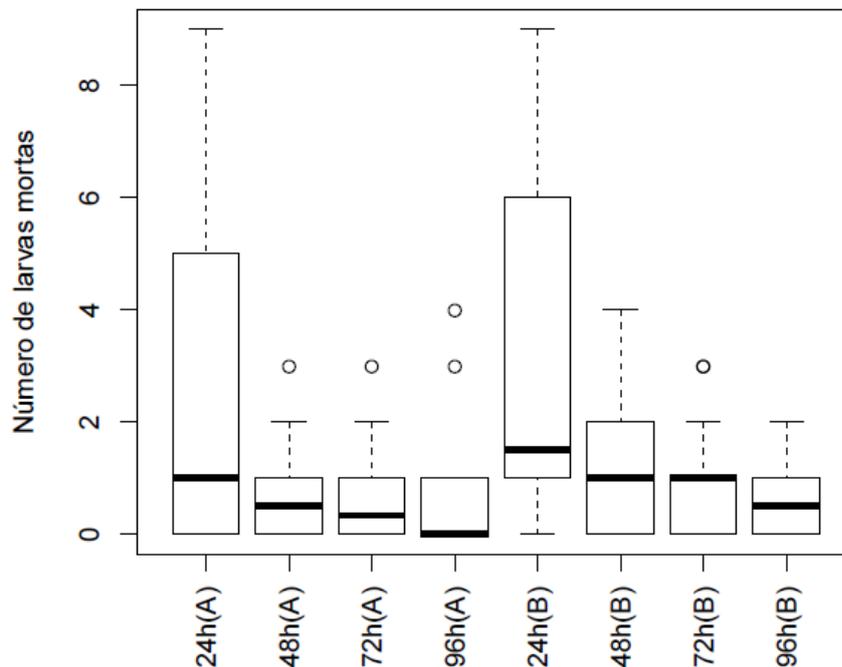
**Tabela 3** Resultado do Teste de tukey (Q) para avaliar as diferenças de mortalidade das larvas de *A. altiparanae* entre os tratamentos com extratos não produtores e produtor de MC-LR após 96 horas de exposição.

Extrato não produtor de MC-LR	Q	p valor	Extrato produtor de MC-LR	Q	p valor
0,1mg/mL-Control	6,50E-01	0,99	0,1mg/mL-Control	1,50E-01	1,00
0,2mg/mL-Control	1,00E-01	1,00	0,2mg/mL-Control	7,50E-01	0,96
0,3mg/mL-Control	6,50E-01	0,99	0,3mg/mL-Control	1,45E+00	0,22
0,4mg/mL-Control	2,35E+00	0,00*	0,4mg/mL-Control	1,95E+00	0,02*
0,5mg/mL-Control	2,40E+00	0,00*	0,5mg/mL-Control	2,15E+00	0,00*
0,2mg/mL-0,1mg/mL	-5,50E-01	1,00	0,2mg/mL-0,1mg/mL	6,00E-01	0,99
0,3mg/mL-0,1mg/mL	0,00E+00	1,00	0,3mg/mL-0,1mg/mL	1,30E+00	0,38
0,4mg/mL-0,1mg/mL	1,70E+00	0,07	0,4mg/mL-0,1mg/mL	1,80E+00	0,04
0,5mg/mL-0,1mg/mL	1,75E+00	0,05	0,5mg/mL-0,1mg/mL	2,00E+00	0,01*
0,3mg/mL-0,2mg/mL	5,50E-01	1,00	0,3mg/mL-0,2mg/mL	7,00E-01	0,98
0,4mg/mL-0,2mg/mL	2,25E+00	0,00*	0,4mg/mL-0,2mg/mL	1,20E+00	0,51
0,5mg/mL-0,2mg/mL	2,30E+00	0,00*	0,5mg/mL-0,2mg/mL	1,40E+00	0,27
0,4mg/mL-0,3mg/mL	1,70E+00	0,07	0,4mg/mL-0,3mg/mL	5,00E-01	1,00
0,5mg/mL-0,3mg/mL	1,75E+00	0,05	0,5mg/mL-0,3mg/mL	7,00E-01	0,98
0,5mg/mL-0,4mg/mL	5,00E-02	1,00	0,5mg/mL-0,4mg/mL	2,00E-01	1,00

\*Valores estatisticamente significativos ao nível de  $p < 0,05$

Nas primeiras 24 horas de exposição foram registrados o maior número de mortalidade de larvas para ambos os extratos. Tais resultados foram confirmados estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Nos demais períodos, (48, 72 e 96h) a mortalidade de larvas ocorreu de forma crescente, muito embora não tenham sido observadas diferenças significativas no número de larvas mortas nestes três últimos tempos de exposição (Figura 10, Tabela 4).

**Figura 9** Variação dos valores de mortalidade das larvas por tempo de exposição da cepa não produtora de MC-LR (A) e produtora de MC-LR (B) em 24, 48, 72 e 96 horas



As linhas espessas representam a mediana; as caixas, os intervalos e os pontos representam 75, 90 e 95% da variabilidade dos dados, respectivamente

**Tabela 4** Resultado do Teste de tukey (Q), diferença na mortalidade de larvas de *A. altiparanae* por tempo de exposição entre os tratamentos dos ensaios com extratos da cepa não produtora (A) e produtora de MC-LR (B)

Horas	Q	p valor	Horas	Q	p valor
48h(A)-24h(A)	-1.70	0.00*	48h(B)-24h(B)	-1.77	0.00*
72h(A)-24h(A)	-1.76	0.00*	72h(B)-24h(B)	-2.13	0.00*
96h(A)-24h(A)	-1.90	0.00*	96h(B)-24h(B)	-2.27	0.00*
48h(A)-24h(B)	2,16	0.00*	72h(B)-24h(A)	-1,67	0.00*
96h(A)-24h(B)	2,36	0.00*	96h(B)-24h(A)	-1,80	0.00*

\*Valores estatisticamente significativos ao nível de  $p < 0,05$

Neste estudo, as larvas de *A. altiparanae* ficaram imersas a concentrações celulares da cepa *M. aeruginosa*, sendo uma produtora de MC-LR e a outra não produtora. O primeiro impacto observado por essa exposição foi a mortalidade de larvas, nas primeiras 24 horas de exposição com o maior número de larvas mortas em todas as concentrações, especialmente nas concentrações de 0,4 e 0,5 mg/L (Figura 10).

As larvas expostas nos dois ensaios haviam acabado de eclodir, nesta fase ontogênica, os órgãos ainda estão em formação, sendo, portanto mais sensíveis a mudanças no meio a qual estão se desenvolvendo (xxx). Nos resultados apresentados foi possível observar que as concentrações celulares superiores a 0,24 mg/mL cepa com MC-LR e 0,32 mg/mL cepa sem MC-LR causam mortalidade de aproximadamente 50% da população de larvas até 96 horas de exposição. Os efeitos agudos avaliados nas larvas mostram que as mesmas possuem pouca capacidade de desintoxicação de MC-LR e outras substâncias tóxicas presentes nos dois extratos.

## **5.2 Alterações morfológicas ocorridas em larvas de *Astyanax altiparanae* expostas aos extratos produtores e não produtores de MC-LR.**

As larvas de *A. altiparanae* que se mantiveram vivas ao término dos ensaios de exposição aguda (96h) nas concentrações 0,1mg/mL, 0,2mg/mL e 0,3mg/mL para ambos os extratos, além do tratamento controle, foram analisadas sobre aspectos morfológicos (Figuras 11 e 12). Nesta avaliação procurou-se detalhar ao máximo os efeitos pontuais que as cepas de *M. aeruginosa* pudessem causar nas larvas de *A. altiparanae*. Algumas dessas alterações foram facilmente confirmadas devido à mudança brusca no corpo dos organismos (Figuras 11 e 12). No tratamento controle também foram evidenciadas alterações pontuais “leves” na coluna vertebral (LOR), edema na região do pericárdio (EPCR) e na região gastrointestinal (EGI), no entanto em uma taxa bem menor comparada com as larvas dos tratamentos com extratos de *M. aeruginosa*.

Fatores externos como temperatura, salinidade, pH e oxigênio ou ainda atividades antropogênicas, podem influenciar negativamente na reprodução dos peixes, comprometendo a sobrevivência e ocasionando alterações morfológicas em embriões e larvas (KJØRSVIK; MANGOR-JENSEN; HOLMEFJORD, 1990). No entanto algumas alterações morfológicas podem ocorrer naturalmente durante a eclosão dos peixes, porém a taxa de malformações embrionárias não deverá ser superior a 10% (OECD, 2013). No caso deste estudo, no

tratamento controle, tanto na análise de toxicidade aguda quanto na de alterações morfológicas, apresentaram resultados conforme recomendado pela OECD (2013).

No ensaio com extratos da cepa produtora de MC-LR, as anomalias caracterizadas como edema na região do pericárdio (EPCR) e gastrointestinal (EGI) também ocorreram em todas as concentrações. As alterações na cauda (CC) foram menos expressivas, ocorrendo apenas na concentração 0,2mg/mL (1,0µg MC-LR/mL) (Tabela 5). Em relação às alterações morfológicas registradas nas larvas expostas as concentrações do extrato não produtor de MC-LR, apareceram escoliose (SCO) e lordose (LOR) para todos os tratamentos. Curvatura na cauda (CC) e edema na região do pericárdio apareceram apenas na concentração 0,3mg/mL. O tratamento 0,3mg/mL foi o único no qual as larvas apresentaram os cinco tipos de anomalias (Tabela 5). Estes resultados permitem inferir que outros metabólitos, diferentes da MC-LR, podem induzir alterações nas larvas de *A. altiparanae*, como por exemplo, escoliose e lordose uma vez que estas anomalias não foram observadas nos tratamentos com a presença da cianotoxina MC-LR.

**Tabela 5** Presença das alterações morfológicas observadas nas larvas de *A. altiparanae* expostas aos extratos da cepa produtora e não produtora de MC-LR.

<b>Concentração celular (Concentração de MC-LR)</b>	<b>LOR</b>	<b>SCO</b>	<b>CC</b>	<b>EPCR</b>	<b>EGI</b>
Controle	+			+	+
0,1mg/mL (0,5µg MC-LR/mL)	+			+	+
0,2mg/mL (1,0µg MC-LR/mL)	+		+	+	+
0,3mg/mL (1,5µg MC-LR/mL)	+			+	+
0,1mg/mL	+	+			+
0,2mg/mL	+	+			+
0,3mg/mL	+	+	+	+	+

LOR= Lordose, SCO= Escoliose, CC= Curvatura na cauda, EPCR= Edema no pericárdio e EGI= Edema gastrointestinal

**Figura 10** Larvas do tratamento controle

Larva normal (A), larva do tratamento controle com edema leve na região gastrointestinal e lordose levemente (B).

No presente estudo as alterações apontadas na região da coluna vertebral, descritas como escoliose, lordose e curvatura na cauda observadas em algumas larvas expostas aos extratos, possivelmente podem ter sido ocasionadas pelos movimentos natatórios irregulares (BOGLIONE et al., 2013). Durante os experimentos algumas larvas se mostraram bastante agitadas, nadavam com muita rapidez fazendo movimentos circulares e irregulares, em torno do próprio corpo, possivelmente pelo estresse a qual foram submetidas. Este comportamento foi comparado com as larvas do tratamento controle, que demonstraram comportamento diferente, com movimento natatório retilíneo e mais regular.

A maioria dos estudos de qualidade ambiental usados para avaliar alterações morfológicas em organismos adotam como parâmetro as alterações anatômicas, pois essas são facilmente notadas em situação de estresse. No entanto, alterações microscópicas podem acontecer simultaneamente às macroscópicas, sendo tão importantes quanto as alterações macroscópicas. Dentre estas anomalias apresentadas neste estudo, alterações como, edemas na região abdominal foram as mais notadas.

Alterações físicas costumam ser as primeiras a serem observadas, por ocorrem de forma mais grosseira no corpo dos organismos, tal como o desenvolvimento de edema nos tecidos de embriões e larvas de peixes (WALKER; PETERSON, 1991). Vários mecanismos têm sido proposto para explicar os diferentes locais e causas associado a formação de edema em organismos aquáticos e terrestres. Esta anomalia ocorre devido a retenção anormal de líquido em compartimento extracelular intersticial ou em cavidades do corpo pelo aumento da pressão hidrostática nas veias e capilares (GILBERTSON et al., 1991). A formação de edema caracteriza-se também pela aumento da atividade metabólica ou por hemorragias subcutâneas, ou seja, o sangue pára de circular propiciando acúmulo de eritrócitos. Edemas na região do

coração ou pericárdio acontece pela dilatação cardíaca, e aumentou venosa pressão. Isso ocorre por altas exigências metabólicas na qual o corpo do indivíduo é submetido, geralmente associado ao estresse ou ação de um algum agente tóxico (GILBERTSON et al., 1991). Em embriões, estes edemas ocorrem geralmente na região caudal, olhos e sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal). Em fases posteriores do desenvolvimento o aparecimento de edema, se manifesta na região do pericárdio, saco vitelino e região gastrointestinal (LEATHERLAND; WOO, 1998).

**Figura 12** Ilustração das alterações morfológicas\* em larvas de *Astyanax altiparanae* resultante da exposição (96h) aos extratos das cepas produtora e não produtora de MC-LR



A= Edema leve na região do coração, escoliose e curvatura na cauda. B= Edema na região do coração e gastrointestinal, lordose e curvatura na cauda. C= Alteração na morfologia da cauda e escoliose. D= Lordose acentuada. E1 e E2= Edema na região pericardial e na região gastrointestinal. F1 e F2= Edema na região pericardial e na região gastrointestinal e alteração na coluna do tipo lordose. Fonte: O autor

As alterações morfológicas descritas nas larvas de *A. altiparanae* foram as mesmas descritas em ensaios expondo embriões e larvas do peixe *D. rerio* em extratos de cianobactérias das espécies *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae* e *Aphanizomenonflos-aquae* e microcistina-LR pura (OBEREMM; FASTNER; STEINBERG, 1997; OBEREMM et al., 1999). Lui et al. (2002) avaliaram o efeito de extrato de *M. aeruginosa*, em embriões e larvas do peixe *Misguruns mizolepsis* que resultaram em malformações, mortalidade, curvatura no corpo e edemas. Concentrações de MC-LR presentes em amostras ambientais (extratos) parecem ser mais tóxicas, comparadas as MC-LR pura. Este mesmo resultado foi relatado por Bury Eddy e Codd (1995) em trutas e, por Jungman e Bennodorf (1994) em *Daphnia* e por Yasuno et al. (1995) em *Moina macropoda*. Efeitos de outros extratos de cianobactérias contendo a toxina anatoxina-a também mostraram efeitos altamente tóxicos em estágios iniciais de espécimes de *Ciprino carpio* (OSSWALD et al., 2009).

Outras vias de exposição, como alimentação ou injeção intraperitoneal tem mostrado a toxicidade de extratos de cianobactérias produtoras ou não de toxinas (PAVAGADHI; GONG; BALASUBRAMANIAN, 2013). Phillips et al. (1985) investigaram o efeito produzido por cepas tóxicas de *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena* não tóxica expostas em truta arco-íris e tilápias. Os peixes que consumiram tanto os extratos tóxicos como não tóxicos, não apresentam efeitos nocivos, mas por meio de injeção intraperitoneal de extratos tóxicos induziu a mortalidade dessas duas espécies de peixes.

No presente estudo, ocorreram alguns fatos curiosos. Algumas larvas que estavam expostas no extrato com toxina (MC-LR) e no extrato livre de toxina se alimentaram dos fragmentos celulares das cepa de *M. aeruginosa* (Figura 12, B e C). Pode ser que esse fato tenha relação com aparecimento da anomalia edema gastrointestinal observada nestes organismos.

As larvas de *A. altiparanae* tornam-se ativas para alimentar assim que abrem a boca, isso ocorre dois dias após a eclosão. As larvas que estavam expostas aos extratos dos dois ensaios e as larvas do controle, não foram alimentadas durante os quatro dias. Em testes de toxicidade aguda não se alimenta o animal (USEPA,1975), no entanto, essa prática não prejudicou o desenvolvimento das larvas durante os ensaios, considerando a taxa de sobrevivência do controle que foi superior a 90%. As larvas de *A.altiparanae* conseguem ficar em jejum até quatro dias sem que isso comprometa a sua sobrevivência (relato de experimentos em laboratório, não publicado). Mas tendo alimento disponível, certamente elas irão capturar. *Astyanax altiparanae* é uma espécie onívora, incluindo algas em sua dieta

alimentar (GOMIERO, BRAGA, 2003; BRANDÃO-GONÇALVES et al., 2010). Portanto, o fato de terem se alimentado de fragmentos celulares de cianobactérias, pode ter potencializado ainda mais os efeitos tóxicos de ambos os extratos. Com isso, é possível dizer que esses organismos assim como outros peixes podem sofrer influências direta e indiretamente se tiverem se desenvolvendo em ambientes com a presença de cianobactérias.

Os efeitos de ambos os extratos (cepa produtora e cepa não produtora de MC-LR) causaram anormalidades parecidas no grupo de larvas expostas por 96 horas nas concentrações celulares de 0,1mg/mL, 0,2mg/mL e 0,3mg/mL. No ensaio com a cepa produtora este efeito foi um pouco mais acentuado em relação à cepa não produtora, certamente pela presença de MC-LR. As duas cepas atuam negativamente no desenvolvimento das larvas de *A. altiparanae*, possivelmente outros compostos além da toxina MC-LR determinaram o aparecimento de tais anomalias assim como na mortalidade das larvas, observada principalmente nas concentrações de 0,4mg/mL e 0,5m/mL.

As cianobactérias são um dos grupos de procariontes fotossintéticos gram-negativo mais diversificado do planeta, sendo capazes de produzir metabólitos potencialmente tóxicos para organismos aquáticos. Os efeitos tóxicos de extratos de cepas de cianobactérias não produtora de toxina pode está associado a vários compostos bioativos (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005). As toxinas produzidas pelas cianobactérias são metabólitos secundários que uma vez disponível na água pode causar intoxicação seguido de mortes de espécies aquáticas. Ainda não se conhece os reais motivos pelos quais as cianobactérias produzem toxinas. Existem suposições que elas podem funcionar como compostos protetores anti-herbivoria (CARMICHAEL, 1992). Numa mesma floração de cianobactérias é comum a existência de genótipos tóxicos e não-tóxicos, no qual as concentrações de toxinas podem variar bastante de acordo com a temperatura, espaço e parâmetros físico-químicos (CATHERINE et al., 2013). Neste sentido é possível que os efeitos tóxicos observados nos ensaios com a cepa não produtora de MC-LR tenham sido pela ativação de outros compostos produzidos pela espécie *M. aeruginosa*.

## 6 CONCLUSÃO

- Os valores de CL50 calculados para os dois ensaios foram semelhantes, embora os valores de CL50 da cepa produtora de MC-LR tenham sido mais baixos, indicando um efeito mais pronunciado, possivelmente pela presença da cianotoxina MC-LR.
- A mortalidade das larvas foi maior nas duas concentrações celulares 0,4mg/mL e 0,5mg/mL, sendo observado mais de 90% de mortes para ambas as cepas em 96 horas. Entre os períodos de exposição, 24 horas foi o período que apresentou a maior taxa de mortalidade de larvas de *A. altiparanae* e isso ocorreu nos dois ensaios, mostrando que neste período as concentrações de 0,4mg/mL e 0,5m/mL já haviam causado letalidade em 60% das larvas.
- A maioria das larvas de *A. altiparanae* que tiveram contato com os extratos das cepas de *M. aeruginosa* mostraram alto grau de sensibilidade, pois além de mortes, desenvolveram alterações morfológicas, como, edemas subcutâneas e deformidades na coluna vertebral.
- Os resultados deste estudo permitem concluir que cepas de cianobactérias podem produzir outras substâncias tóxicas além das toxinas como MC-LR, o que pode ser justificado pelos efeitos tóxicos observado nas larvas expostas as concentrações celulares do extrato sem a presença de MC-LR.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. (Ed.). Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo. **Eduem**: Maringa. 1997. 387p.
- AGOSTINHO, A.; MIRANDA, L.; BINI, L.; GOMES, L.; THOMAZ, S. M.; SUZUKI, H. Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. Theoretical reservoir ecology and its applications. **Backhuys Publishers**, Leiden, p. 227-265, 1999.
- APELDOORN, M. E.; EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J. A.; BAKKER, G. J. I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 51, p. 7-60, 2007.
- ARANA, L. V. Fundamentos de aquicultura. **Editora da UFSC**, 2004. 348p.
- ABNT. (Associação Brasileira de Normas Técnicas) NBR. 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). 2016. 23p.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru/Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p.441-446, 2002.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; EVANS, W. R.; CARMICHAEL, W. W.; NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Physiology**, v. 6, n. 3, p. 261-265, 1994.
- BISHOP, C.; ANET, E.; GORHAM, P. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 3, p. 453-471, 1959.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.; MOLICA, R. Cianobactéria invasora: aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 1-10, 2003.
- BOARU, D. A.; DRAGOŞ, N.; SCHIRMER, K. Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: a comparative study. **Toxicology**, v. 218, n. 2, p. 134-148, 2006.
- BOGLIONE, C.; GISBERT, E.; GAVAIA, P.; E WITTEN, P.; MOREN, M.; FONTAGNÉ, S.; KOUMOUNDOUROS, G. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, p. 121-167. 2013.
- BRANDÃO-GONÇALVES, L.; DE OLIVEIRA, S. A.; LIMA-JUNIOR, S. E. Hábitos alimentares da ictiofauna do córrego Franco, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 2, p. 21, 2010.
- BURFORD, M. Phytoplankton dynamics in shrimp ponds. **Aquaculture Research**, v. 28, n. 5, p. 351-360, 1997.

- BURY, N. R.; EDDY, F. B.; CODD, G. A. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout. **Journal of Fish Biology**, v. 46, n. 6. p. 1042-1054, 1995.
- BURY, N. R.; EDDY, F. B.; CODD, G. A. Stress responses of brown trout, *Salmo trutta* L.; to the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Toxicology Water Quality**. v.11, p. 187–193, 1997.
- BUTLER, N.; CARLISLE, J.; LINVILLE, R.; WASHBURN, B. *Microcystins: a brief overview of their toxicity and effects, with special reference to fish, wildlife, and livestock*. **California Environmental Protection Agency, Sacramento**, v. 5, 2009.
- CALIJURI, M. C.; SANTOS, A. C. A.; ALVES, M. S. A. Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. **Rima**, 2006. 109p.
- CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p. 445-459, 1992.
- CASTENHOLZ, R. W.; WATERBURY, J. B. Oxygenic photosynthetic bacteria. Group I. Cyanobacteria. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v. 3, p. 1710-1789, 1989.
- CASTILHO-ALMEIDA, R. B. "*Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação". 2007. 119f. Tese (doutorado em Ciências Biológicas) -Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- CATHERINE, Q.; SUSANNA, W.; ISIDORA, E. S.; MARK, H.; AURELIE, V.; JEAN-FRANÇOIS, H. A. review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria–ecology, toxin production and risk management. **Water research**, v. 47, n. 15, p. 5464-5479, 2013.
- CAZENAVE, J.; BISTONI, M. D. L. A.; ZWIRNMANN, E.; WUNDERLIN, D. A.; WIEGAND, C. Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos - benefits and costs of microcystin detoxication. **Environmental Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 22-32, 2006.
- CHORUS, I. Cyanotoxin occurrence in freshwaters. In: CHORUS, I. (Ed.). *Cyanotoxins*. **Springer**, p.5-101, 2001.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. **Spon Press**, 1999. 400 p.
- CIPRIANO, R. R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M.; FENOCCHIO, A. S.; Evaluation of the effects of tributiltin (TBT) on chromosomes of the neotropical fish *Astyanax* sp. (Pisces, Tetragonopterinae). **Cytologia**, n. 69, v. 2, p. 187-190, 2004.
- CODD, G. A.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 203, n. 3, p. 264-272, 2005.
- CONNELL, D.; LAM, P.; RICHARDSON, B.; WU, R. Introduction to ecotoxicology. **John Wiley, Sons**, 2009. 184p.

- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.; ESPINDOLA, E. L. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.
- COSTA, I. A. S.; AZEVEDO, S. M. F.; SENNA, P. A. C.; BERNARDO, R. R.; COSTA, S. M.; CHELLAPPA, N. T. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. **Brazilian Journal of Biology**, v. 6, n.1B, p. 211-219, 2006.
- DESCY, J. P.; LEPRIEUR, F.; PIRLOT, S.; LEPORCQ, B.; VAN WICHELEN, J.; PERETYATKO, A.; WILMOTTE, A. Identifying the factors determining blooms of cyanobacteria in a set of shallow lakes. **Ecological Informatics**, v. 34, p. 129-138, 2016.
- DOMINGOS, P.; RUBIM, T. K.; MOLICA, R. J. R.; AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. **Environmental Toxicology**, v. 14, p. 31-35, 1999.
- DROBAC, D.; TOKODI, N.; SIMEUNOVIĆ, J.; BALTIC, V.; STANIĆ, D.; SVIRČEV, Z. Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 64, n. 2, p. 305-315, 2013.
- DURAI, P.; BATOOL, M.; Choi, S. Structure and effects of cyanobacterial lipopolysaccharides. **Marine drugs**, v. 13, n. 7, p. 4217-4230, 2015.
- DUTRA, F. M.; MACHADO, W. J.; CAETANO, M. S.; GOBBO, D'. A. Avaliação sensorial do processamento em conserva, utilizando-se as espécies: tilápia (*Oreochromis niloticus*), lambari (*Astyanax* spp.) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 14, n. 3, p. 239-244, 2012.
- ESTEVEES, F. A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2ª ed. 2011. 226p.
- FALCONER, I. R.; RUNNEGAR, M. T. Effects of the peptide toxin from *Microcystis aeruginosa* on intracellular calcium, pH and membrane integrity in mammalian cells. **Chemico-biological interactions**, v. 63, n. 3, p. 215-225, 1987.
- FERRÃO-FILHO, A. D. S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2729-2772, 2011.
- FERRARI, B.; MONS, R.; VOLLAT, B.; FRAYSSE, B.; PAXÉAUS, N.; GIUDICE, R. L.; POLLIO, A.; GARRIC, J. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? **Environmental toxicology and chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1344-1354, 2004.
- FISCHER, W. J.; DIETRICH, D. R. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicology and applied pharmacology**, v. 164, n. 1, p. 73-81, 2000.

FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Relatório destaca o crescente papel do peixe na alimentação mundial. Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/pt/item/232037/icode/>>. Acesso: 11 de ago. 2015.

GALVAN, G. L. **Avaliação genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando como bioindicador o peixe *Astyanax altiparanae* (Characidae)**. 2001, 102f. Dissertação (Mestrado em ecologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011.

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se a extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. 1995. Tese (Livro-Docência), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, São Jose do Rio Preto/SP. 1995. 286p.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS**, Série Zoologia, v. 13, p. 65-88, 2000.

GILBERTSON, M.; KUBIAK, T.; LUDWIG, J.; FOX, G. Great lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: Similarity to chick-edema disease, **Journal of Toxicology and Environmental Health: Current Issues**, v.,33, n.4, p. 455-520, 1991.

GOMES, A. M. D. A.; LÜRLING, M. Temperature Effect on Exploitation and Interference Competition among *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* and, *Cyclotella meneghiniana*. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

GOMES, A. M. D. A.; SAMPAIO, P. L.; FERRÃO-FILHO, A. D. S.; MAGALHÃES, V. D. F.; MARINHO, M. M.; OLIVEIRA, A. C. P. D.; SANTOS, V. B. D.; DOMINGOS, P.; AZEVEDO, S. M. F. D. O. Toxic cyanobacterial blooms in an eutrophicated coastal lagoon in Rio de Janeiro, Brazil: Effects on human health. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 2, p. 322-345, 2009.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. O lambari *Astyanax altiparanae* (Characidae) pode ser um dispersor de sementes? **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, p. 353-360, 2003.

GORHAN, P. R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lingb.). **Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie**, v.15, p.796-804, 1964.

GÖTZ, J.; PROBST, A.; MISTL, C.; NITSCH, R. M.; EHLER, E. Distinct role of protein phosphatase 2A subunit C $\alpha$  in the regulation of E-cadherin and  $\beta$ -catenin during development. **Mechanisms of development**, v. 93, n. 1, p. 83-93, 2000.

GURBUZ, F.; UZUNMEHMETOĞLU, O. Y.; DILER, Ö.; METCALF, J. S.; CODD, G. A.. Occurrence of microcystins in water, bloom, sediment and fish from a public water supply. **Science of The Total Environment**, v. 562, p.860-868, 2016.

HAUSER-DAVIS, R. A.; LAVRADAS, R. T.; LAVANDIER, R. C.; ROJAS, E. G. A.; GUARINO, A. W. S.; ZIOLLI, R. L. Accumulation and toxic effects of microcystin in tilapia (*Oreochromis niloticus*) from an eutrophic Brazilian lagoon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p.132-136, 2015.

HOWARTH, R. W.; MARINO, R.; COLE, J. J. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 2. Biogeochemical controls. **Limnology and Oceanography**, v. 33, n. 4, p. 688-701, 1988.

HUMBERT, J. F., BARBE, V., LATIFI, A., GUGGER, M., CALTEAU, A., COURSIN, T.; LONGIN, C. A tribute to disorder in the genome of the bloom-forming freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70747, 2013.

JACQUET, C.; THERMES, V.; DE LUZE, A.; PUISEUX-DAO, S.; BERNARD, C.; JOLY, J. S.; BOURRAT, F.; EDERY, M. Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). **Toxicol**, v. 43, n. 2, p. 141-147, 2004.

JUNGMANN, D.; BENNDORF, J. Toxicity to *Daphnia* of a compound extracted from laboratory and natural *Microcystis* spp.; and the role of microcystins. **Freshwater Biology**, v. 32, n. 1, p. 13-20, 1994.

KENDALL, R. J.; ANDERSON, T. A.; BAKER, R. J.; BENS, C. M.; CARR, J. A.; CHIODO, L. A.; COBB III, G. P.; DICKERSON, R. L.; DIXON, K. R.; FRAME, L. T. **Ecotoxicology**. USDA National Wildlife Research Center-Staff Publications, 2001. 516p.

KIST, L. W.; PIATO, A. L.; DA ROSA, J. G. S.; KOAKOSKI, G.; BARCELLOS, L. J. G.; YUNES, J. S.; BONAN, C. D.; BOGO, M. R. Acute exposure to microcystin-producing cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* alters adult zebrafish (*Danio rerio*) swimming performance parameters. **Journal of toxicology**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

KOPP R, HETESA J. Changes of hematological indices of juvenile carp (*Cyprinus carpio L.*) under the influence of natural populations of cyanobacterial water blooms. **Acta Veterinaria Brno**, v. 69, p. 131–137, 2000

LAWTON, L. A.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. **Analyst**, v. 119, n. 7, p. 1525-1530, 1994.

LEATHERLAND, J. F.; WOO, P. T. (Eds.). Fish diseases Non-Infectious Disorders. **CABI**, v. 2, 1998. 379p.

LIMA, F.; MALABARBA, L.; BUCKUP, P.; SILVA, J.; VARI, R.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.; PAVANELLI, C.; MENEZES, N. Genera incertae sedis in Characidae. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, **Edipucrs**, p. 106-169, 2003. 729p.

LIU, Y.; SONG, L.; LI, X.; LIU, T. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misgurnus mizolepis* Gunthe. **Toxicol**, v. 40, n. 4, p. 395-399, 2002.

- KJØRSVIK, E.; MANGOR-JENSEN, A.; HOLMEFJORD, I. Egg quality in fishes. **Advances in Marine Biology**, v. 26, p. 71–113, 1990.
- MACEDO, C. F.; SIPAUBA-TAVARES, L. H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Boletim do Instituto da Pesca**, v.36, n. 2, p. 149-163, 2010.
- MALBROUCK, C.; KESTEMONT, P. Effects of microcystins on fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 72-86, 2006.
- MALLASEN, M.; BARROS, H.; YAMASHITA, E. Y. Produção de peixes em tanques-rede e a qualidade de água. **Revista Tecnologia: Inovação Agropecuária**, v. 1, n. 1, p. 47-51, 2008.
- MARMEN, S.; AHARONOVICH, D.; GROSSOWICZ, M.; BLANK, L., YACOBI, Y. Z.; SHER, D. J. Distribution and Habitat Specificity of Potentially-Toxic *Microcystis* across Climate, Land, and Water Use Gradients. **Frontiers in microbiology**, v.7, 2016.
- MERILUOTO, J. Chromatography of microcystins. **Analytica. Chimica. Acta**, v. 352, p. 277–298, 1997.
- MITSOURA, A.; KAGALOU, I.; PAPAIOANNOU, N.; BERILLIS, P.; MENTE, E.; PAPADIMITRIOU, T. The presence of microcystins in fish *Cyprinus carpio* tissues: a histopathological study. **International Aquatic Research**, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2013.
- MOHAMED, Z. A.; CARMICHAEL, W. W.; HUSSEIN, A. A. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 2, p. 137-141, 2003.
- MOHAMED, Z. A.; HUSSEIN, A. A. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: a laboratory study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, n. 3, p. 424-429, 2006.
- MORELLI, S.; BERTOLLO, L.; FORESTI, F.; MOREIRA F., O.; DE ALMEIDA TOLEDO, S. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, v. 36, n. 3, p. 235-244, 1983.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A., BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. **EDUEM**. Maringá, 2001. 378p.
- O'NEIL, J. M.; DAVIS, T. W.; BURFORD, M. A.; GOBLER, C. J. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**, v. 14, p. 313-334, 2012.
- OBEREMM, A.; BECKER, J.; CODD, G.; STEINBERG, C. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 77-88, 1999.

OBEREMM, A.; FASTNER, J.; STEINBERG, C. E. Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*). **Water Research**, v. 31, n. 11, p. 2918-2921, 1997.

OECD. (Organization for Economic Co-Operation and Development) Test Guideline 236: OECD Guideline for Testing of Chemicals: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013. 22p.

OSSWALD, J.; CARVALHO, A. P.; CLARO, J.; VASCONCELOS, V. Effects of cyanobacterial extracts containing anatoxin-a and of pure anatoxin-a on early developmental stages of carp. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 2, p. 473-478, 2009.

PANOSSO, R., COSTA, I. A., DE SOUZA, N. R.; ATTAYDE, J. L. Cianobactérias e Cianotoxinas em reservatórios do Estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Oecologia Brasiliensis.**, v.11, n. 3, p. 433-449, 2007

PAPADIMITRIOU, T.; KATSIAPI, M.; KORMAS, K. A.; MOUSTAKA-GOUNI, M.; KAGALOU, I. Artificially-born “killer” lake: phytoplankton based water quality and microcystin affected fish in a reconstructed lake. **Science of the total environment**, v. 452, p. 116-124, 2013.

PAVAGADHI, S.; GONG, Z.; BALASUBRAMANIAN, R. Toxicological implications of microcystins for zebrafish embryos in the presence of other environmental pollutants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 7, p. 1574-1581, 2013.

PEREIRA-SANTOS, M. D. **Aspectos reprodutivos, morfologia dos gametas e desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae)**.2014, 80f. Dissertação (Mestrado em aquicultura) -Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

PERETYATKO, A.; TEISSIER, S.; DE BACKER, S.; TRIEST, L. Classification trees as a tool for predicting cyanobacterial blooms. **Hydrobiologia**, v. 689, n. 1, p. 131-146, 2012.

PERETYATKO, A.; TEISSIER, S.; DE BACKER, S.; TRIEST, L. Biomaniipulation of hypereutrophic ponds: when it works and why it fails. **Environmental monitoring and assessment**, v. 184, n. 3, p. 1517-1531, 2012.

PHILLIPS, M.; ROBERTS, R.; STEWART, J.; CODD, G. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Diseases**, v. 8, n. 4, p. 339-344, 1985.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, v. 2, p. 101-116, 2005.

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp. B e A. *altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda Cangüiri-ufpr)**. 2007, 127f. Dissertação (mestrado em genética) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2007.

REYNOLDS, C. S.; JAWORSKI, G.; CMIECH, H.; LEEDALE, G. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. **Biological Sciences**, v. 293, n. 1068, p. 419-477, 1981.

RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environmental toxicology and water quality**, v. 12, n. 4, p. 283-294, 1997.

RUNNEGAR, M. T.; ANDREWS, J.; GERDES, R. G.; FALCONER, I. R. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1235-1239, 1987.

RUNNEGAR, M. T.; MADDATU, T.; DELEVE, L. D.; BERNDT, N.; GOVINDARAJAN, S. Differential toxicity of the protein phosphatase inhibitors microcystin and calyculin A. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 273, n. 1, p. 545-553, 1995.

RUNNEGAR, M.; BERNDT, N.; KAPLOWITZ, N. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 134, n. 2, p. 264-272, 1995.

SANCHES, A. L. M. **Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax* sp.): testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidativo, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação**. 2014, 81f. Dissertação (Mestrado em química) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita", São José do Rio Preto, 2014.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. D. P.; WERNER, V. R.; DOGO, C. R.; RIOS, F. R.; CARVALHO, L. R. D. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological studies**, v. 126, n.1, p. 251-265, 2008.

SANTOS, A. P. M. E.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Hepatotoxicidade associada à microcistina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 2, p. 417-430, 2008.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da Bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n.1, p. 267-273, 2006.

SILVA, R. R. P. D.; PIRES JUNIOR, O. R.; GRISOLIA, C. K. Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp. **Genetics and molecular biology**, v. 33, n. 4, p. 750-755, 2010.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. **E&FN Spon**, London, p. 41-111, 1999.

SKULBERG, O. M.; CARMICHAEL, W. W.; CODD, G. A.; SKULBERG, R. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (cyanobacteria). **Algal toxins in seafood and drinking water**, p. 145-164, 1993.

STEVANATO, D. J. **Ontogenia larval e pós-larval de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) em laboratório.** 2016, 79f. Dissertação (Mestrado em zootecnia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2016.

SU, Y.; LI, L.; HOU, J.; WU, N.; LIN, W.; LI, G. Life-cycle exposure to microcystin-LR interferes with the reproductive endocrine system of male zebrafish. **Aquatic Toxicology**, 175, 205-212, 2016.

TENCALLA, F. G.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 30, n. 3, p. 215-224, 1994.

TENCALLA, F.; DIETRICH, D. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicol**, v. 35, n. 4, p. 583-595, 1997.

TSUJI, K.; NAITO, S.; KONDO, F.; ISHIKAWA, N.; WATANABE, M. F.; SUZUKI, M.; HARADA, K. I. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. **Environmental Science:Technology**, v. 28, n. 1, p. 173-177, 1994.

TSUJI, K.; NAITO, S.; KONDO, F.; WATANABE, M. F.; SUZUKI, S.; NAKAZAWA, H.; SUZUKI, M.; SHIMADA, T.; HARADA, K. I. A clean-up method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. **Toxicol**, v. 32, n. 10, p. 1251-1259, 1994.

TUCCI, C. E. Águas urbanas. **Estudos avançados**, v. 22, n. 63, p. 97-112, 2008

VAZZOLER, A.E.A.M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e Prática.* Maringá: EDUEM; São Paulo: SBI, 1996 169p.

WALKER, M. K.; PETERSON, R. E. Potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners, relative to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, for producing early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 21, n. 3, p. 219-237, 1991.

WANG, H.; TAN, J. T.; EMELYANOV, A.; KORZH, V.; GONG, Z. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. **Gene**, v. 356, p. 91-100, 2005.

WEDDERBURN, R. W. Quasi-likelihood functions, generalized linear models, and the Gauss-Newton method. **Biometrika**, v. 61, n. 3, p. 439-447, 1974.

WELKER, M.; STEINBERG, C. Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence. **Water research**, v. 33, n. 5, p. 1159-1164, 1999.

WHO. (World Health Organization). *Guidelines for drinking-water quality: Recommendations*, Geneva, 1998. 188p.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 203, n. 3, p. 201-218, 2005.

WOYNAROVICH E, HORVÁTH L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais. **FAO/CODEVASF/CNPQ**, 1983. 129p.

USEPA (US Environmental Protection Agency). Methods for acute toxicity tests with fish, macro invertebrates and amphibians: The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms. Program Element 1BA021, Washington; **EPA-660/3-75-009** April 1975.

XIE, L.; YAN, W.; LI, J.; YU, L.; WANG, J.; LI, G.; STEINMAN, A. D. Microcystin-RR exposure results in growth impairment by disrupting thyroid endocrine in zebrafish larvae. **Aquatic Toxicology**, 164, 16-22, 2015.

YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 9, n. 03, p. 464-470, 2015.

YASUNO, M.; SUGAYA, Y.; KAYA, K.; WATANABE, M. M. Variations in the toxicity of *Microcystis* species to *Moina macrocopa*. **Phycological research**, v. 46, n. s2, p. 31-36, 1998.

ZAGATTO, P; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. Ecotoxicologia. **Ed. Rima**, São Carlos/ SP, v. 2. 2006. 464p

ZHAO, Y.; XIE, L.; YAN, Y. Microcystin-LR impairs zebrafish reproduction by affecting oogenesis and endocrine system. **Chemosphere**, v. 120, p. 115-122, 2015.

ZURAWELL, R. W.; CHEN, H.; BURKE, J. M.; PREPAS, E. E. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 8, n. 1, p. 1-37, 2005.