

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
DOUTORADO EM ENGENHARIA DE PESCA

ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS RELACIONADOS À CARCINICULTURA
MARINHA

JANISI SALES ARAGÃO

FORTALEZA

2012

JANISI SALES ARAGÃO

ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS RELACIONADOS À CARCINICULTURA
MARINHA

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Pesca.

Área de Concentração. Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Leticia Veras Costa-Lotufo.

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Rui Simões de Menezes

A671a	Aragão, Janisi Sales
	Aspectos ecotoxicológicos relacionados à carcinicultura marinha / Janisi Sales Aragão. – 2011.
	12 0 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
	Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2011.
	Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca
	Orientação: Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo.
	1. Recursos Pesqueiros. 2. Ecotoxicologia. I. Título.
	CDD 571.95

JANISI SALES ARAGÃO

ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS RELACIONADOS À CARCINICULTURA
MARINHA

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Pesca, na área de concentração em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP-CLP

Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Rodrigo Fernandes
Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias
Universidade Federal do Ceará - UFC

Aos meus pais por todo amor dispensado

Dedico

Os animais tem razão

Quem já passou no sertão
E viu o solo rachado,
A caatinga cor de cinza,
Duvido não ter parado
Pra ficar olhando o verde
Do juazeiro copado.

E sair dali pensando:
Como pode a natureza
Num clima tão quente e seco,
Numa terra indefesa
Com tanta adversidade
Criar tamanha beleza.

O juazeiro, seu moço,
É pra nós a resistência,
A força, a garra e a saga,
O grito de independência
Do sertanejo que luta
Na frente da emergência.

Nos seus galhos se agasalham
Do periquito ao canção.
É hotel de retirante
Que anda de pé no chão
O general da caatinga
E o vigia do sertão.

E foi debaixo de um deles
Que eu vi um porco falando,
Um cachorro e uma cobra
E um burro reclamando,
Um rato e um morcego
E uma vaca escutando.

Isso já faz tanto tempo
Que eu nem me lembro mais
Se foi pra lá de Fortim,
Se foi pra cá de Cristais,
Eu só me lembro direito
Do que disse os animais.

Eu vinha de Canindé
Com sono e muito cansado,
Quando vi perto da estrada
Um juazeiro copado.
Subi, arrei minha rede
E fiquei ali deitado.
Como a noite estava linda
Procurei ver o cruzeiro,
Mas, cansado como estava,
Peguei no sono ligeiro.

Só acordei com uns gritos
Debaixo do juazeiro.
Quando eu olhei para baixo
Eu vi um porco falando,
Um cachorro e uma cobra
E um burro reclamando,
Um rato e um morcego
E uma vaca escutando.

O porco dizia assim:
“Pelas barbas do capeta
Se nós ficarmos parado
A coisa vai ficar preta
Do jeito que o homem vai,
Vai acabar o planeta.

Já sujaram os sete mares
Do Atlântico ao mar Egeu,
As florestas estão capengas,
Os rios da cor de breu
E ainda por cima dizem
Que o seboso sou eu.

Os bichos bateram palmas,
O porco deu com a mão,
O rato se levantou
E disse: “prestem atenção”,
Eu também já não suporto
Ser chamado de ladrão.

O homem, sim, mente e rouba,
Vende a honra, compra o nome.
Nós só pegamos a sobra
Daquilo que ele come
E somente o necessário
Pra saciar nossa fome.

Palmas, gritos e assovios
Ecoaram na floresta,
A vaca se levantou
E disse franzindo a testa:
Eu convívio com o homem,
Mas sei que ele não presta.
É um mal-agradecido,
Orgulhoso, inconsciente.
É doído e se faz de cego,
E não sente o que a gente sente,
E quando nasce e tomando
A pulso o leite da gente.

Entre aplausos e gritos,
A cobra se levantou,
Ficou na ponta do rabo
E disse: também eu sou
Perseguida pelo homem
Pra todo canto que vou.

Pra vocês o homem é ruim,
Mas pra nós ele é cruel.
Mata a cobra, tira o couro,
Come a carne, estoura o fel,
Descarrega todo o ódio
Em cima da cascavel.
É certo, eu tenho veneno,
Mas nunca fiz um canhão.
E entre mim e o homem,
Há uma contradição
O meu veneno é na preza,
O dele no coração.

Entre os venenos do homem
O meu se perde na sobra
Numa guerra o homem mata
Centenas numa manobra,
Inda cego que diz:
Eu tenho medo de cobra.

A cobra inda quis falar,
Mas, de repente, um esturro.
É que o rato, pulando,
Pisou no rabo do burro
E o burro partiu pra cima
Do rato pra dar-lhe um murro.

Mas, o morcego notando
Que ia acabar a paz,
Pulou na frente do burro
E disse: calma rapaz!...
Baixe a guarda, abra o casco,
Não faça o que o homem faz.

O burro pediu desculpas
E disse: muito obrigado,
Me perdoe se fui grosseiro,
É que eu ando estressado
De tanto apanhar do homem
Sem nunca ter revidado.

O rato disse: seu burro,
Você sofre porque quer.
Tem força por quatro homens,
Da carroça é o chofer...
Sabe dar coice e morder,
Só apanha se quiser.

O burro disse: eu sei
Que sou melhor do que ele,
Mas se eu morder o homem
Ou se eu der um coice nele
É mesmo que está trocando
O meu juízo no dele

Os bichos todos gritaram:
Burro, burro... muito bem!
O burro disse: obrigado,
Mas aqui ainda tem
O cachorro e o morcego
Que querem falar também.

O cachorro disse: amigos,
Todos vocês têm razão...
O homem é um quase nada
Rodando na contramão,
Um quebra-cabeça humano
Sem prumo e sem direção.

Eu nunca vou entender
Por que o homem é assim:
Se odeiam, fazem guerra
E tudo quanto é ruim
E a vacina da raiva
Em vez deles, dão em mim.

Os bichos bateram palmas
E gritaram: vá em frente.
Mas o cachorro parou,
Disse: obrigado, gente,
Mas falta ainda o morcego
Dizer o que ele sente.

O morcego abriu as asas,
Deu uma grande risada
E disse: eu sou o único
Que não posso dizer nada
Porque o homem pra nós
Tem sido até camarada.

Constrói castelos enormes
Com torre, sino e altar,
Põe cerâmica e azulejos
E dão pra gente morar
E deixam milhares deles
Nas ruas, sem ter um lar.

Eu disse olhando as pegadas:
Se essa reunião
Tivesse sido por nós,
Estava coberto o chão
De piubas de cigarros,
Guardanapos e papelão.

Botei a maca nas costas
E sai cortando vento.
Tirei a viagem toda
Sem tirar do pensamento
Os sete bichos zombando
Do nosso comportamento.

Hoje, quando vejo na rua
Um rato morto no chão,
Um burro mulo piado,
Um homem com um facão
Agredindo a natureza,
Eu tenho plena certeza:
Os animais tem razão!

Antonio Francisco

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo por mais cinco anos de orientação, amizade e confiança. Obrigada por mais essa oportunidade e por ajudar a fazer do Ecotox uma família.

Ao Prof. Dr. Tito Lotufo por estar sempre disposto a me orientar. Obrigada por mais essa!

Ao Prof. Dr. Amadeu Soares do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro-Portugal pela oportunidade de trabalho na cooperação com o Ecotox.

À Susana Loureiro do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro-Portugal pela orientação e atenção sempre dispensada.

Ao Prof. Dr. Vitor Vasconcelos do Laboratório de Ecotoxicologia, Genética e Evolução (LEGE) da Universidade do Porto e à todos que lá trabalham, especialmente António Martins pela ajuda na parte da identificação molecular da cianobactéria, pelo carisma, atenção e paciência.

À Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves do Departamento de Clínica Odontológica – UFC pelas análises histológicas dos camundongos.

À família Ecotox (Marcionília, Lívia, Isabelle, Paula Jimenez, Larissa, Allyson, Marcela, Lucas, Jeamylye, Elthon, Évila e todos que chegaram depois) que mais uma vez participou de mais um passo importante na minha vida académica e que eu descobri que é o laboratório com o melhor “clima” pra se trabalhar. Valeu família!!!

À equipe do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade de Aveiro pelos momentos agradáveis, amigáveis e de trabalho, em especial ao Técnico Abel Ferreira e ao Pós-doutorando João Pestana, pela colaboração neste trabalho.

Aos amigos do EQUAL e LECA pelas horas do almoço, da meranda, confraternizações, conversas, enfim, tudo acontece no corredor mais divertido do LABOMAR.

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do LABOMAR pelos empréstimos de materiais e equipamentos, mas principalmente pela hora do café, um momento de jogar conversa fora, desabafar e desestressar. Obrigada meninas!!!

À Gleire Menezes e Carol Martins pela amizade verdadeira desde o primeiro dia da graduação. “Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas lembranças” (Vinícius de Moraes).

A meus pais Bertim e Joana...dizer o que? Nenhuma palavra exprime meu amor e gratidão pela vida que me deram e pelo apoio incondicional principalmente nos estudos.

Aos meus irmãos (Marinisi, Milton e Sid) e cunhados respectivamente (Anderson, Luciana e Daniele), obrigada pelo carinho, amor, atenção, cuidado.

Aos meus sobrinhos (Gabriel, Arthur, Humberto e Davi) que me traziam alegria só de olhar uma foto ou ouvir a voz quando eu estava “distante”, e agora “junto”, me trazem muito mais. A “inha” ama vocês muito!

Ao meu tio Solon pelo entusiasmo e admiração de ter uma sobrinha/afilhada “doutora”!

Ao Guido Alves...você e suas músicas me acalmam, me inspiram, me encantam!!!

À Caroline Bezerra pela ajuda no começo desse trabalho, tanto no laboratório quanto nas coletas. Saudade de você!!

À Janaina Feitosa (família ecotox) pela enorme ajuda na realização desse trabalho.

Ao Daniel Bezerra e Delano do Laboratório de Oncologia Experimental – UFC na ajuda com o ensaio com camundongo.

Meus velhos amigos: Karla, Pedrão, Marlon, Marília, Claudim, Day, Rogério, Veridiana, Marquim, Kelly.....vcs são realmente bons amigos! E aos novos: Manu, Cris, Eveline, Rodrigo, Marcelino, Roberto, Hallyson...uhuu Mossoró!!!

Aos amigos brasileiros em Portugal que ajudaram a tornar mais agradável minha estada: Lilian, Mário, Vanessa e Valdir (família), Carol, Talita, Mari, Darlan, Dani, Olga (a Ucrâniana brasileira), Cintia e ao Rhaul e Pablo também pela ajuda nos ensaios de peixes e daphnias, respectivamente.

Aos colegas da primeira turma de Doutorado da Engenharia de Pesca-UFC.

À todos os professores, funcionários e alunos que fazem o curso de Engenharia de Pesca.

Ao LABOMAR por todos esses anos de estudo, pesquisas e festas.

À FUNCAP e CAPES/FCT Projeto 240/09.

À todos que contribuíram de uma forma ou de outra nesses anos de doutorado.

RESUMO

Apesar do cultivo de camarão ser uma importante atividade econômica, o seu crescimento tem atraído a atenção para os possíveis impactos ao meio ambiente. As águas residuais geradas pelos cultivos podem contribuir para a eutrofização das águas receptoras desses efluentes, já que possuem uma ampla variedade de substâncias consideradas contaminantes potenciais, como o metabissulfito de sódio, um agente sulfitante que retira o oxigênio da água e de alimentos. Além disso, os efluentes carregam a comunidade fitoplanctônica que prolifera nos sistemas de cultivo, incluindo cianobactérias produtoras de toxinas. Com isso o objetivo desse estudo foi uma avaliação ecotoxicológica utilizando diferentes organismos testes e respostas biológicas dos possíveis impactos causados pelo uso do metabissulfito de sódio ou pela proliferação de cianobactérias coletadas nos próprios cultivos. Amostras do fitoplâncton foram coletadas em três fazendas do estado do Ceará para análise qualitativa, quantitativa e para o isolamento das cianobactérias. Estes organismos foram identificados através de técnicas morfológicas e de biologia molecular, cultivados no laboratório para obtenção dos extratos e realizados ensaios com camundongos e misidáceos. O metabissulfito de sódio teve sua toxicidade avaliada por meio de ensaios agudos em diferentes níveis tróficos (microalgas, cladóceros, camarões e peixes), mas também pela taxa do consumo de oxigênio e das atividades enzimáticas (CAT; AChE e GST) em camarões. Para os peixes, foram realizados ainda ensaios com o desenvolvimento embriolarval e das atividades enzimáticas (AChE e GST). A análise qualitativa e quantitativa da comunidade fitoplanctônica mostrou um grande número de espécies de quase todas as classes do fitoplâncton, inclusive cianobactérias. Deste último grupo foi isolada e cultivada *Synechococcus* sp., para a qual o extrato e as células vivas mostraram toxicidade em camundongos evidenciada por danos observados no fígado e rins dos animais. Já na avaliação da toxicidade do metabissulfito de sódio, este apresentou toxicidade aguda para os organismos testes, apresentando uma EC_{50} de 24,29 mg/L para as microalgas, CL_{50} de 34,90 mg/L e 69,65 mg/L para cladóceros e camarões, respectivamente. Em relação ao consumo de oxigênio e atividades enzimáticas, estes não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos controles, com exceção para a AChE nos camarões e GST nos peixes. No desenvolvimento embriolarval dos peixes, o metabissulfito de sódio causou diferentes tipos de efeitos desde a destruição dos ovos à deformidades nas larvas. Sendo assim, esses resultados mostram que o metabissulfito de sódio e a cianobactéria *Synechococcus* sp. são tóxicos para diferentes organismos, evidenciados tanto pela toxicidade aguda quanto pela crônica.

Palavras-chaves: Metabissulfito de sódio, *Synechococcus* sp., Atividades enzimáticas, Carcinicultura, Impacto ambiental.

ABSTRACT

Farming of shrimp is an important economic activity; however, its exponential growth has attracted attention to the potential impacts brought over the environment. Wastewater generated by this activity can contribute to the eutrophication of waters receiving these effluents, as those may bear a variety of contaminants, such as sodium metabisulfite, a sulphitant agent that removes the oxygen from water and food. Additionally, this effluent carries the phytoplankton community that proliferates in these systems, which may include toxic cyanobacteria. Therefore, the aim of the present study was to perform an ecotoxicological assessment using biological test models and biological responses to evaluate potential impacts caused by use of sodium metabisulfite and by the proliferation of cyanobacteria in shrimp farming. Phytoplankton samples were collected in three shrimp farms from the state of Ceará for quantitative and qualitative analysis and for the isolation of cyanobacteria. The microorganisms, which were identified by morphological and molecular techniques, were grown in laboratory to obtain organic extracts on which were conducted toxicity tests with mice and mysids. Sodium metabisulfite was evaluated through acute toxicity tests using organisms at different trophic levels (microalgae, cladocerans, shrimps and fish) and by the rate of oxygen consumption and enzymatic activities (CAT, AChE and GST) in shrimps. On fish, tests evaluating the embriolarval development and enzymatic activities (AChE and GST) were performed. Qualitative and quantitative analysis of phytoplankton community showed a large number of species from nearly all classes of phytoplankton, including cyanobacteria. From this latter group, *Synechococcus* sp. was isolated and cultivated, and the extract generated from the living cells showed toxicity in mice, as evidenced by damage to the liver and kidneys of animals. For acute toxicity tests sodium metabisulphite showed an EC₅₀ of 24.29 mg/L for the microalgae and LC₅₀ of 34.90 mg/L and 69.65 mg/L for cladocerans and shrimp, respectively. Regarding the consumption of oxygen and enzymatic activities, these did not show significant differences when compared to their respective controls, except for the AChE in shrimp and GST in fish. On embriolarval developing of fish, sodium metabisulfite caused different types of effects, from destruction of eggs to deformities in larvae. Thus, these results show that sodium metabisulphite and the cyanobacteria *Synechococcus* sp. are toxic to other organisms, evidenced by both, acute and chronic toxicity.

Keywords: Sodium metabisulphite, *Synechococcus* sp., enzymatic activities, shrimp farms, environmental impact.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa com a localização das fazendas onde foram coletadas as amostras utilizadas no estudo.	39
Figura 2- Camundongos <i>Mus musculus</i>	41
Figura 3 - Fêmea e macho adultos de <i>Mysidopsis juniae</i>	45
Figura 4 - Variação quantitativa (céls./mL) do fitoplâncton e das cianobactérias nos dois viveiros analisados das três fazendas de cultivo de camarão marinho, nos períodos seco e chuvoso.	49
Figura 5 – Fotomicrografias das alterações histopatológica observadas nos rins dos animais tratados: A– áreas hemorrágicas; B – Hemorragia glomerular e tubular; C - Necrose tubular aguda ; D – Cilindrohialino.....	52
Figura 6 - Fotomicrografias das alterações histopatológica observadas no fígado dos animais tratados:A– tumefação dos hepatócitos; B – Esteatose em microgotas; C - Necrose focal dos hepatócitos; D – Focos inflamatórios.....	53
Figura 7 - <i>Planktrotrix agardii</i> (A) e <i>Synechococcus</i> sp.(B).....	53
Figura 8 - Cultivo de <i>Synechococcus</i> sp.....	54
Figura 9 – Microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	70
Figura 10 – Cladóceros <i>Daphnia magna</i>	71
Figura 11 – Camarão <i>Palaemon serratus</i>	71
Figura 12 – Peixe <i>Danio rerio</i>	72
Figura 13 - Taxa de inibição de crescimento de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> em diferentes concentrações de metabissulfito de sódio.	78
Figura 14 - Número de <i>Daphnia magna</i> mortos após exposição a diferentes concentrações do metabissulfito de sódio.	79

- Figura 15 - Número de *Palaemon serratus* mortos após exposição a diferentes concentrações do metabissulfito de sódio.80
- Figura 16 - Taxa do consumo de oxigênio de camarão *Palaemon serratus* após exposição por 24 horas ao metabissulfito de sódio (ANOVA unifatorial).....80
- Figura 17 - Atividade da AChE em cabeça de *Palaemon serratus*, expostos a diferentes concentrações do metabissulfito de sódio por 24 horas (A) e 48 horas (B). ANOVA unifatorial.....81
- Figura 18 - GST em hepatopâncreas de *P.serratus*, expostos ao metabissulfito de sódio por 24 horas (A) e 48 horas (B). ANOVA unifatorial.82
- Figura 19 - CAT em hepatopâncreas de *Palaemon serratus*, expostos em metabissulfito de sódio por 24 horas (A) e 48 horas (B). ANOVA unifatorial.82
- Figura 20 - Concentração letal média (CL₅₀) de 24, 48, 72 e 96 h de exposição ao metabissulfito de sódio dos ovos fertilizado de *Danio Rerio*.83
- Figura 21 - Porcentagem dos diferentes efeitos causados pela exposição de ovos de *Danio rerio* fertilizados ao metabissulfito de sódio.....84
- Figura 22 - Embriões e larvas de paulistinha expostos ao metabissulfito de sódio. A) Ovo coagulado com 24 h de exposição em 44 mg/L; B) Embrião com má formação com 48 h de exposição em 66 mg/L; C) Larva sem equilíbrio com 72 h de exposição em 66 mg/L; D) Larva normal com 96 h (controle).84
- Figura 23 - Atividades da AChE em cabeça de *Danio rerio*, expostos em metabissulfito de sódio por 96 horas. ANOVA unifatorial.....85
- Figura 24 - GST em fígado (A), brânquia (B), músculo (C) e cabeça (D) de *D. rerio*, expostos em metabissulfito de sódio por 96 horas. ANOVA unifatorial.86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fazenda, ciclo, período das coletas e análises histopatológicas dos camundongos tratados com extratos da comunidade fitoplanctônica da água de cultivo de camarão marinho. “X” significa presença do dano.....51

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica (cel.mL ⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda A, coletados no período seco.....	122
Anexo 2. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica fitoplanctônica (cel.mL ⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda B, coletados no período seco	123
Anexo 3. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica fitoplanctônica (cel.mL ⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda C, coletados no período seco	124
Anexo 4. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica fitoplanctônica (cel.mL ⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda A, coletados no período chuvoso.....	125
Anexo 5. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica fitoplanctônica (cel.mL ⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda B, coletados no período chuvoso.....	127
Anexo 6. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica fitoplanctônica (cel.mL ⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda C, coletados no período chuvoso.....	129
Anexo 7. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda A (período seco) em camundongos <i>Mus musculus</i> (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média ± EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).....	131
Anexo 8. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda C (período seco) em camundongos <i>Mus musculus</i> (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média ± EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).....	132
Anexo 9. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda A (período chuvoso) em camundongos <i>Mus musculus</i> (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média ± EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).....	133
Anexo 10. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda A (período chuvoso) em camundongos <i>Mus musculus</i> (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média ± EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).....	134
Anexo 11. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda B (período chuvoso) em camundongos <i>Mus musculus</i> (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais	

- retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média \pm EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).....135
- Anexo 12. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda C (período chuvoso) em camundongos *Mus musculus* (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média \pm EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).....136
- Anexo 13. Variáveis físico-químicas mensuradas no início e término dos ensaios com *Mysidopsis juniae* expostos ao extrato metanólico de *Synechococcus* sp.....137
- Anexo 14. Variáveis físico-químicas mensuradas no início e término dos ensaios com *Daphnia magna* expostos ao metabissulfito de sódio.....137
- Anexo 15. Variáveis físico-químicas mensuradas durante a exposição de *Palaemon serratus* ao metabissulfito de sódio.....138

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
ASN III	Meio de cultivo para cianobactérias marinhas
ASTM	Meio de cultivo para Daphnias
CAT	Catalase
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CE ₅₀	Concentração Efetiva Mediana
CL ₅₀	Concentração Letal Mediana
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DL ₅₀	Dose Letal mediana
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DSS	Dodecil Sulfato de Sódio
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA	Food and Drugs Administration
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona-S-Transferase
GT-Carcinicultura	Grupos de Trabalhos sobre a Carcinicultura
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IMNV	Vírus da Mionecrose Idiopática
LABOMAR/UFC	Instituto de Ciências do Mar – Universidade Federal do Ceará
LEGE	Laboratório de Ecotoxicologia, Genética e Evolução
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
LR	Variante da Microcistina
MBS	Metabissulfito de Sódio
MBL	Meio de cultivo para Microalgas
MCs	Microcistinas
OD	Oxigênio dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORAC	Oxygen-Radical Absorbancy Capacity

P.A.	Pureza analítica
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PL's	Pós-Larvas
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
RR	Variante da Microcistina
rRNA	RNA Ribossômico
SOD	Superóxido Dismutase
TAQ DNA	Enzima Taq Polimerase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TPH	Enzima Triptofano Hidroxilase
YR	Variante da Microcistina

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	24
1.1. Produção da Aquicultura: Camarão Marinho	24
1.2. Cultivo de Camarão Marinho no Brasil	25
1.3. Impactos Gerados Pelo Cultivo de Camarão Marinho	26
1.4. Ensaio Ecotoxicológicos	30
2. CAPÍTULO 1: Toxicidade da Comunidade Fitoplanctônica Presente nos Viveiros de Cultivo de Camarão Marinho: Ênfase na Cianobactéria <i>Synechococcus</i> sp.....	33
2.1. Introdução	33
2.2. Objetivos.....	37
2.2.1. Objetivo geral.....	37
2.2.2. Objetivos específicos	37
2.3. Material e Métodos	38
2.3.1. Área de estudo.....	38
2.3.2. Coleta das amostras.....	39
2.3.3. Análise da assembléia fitoplanctônica	40
2.3.3.1. Estrutura da assembléia fitoplanctônica.....	40
2.3.3.2. Obtenção dos extratos	41
2.3.3.3. Avaliação da toxicidade	41
2.3.4. Isolamento e identificação das cianobactérias	42

2.3.4.1. Isolamento e identificação morfológica.....	42
2.3.4.2. Identificação genotípica.....	42
2.3.5. Obtenção do extrato da cianobactéria.....	44
2.3.6. Avaliação da toxicidade da cianobactéria.....	45
2.3.7. Análises estatísticas.....	46
2.4. Resultados.....	47
2.4.1. Assembléia fitoplanctônica.....	47
2.4.1.1. Composição específica e abundância relativa.....	47
2.4.1.2. Ensaio de toxicidade.....	50
2.4.2. Cianobactérias.....	53
2.4.2.1. Isolamento e identificação morfológica.....	53
2.4.2.2. Identificação genotípica.....	54
2.4.2.3. Ensaio de toxicidade.....	54
2.5. Discussão.....	56
2.6. Conclusões.....	64
3. CAPÍTULO 2. Toxicidade do Metabissulfito de Sódio.....	65
3.1. Introdução.....	65
3.2. Objetivos.....	69
3.2.1. Objetivo geral.....	69
3.2.2. Objetivos específicos.....	69

3.3. Material e Métodos	70
3.3.1. Solução estoque	70
3.3.2. Organismos teste	70
3.3.2.1. <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	70
3.3.2.2. <i>Daphnia magna</i>	70
3.3.2.3. <i>Palaemon serratus</i>	71
3.3.2.4. <i>Danio rerio</i>	72
3.3.3. Avaliação da toxicidade.....	72
3.3.3.1. Inibição do crescimento	72
3.3.3.2. Ensaio de letalidade.....	73
3.3.3.3. Efeitos fisiológicos nos camarões	73
3.3.3.4. Ensaio com <i>Danio rerio</i>	76
3.3.4. Análises estatísticas	77
3.4. Resultados	78
3.4.1. Avaliação da toxicidade	78
3.4.1.1. Inibição do crescimento: <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	78
3.4.1.2. Ensaio de letalidade.....	78
3.4.1.3. Efeitos fisiológicos nos camarões.....	80
3.4.1.4. Ensaio com <i>Danio rerio</i>	82
3.5. Discussão	87

3.6. Conclusões.....	96
4. Considerações Finais	97
5. Referências Bibliográficas.....	99
6. Anexos.....	122

1. Introdução Geral

1.1. Produção da Aquicultura: Camarão Marinho

O cultivo de camarão surgiu para satisfazer as necessidades de subsistência e, em alguns países como Taiwan, Filipinas e Indonésia, estes eram um subproduto da criação de peixes. Essa atividade teve sua origem histórica no sudoeste da Ásia, com o acompanhamento do desenvolvimento de pós-larvas selvagens no ambiente natural e posteriormente com o desenvolvimento da produção de pós-larvas da espécie *Marsupenaeus japonicus* em escala comercial no início da década de 1930. Já no Brasil, a carcinicultura surgiu na década de 1970, com o incentivo do governo do Rio Grande do Norte, mas apesar de diversas tentativas utilizando várias espécies nativas como *Farfantepenaeus subtilis*, *Litopenaeus schmitti*, *Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*, a carcinicultura só se consolidou em 1995/1996, com a reprodução e larvicultura de uma espécie do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (PLATAFORMA TECNOLÓGICA, 2001).

A aquicultura é o setor de produção de alimentos que apresenta maior crescimento em escala mundial, responsável por aproximadamente 50% do total de frutos do mar comercializado atualmente. Enquanto a pesca e a pecuária aumentam a um ritmo de 1,2 e 2,8% ao ano, respectivamente, o cultivo de organismos aquáticos cresce a uma taxa média anual de 8,8% desde 1970 (FAO, 2007). Apesar do crescimento, será necessária uma produção de 40 milhões de toneladas adicionais até 2030 para atender a demanda per capita atual de pescado.

Segundo Rocha; Rocha (2010a) o maior produtor mundial é o continente asiático com 91,36%, seguido pela Europa (3,43%), América do Sul (2,15%), América do Norte e Central (1,41%), África (1,40%) e Oceania (0,25%). A aquicultura brasileira em 2008 representou apenas 0,42% da produção mundial, com a produção de peixes representando (72,68%), crustáceos (22,49%), moluscos (4,62%) e anfíbios (0,2%). Já em relação ao cultivo de camarão, os principais países produtores são China, seguida por Tailândia, Vietnã, Equador, México e Brasil. Neste último, o camarão marinho *Litopenaeus vannamei* contribuiu com 65.000 t, enquanto que o camarão gigante-da-malásia, *Macrobrachium rosenbergii*, com apenas 250 t no ano de 2008.

Ainda em relação ao cultivo de camarão marinho, área do Brasil com potencial para a exploração da carcinicultura é de 600.000 ha, mas se utiliza apenas um terço dessa extensão (200.000 ha). Com o conhecimento tecnológico atual seria possível obter uma produção de 1.000.000 t/ano, contribuindo na geração de 750.000 empregos diretos e gerando uma receita de R\$ 10 bilhões de reais. Mas apesar de tudo isso existe ainda uma falta de apoio e de incentivo governamental dispensados ao desenvolvimento da carcinicultura (ROCHA; ROCHA, 2010a).

1.2. Cultivo de Camarão Marinho no Brasil

O cultivo de camarão em todo o mundo é conduzido por três tipos de sistemas de produção, cuja principal diferença entre eles é a densidade de povoamento por metro quadrado de lâmina d'água de viveiro, sendo:

- Sistema extensivo: 1 a 4 camarões/m², com alimento natural.
- Sistema semi-intensivo: 5 a 30 camarões/m², com alimento natural e suplementar.
- Sistema intensivo: 30 a 120 camarões/m², com alimento consistindo exclusivamente em ração balanceada.

Dentre os sistemas listados acima, o extensivo e semi-intensivo são mais amplamente difundidos nos países em desenvolvimento (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2002).

O cultivo de camarão marinho compreende basicamente duas fases: a larvicultura, responsável pela produção de larvas, e a engorda, responsável pelo crescimento do camarão até a idade comercial. A larvicultura é realizada em laboratórios especializados subdivididos em dois diferentes setores: a maturação e o berçário. Na maturação ocorre o acasalamento e desova. Posteriormente, as larvas recém-eclodidas vão para a larvicultura, permanecendo neste setor até atingirem o estágio de pós-larva, quando estão prontas para os viveiros de engorda (MCVEY, 1993).

Antes de realizar a transferência das pós-larvas (PLs), os viveiros de engorda passam por três etapas para oferecer as melhores condições de sobrevivência e crescimento dos camarões. A primeira etapa consiste na limpeza e desinfecção dos viveiros, onde é aplicado hipoclorito de cálcio, com o objetivo de eliminar componentes tóxicos do solo (nitrato,

amônia, H_2S , Fe_2^+ etc.), acelerar a decomposição da matéria orgânica e eliminar competidores, predadores e organismos causadores de doenças (HERNANDÉZ; NUNES, 2001). Em seguida, procede-se com a calagem dos viveiros. O principal propósito desse processo é corrigir a acidez do solo, para isso utiliza-se normalmente óxido de cálcio (CaO), hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$), carbonato de cálcio ($CaCO_3$) ou calcário agrícola dolomítico ($CaCO_3MgCO_3$) (NUNES, 2001). Por fim, realiza-se a chamada fertilização dos viveiros. Essa consiste em dar aos viveiros as condições físico-químicas e biológicas adequadas para a recepção das PLs. Os fertilizantes podem ser de dois tipos: orgânicos (excrementos de aves, bois etc.) e inorgânicos (uréia, superfosfato simples, superfosfato triplo e sulfato de amônia) (BOYD; GAUTIER, 2000).

Os camarões permanecem nesses viveiros, em geral, por 90 a 120 dias, quando atingem um peso médio de 12 g e são despescados. O método mais comum para a despesca é através de redes chamadas “bagnet”, posicionadas no lado de fora da comporta de drenagem do viveiro. Quando a rede se encontra com uma quantidade razoável de camarões, esta é retirada e os animais colocados em uma solução aquosa com gelo e metabissulfito de sódio, para evitar a melanose ou manchas pretas na carapaça dos animais. A concentração e tempo de imersão nessa solução varia de acordo com o produtor. Posteriormente são transferidos para caixas de isopor com gelo e levados para as indústrias de beneficiamento (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2002).

1.3. Impactos Gerados Pelo Cultivo de Camarão Marinho

Apesar do cultivo de camarão ser uma importante atividade econômica, principalmente para a região nordeste, onde está mais concentrada, o crescimento dessa indústria tem atraído a atenção para as possíveis contribuições negativas ao meio ambiente. Segundo Páez-Osuna (2001) esses cultivos podem causar vários impactos ambientais, dependendo de fatores como a localização da fazenda, manutenção e uso de tecnologia durante a operação dos viveiros, escala de produção e a capacidade de depuração do corpo d'água.

AnH *et al.* (2010) afirmam que alguns dos problemas gerados ao meio ambiente pela carcinicultura estão associados à poluição das águas, sedimentos contaminados e propagação de doenças. Tudo isso devido ao uso de produtos químicos, medicamentos e fertilizantes,

utilização dos recursos hídricos e de ração peletizada, descargas das águas e sedimentos residuais.

Segundo SAMOCHA *et al.* (2004) as águas residuais geradas pelo cultivo de camarão são contribuidoras potenciais para a eutrofização das águas receptoras desses efluentes, já que possuem matéria orgânica particulada viva e morta, matéria orgânica dissolvida, amônia, nitrito, nitrato, fosfatos, partículas de sólidos em suspensão e outras substâncias que podem ser consideradas contaminantes potenciais. Essas substâncias podem ser pesticidas e antibióticos, utilizados para reduzir o risco de perda na produção (LE *et al.*, 2005; TU *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2008) e também o uso do metabissulfito de sódio durante a despesca dos viveiros, como aditivo químico, sendo esse lançado normalmente sem tratamento no corpo hídrico.

Em relação ao metabissulfito de sódio, Meng; Nie (2005a) afirmam que esta substância ou seus derivados como o dióxido de enxofre (SO₂) podem ser citotóxicos ou genotóxicos, por isso há necessidade de um maior cuidado no manuseio, ao utilizá-lo em alimentos e de encontrar outras substâncias com as mesmas propriedades, mas que sejam mais seguros para substituí-lo.

A toxicidade dessa substância no meio ambiente dá-se principalmente pela retirada do oxigênio dissolvido na água, ocasionando a mortandade por asfixia da fauna e flora. Tal fato foi confirmado por Aragão *et al.* (2008) ao analisarem a toxicidade da solução do metabissulfito de sódio preparado em uma fazenda de cultivo de camarão marinho no momento da despesca. Os valores do oxigênio dissolvido variaram de 0,14 a 0,23 mg/L e o pH de 4,09 a 5,43, o que contribuiu para a imediata mortandade dos organismos testes (*Misidopsis juniae*) em laboratório.

Segundo Boyd (1989) o oxigênio dissolvido é o indicador mais crítico da qualidade de água na aquicultura, já que controla o crescimento e sobrevivência dos animais cultivados. Sendo assim, esta variável influencia os organismos que habitam as águas dos corpos receptores dos efluentes dessas atividades.

Com tudo isso, é grande a preocupação sobre o uso desses compostos, incluindo a sua persistência em ambientes aquáticos, a possibilidade de resíduos nos organismos não-

cultivados, a toxicidade nas espécies não-alvo, os efeitos sobre a biogeoquímica dos sedimentos, além dos possíveis efeitos sobre a saúde dos trabalhadores.

Não bastassem todos esses químicos antropogênicos, existe também nessas águas toda uma comunidade fitoplanctônica, que é necessária para manter uma boa qualidade da água dos viveiros, mas que se não tiver um manejo adequado pode acarretar no crescimento exagerado e dominância de alguns grupos, como as cianobactérias. Segundo YUNES *et al.* (2001), esse crescimento exagerado altera o equilíbrio ecológico do ecossistema aquático, no entanto, o mais grave é que certas espécies são capazes de produzir toxinas que podem ser acumuladas na teia alimentar e produzir diferentes sintomas de intoxicação, atingindo conjuntos de organismos muito além da comunidade aquática.

A intoxicação de organismos aquáticos por cianobactérias tóxicas está bem documentada em ecossistemas de água doce (CODD *et al.*, 2005). Mas, segundo Martins *et al.* (2007) em ambientes marinhos essas intoxicações são menos frequentes e localizadas.

Entre 1989 e 1991 vários estudos foram realizados em duas fazendas de cultivo de camarão (*L. vannamei*) no norte e sul da província de Sinaloa – México, onde foram registradas as ocorrências de algumas microalgas que são consideradas nocivas ou tóxicas para camarões. As espécies mais abundantes foram as cianobactérias *Anabaena* spp., *Anabaenopsis elenkinii* e *Oscillatoria limnetica* (ALONSO-RODRÍGUEZ; PÁEZ-OSUNA, 2003). Já, Linares *et al.* (2003) utilizando PLs de *L. vannamei* em bioensaios, demonstraram que o consumo da cianobactéria *Schizothrix calcicola* por esses animais durante 15 dias causava danos ao hepatopâncreas, afetando a absorção alimentar e conseqüentemente os processos de crescimento e desenvolvimento.

Em um estudo para avaliar a distribuição e o acúmulo de microcistina-LR e RR em vários órgãos dos camarões *Palaemon modestus* e *Macrobrachium nipponensis*, foi mostrado que a mesma se acumula em grandes quantidades no hepatopâncreas e gônadas desses animais. Os ovos também foram capazes de acumular microcistinas, mostrando assim, a transferência dessa toxina para a prole. Em relação às amostras de músculo, 31% das amostras analisadas estavam acima do limite aceitável para ingestão diária estabelecido pela OMS (CHEN; XIE, 2005).

Em muitos outros organismos tem sido estudada a intoxicação devida às cianobactérias ou às cianotoxinas, como em cladóceros (OKUMURA *et al.*, 2004; FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009), diversos invertebrados marinhos (METCALF *et al.*, 2002; BEATTIE *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2007; HISEM *et al.*, 2011), camundongos (KURODA *et al.*, 2007; MOHAMED, 2008), peixes (SILVA, 2009; NYAKAIRU *et al.*, 2010) e até em plantas aquáticas (SAQRANE *et al.*, 2007).

Segundo Martins *et al.* (2007) a produção dos metabólitos tóxicos pelas cianobactérias pode representar um risco ecológico para embriões e larvas de organismos marinhos, constituindo assim uma ameaça para a saúde dos ecossistemas.

Para os seres humanos, os principais sintomas de intoxicação são distúrbios hepáticos, neurológicos, gastrointestinais e reações alérgicas (AZEVEDO, 1998), devido aos diferentes tipos de toxinas produzidas por esses organismos. A exposição a esses microrganismos também pode levar ao óbito, como o ocorrido em uma clínica de hemodiálise em Pernambuco (AZEVEDO *et al.*, 2002). Segundo Dawson (1998) as microcistinas (MCs), como a variante MC-LR, são altamente tóxicas para mamíferos, com uma DL₅₀ em camundongos de 36 a 122 µg/kg.

Tal como acontece com outras atividades, gado e agricultura por exemplo, a aquicultura produz resíduos que são transportados para fora do sistema de produção. Para a “European Water Framework Directive”, esses efluentes são considerados fontes pontuais de poluição. No entanto, cada país europeu tem o direito de definir suas próprias regras para evitar os efeitos nocivos ao ambiente (BERGHEIM; BRINKER, 2003). Na Alemanha, por exemplo, cada autoridade local pode definir normas próprias para esses descartes, sendo mais utilizados os parâmetros químicos, como DBO, fósforo, nitrogênio etc., para monitoramento da qualidade do efluente e do risco ambiental associado ao seu descarte (SCHOBERT *et al.*, 2001; SINDILARIU, 2007).

No Brasil, a Resolução CONAMA n° 312/02 dispõe sobre o licenciamento ambiental dos empreendimentos de carcinicultura na zona costeira e indica que, a critério do órgão licenciador, deve ser solicitada a construção de bacia de sedimentação como etapa intermediária entre a circulação ou o deságue das águas servidas ou, quando necessário, a utilização da água em regime de recirculação nos empreendimentos da carcinicultura.

Além disso, indica que a água utilizada por esses empreendimentos deverá retornar ao corpo d'água de qualquer classe atendendo às condições definidas pela Resolução CONAMA nº 357/05. Nesta, os padrões de lançamento incluem as variáveis físico e químicas, presença de óleos e graxas, materiais sedimentáveis, algumas substâncias orgânicas e inorgânicas e ainda exigem que o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, onde os critérios de toxicidade devem basear-se em ensaios ecotoxicológicos, ensaios esses que, pela primeira vez na legislação brasileira, tem seu uso exigido como padrão de qualidade de água.

Contudo, segundo um estudo realizado pelo IBAMA (2005) sobre os impactos ambientais dessa atividade no estado do Ceará, 77% das fazendas de carcinicultura não possuíam bacias de sedimentação, lançando diretamente seus efluentes na água dos rios, lagoas e estuários. Tal fato também foi relatado pelo GT-Carcinicultura (2005), avaliando 11 estabelecimentos nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Bahia, que além de diversos impactos, como supressão e aterro em área de manguezal, mortalidade de mangue adjacente e próximo aos tanques de carcinicultura, tanques implantados em áreas de proteção ambiental, foi observado o descarte dos efluentes dos viveiros diretamente no canal do estuário e os dados de Joventino; Maiorga (2008) apontam que 100% das fazendas pesquisadas na região de Fortim-Ce não possuíam tratamento de suas águas antes de liberá-las para o ambiente.

1.4. Ensaio Ecotoxicológicos

Na década de 1960, Estados Unidos, Canadá e vários países da Europa começaram a realizar pesquisas na área da biologia e toxicologia aquática, com o intuito de verificar a toxicidade de efluentes e substâncias químicas industriais e urbanas sobre a biota e habitats (RAND, 1995).

O termo ecotoxicologia foi primeiramente utilizado por Truhaut em 1969 como uma extensão natural da toxicologia (HOFFMAM *et al.*, 2003). Esta é uma ciência multidisciplinar que permite a integração dos conceitos da ecologia, no que diz respeito à diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico no ecossistema, e da toxicologia, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre as comunidades biológicas.

A resposta biológica a agressões ambientais pode ser evidenciada em qualquer nível de organização biológica, desde ecossistemas até compartimentos subcelulares ou reações bioquímicas intracelulares, passando por comunidades, populações, organismos, sistemas fisiológicos e células (WALKER *et al.*, 1997).

Os ensaios ecotoxicológicos são considerados os melhores métodos para estimar os efeitos de múltiplos contaminantes e determinar o potencial tóxico dos mesmos, desde que o organismo-teste seja sensível e as variáveis avaliadas ao final do teste sejam bem escolhidas (USEPA, 2002). Para uma melhor avaliação desses efeitos, Zagatto; Bertoletti (2006) recomendam a utilização de espécies representativas de diferentes níveis tróficos, e ainda espécies com estabilidade genética e obtenção de lotes uniformes. Uma das grandes vantagens desses ensaios é a capacidade de integrar os efeitos de misturas complexas de poluentes e interações contaminantes-fatores abióticos sobre os organismos.

Esses ensaios podem ser divididos em agudo e crônico. Os agudos avaliam os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico em um curto período de tempo, geralmente de um a quatro dias. Usualmente os critérios para avaliação são a mortalidade e imobilidade dos organismos-testes. Já os crônicos avaliam os efeitos causados pelos poluentes em todo ciclo de vida ou em parte do ciclo de vida de uma espécie e medem variáveis subletais como crescimento, sucesso reprodutivo, efeitos bioquímicos etc (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Vários trabalhos relatam o uso de ensaios ecotoxicológicos no monitoramento ambiental com organismos de diferentes níveis tróficos, como os de Perrodin *et al.* (2006) que avaliaram os riscos ecotoxicológicos da deposição no solo do material dragado na França, utilizando as espécies *Lolium perenne*, *Escherichia coli*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ceriodaphnia dubia* e *Xenopus laevis*. Pérez *et al.* (2010) analisaram a qualidade do reservatório de Alqueva (Portugal) utilizando bioensaios com *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chironomus riparius* e *Vibrio fischeri* e Coelho *et al.* (2011) estudaram os efeitos letais e sub-letais do triclorofon em algas, crustáceos e peixes.

De acordo com Walker; Livingstone (1992) o uso de biomarcadores como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais é um método de detecção preventiva de efeitos

adversos para a avaliação do impacto da poluição, principalmente os efeitos toxicológicos de contaminantes de produtos da aquicultura, como os efluentes, já que é impraticável analisar todas as substâncias químicas individuais presentes em uma mistura de contaminantes e estas medidas não fornecem estimativas dos efeitos deletérios sobre os organismos vivos.

Diversos animais aquáticos estão sendo utilizados como organismos-testes nesses estudos. Moluscos da espécie *Mytilus galloprovincialis* foram usados para avaliar os efeitos na atividade da glutathione-S-transferase, quando expostos à células tóxicas, extratos e toxina pura da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Key *et al.* (2008) utilizaram camarões *Palaemonetes pugio* para avaliar a toxicidade e efeitos fisiológicos do difenil polibromado, um agente antichamas, a partir da análise de quatro biomarcadores: glutathione-S-transferase, colesterol, peroxidação lipídica e acetilcolinesterase. Em outro estudo, Vernouillet *et al.* (2010) estudaram os efeitos da carbamazepina, um medicamento antiepilético, encontrado em águas de esgotos municipais, em diferentes níveis tróficos (alga, crustáceo e um cnidário), mensurando as atividades do citocromo P-450, glutathione-S-transferase, peroxidação lipídica, entre outros.

Com o reconhecimento da importância da carcinicultura marinha como atividade produtiva para a região nordeste que pode gerar impactos ambientais, este trabalho busca uma avaliação detalhada utilizando diferentes abordagens ecotoxicológicas dos possíveis efeitos gerados por essa atividade, através do uso do metabissulfito de sódio na despesca do camarão, como também, a toxicidade de espécies do fitoplâncton, como as cianobactérias, as quais são reconhecidamente um problema de saúde pública, e que tem seu crescimento estimulado pelo uso de fertilizantes durante o cultivo dos animais nessa atividade. Vale salientar que toda água utilizada nesses cultivos retorna ao corpo hídrico, muitas vezes sem tratamento adequado.

2. CAPÍTULO 1: Toxicidade da Comunidade Fitoplanctônica Presente nos Viveiros de Cultivo de Camarão Marinho: Ênfase na Cianobactéria *Synechococcus* sp.

2.1. Introdução

Uma das principais preocupações dos criadores de camarão está relacionada com a qualidade da água, a qual é o meio onde o animal vive e respira, além de ser um importante vetor de enfermidades. Devido ao uso de fertilizantes para promover o crescimento algal, aliado ao uso de rações e fezes dos animais, as águas dos viveiros podem se tornar eutrofizadas caso não haja um manejo adequado levando, como consequência, ao crescimento exagerado do fitoplâncton (GUO; LI, 2003)

O fitoplâncton está na base da cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos. As microalgas fitoplanctônicas são em sua grande maioria autotróficas e unicelulares, solitárias ou coloniais. As principais divisões do fitoplâncton em águas continentais são: Cyanophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Crysophyta e Pyrrophyta (HOEK *et al.*, 1995).

As cianobactérias pertencem à classe *Cyanophyceae*, e por serem procariontes, estão classificadas no reino das bactérias, e são ainda fotossintetizantes e gram-negativas (MANKIEWICZ *et al.*, 2003). Foram provavelmente um dos primeiros produtores de matéria orgânica e produtores de oxigênio para a atmosfera primitiva, estando entre as primeiras formas de vida na terra (WHO, 1999). Esses organismos apresentam uma elevada capacidade de tolerância, que pode estar ligada à sua taxa de evolução extremamente lenta (ADAMS; DUGGAN, 1999), podendo ser encontrados em águas superficiais com diferentes salinidades, temperaturas e intensidades luminosas (FUNARI; TESTAI, 2008) e ainda em rochas e solos desempenhando importante papel nos processos de ciclagem de nutrientes (CALIJURI *et al.*, 2006).

Diferente da maioria dos organismos procariotos, as cianobactérias apresentam uma grande diversidade morfológica, fisiológica e metabólica (DITTMANN; WIEGAND, 2006). Morfologicamente, podem ocorrer nas formas solitárias, filamentosas ou em cadeias (CALIJURI *et al.*, 2006) e várias espécies podem ainda apresentar um crescimento exagerado (“blooms”) em corpos d’água superficiais, tendo como efeitos a diminuição da transparência das águas, elevadas alterações dos níveis de oxigênio e a liberação de toxinas (MANKIEWICZ *et al.*, 2003; VASCONCELOS, 2006). Essas toxinas têm efeitos

adversos em células e tecidos de outros organismos (PEARSON; NEILAN, 2008). No grupo das cianobactérias, nem todas produzem tais toxinas, mas muitos gêneros potencialmente produtores são distribuídos mundialmente (CARMICHAEL, 1992). Entre os aproximadamente 150 gêneros descritos de cianobactérias, Vasconcelos (2001) e Apeldoorn *et al.* (2007) estimam que cerca de 40 sejam produtores de toxinas, sendo os mais importantes: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* e *Oscillatoria*.

As toxinas produzidas por esses organismos, chamadas cianotoxinas, constituem uma grande fonte de metabólitos secundários tóxicos e podem ser categorizadas de acordo com suas propriedades toxicológicas, as quais são divididas principalmente em neurotoxinas e hepatotoxinas, e ainda em dermatotoxinas e as promotoras de tumor (MSAGATI *et al.*, 2006). Cada cianotoxina pode ser produzida por mais de uma espécie e uma mesma espécie pode produzir diferentes toxinas (FUNARI; TESTAI, 2008).

As neurotoxinas envolvem Anatoxina A, um alcalóide e potente agonista nicotínico da acetilcolina, a Anatoxina A (S), um éster metil-fosfato que age como inibidor irreversível da acetilcolinesterase, e as Saxitoxinas, também conhecidas como PSP, que provocam bloqueio nos canais de sódio nas membranas dos neurônios (CHOURUS; BARTRAM, 1999). As principais espécies produtoras são do gênero *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Oscillatoria* (HANSEN *et al.*, 2001).

As hepatotoxinas são os tipos mais comuns de toxinas e compreendem os hepatapeptídeos cíclicos (microcistinas), os pentapeptídeos cíclicos (nodularinas) e alcalóides como as cilindrospermopsinas. O modo de ação dessas dá-se através da ruptura dos filamentos da actina e dos filamentos intermediários do citoesqueleto dos hepatócitos. Esta desorganização leva a uma retração dos hepatócitos, provocando a perda de contato entre eles com as células que formam os capilares sinusoidais, assim o fígado desenvolve graves lesões internas (HANSEN *et al.*, 2001). As principais espécies produtoras são as do gênero *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Cylindrospermopsis* (CARMICHAEL, 1992).

Alguns trabalhos têm relatado a produção de toxinas do tipo microcistinas pelo gênero *Synechococcus*. Martins *et al.* (2005), analisando a toxicidade de cepas isoladas da costa

portuguesa, observaram efeitos neurotóxicos e hepatóxicos em camundongos, e afirmam ainda que os danos histopatológicos em diferentes órgãos poderiam ser atribuídos à presença de microcistina, produzida por este gênero. Isto foi corroborado por Carmichael; Li (2006), que estudando cianobactérias de Salton Sea, na Califórnia, observaram a produção de microcistina por esse gênero, nas variantes de LR e YR, nas quatro cepas isoladas. Em outro estudo desenvolvido por Mohamed (2008), das 16 espécies de cianobactérias que foram isoladas de fontes termais na Arábia Saudita e cultivadas, apenas duas apresentaram produção de microcistina, entre elas a espécie *Synechococcus lividus*.

A cianobactéria *Synechococcus* é um gênero cocoide unicelular, pertencente à família *Synechococcaceae* (Nägeli, 1849). Ocorrem principalmente no plâncton, metafíton e sobre pedras. As células são cilíndricas a longo-cilíndricas, algumas vezes arcuadas ou sigmóides, de tamanho variando de 0,6 µm a 1,6 µm e se reproduzem por fissão binária (BICUDO; MENEZES, 2006). São conhecidas 21 espécies deste gênero sendo distribuídas em todos os ambientes marinhos, onde já foram encontradas em concentrações de 5×10^5 a $1,5 \times 10^9$ cel./L, mas também há relatos de espécies de água doce (PARTENSKY *et al.*, 1999; MOORE *et al.*, 1995).

Synechococcus é tem um importante papel na produção primária nos oceanos, contribuindo com aproximadamente 39% da produção primária total do plâncton (AGAWIN *et al.*, 1998). Apesar da associação com mar aberto, torna-se cada vez mais evidente que esse gênero tem contribuído significativamente para florações algais em regiões tropicais e subtropicais. Alguns eventos foram descritos na baía de Pensacola (Flórida) e baía da Flórida (PHLIPS *et al.*, 1999), baía de São Francisco (NING *et al.*, 2000), no Mar Mediterrâneo (PEREZ; CARRILLO, 2005), e ainda a ocorrência em uma gama de sistemas marinhos (LI, 1998; PEREZ; CARRILLO, 2005).

Com isso, cresce a preocupação acerca desses microrganismos com relação à saúde pública e dos animais aquáticos, principalmente os cultivados, já que muitos autores (ANCIUTTI; COCHÔA, 2010; LOPES *et al.*, 2010; SIEROSŁAWSKA *et al.*, 2010) têm demonstrado que essas florações de cianobactérias ocorridas em diferentes países, mostraram-se tóxicas em bioensaios para diversas espécies, inclusive de mamíferos.

Como dito anteriormente, as florações de fitoplâncton são comuns em viveiros de cultivo de camarão marinho, e as cianobactérias estão entre os principais organismos presentes nestas florações (ZIMBA *et al.*, 2006; PEREIRA NETO *et al.*, 2008). Entretanto, estudos voltados para a avaliação da contribuição tóxica destas florações ao ambiente são ainda escassos, principalmente se considerarmos a realização de bioensaios em organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos. A abordagem mais comumente encontrada é a avaliação do comprometimento da qualidade de água, principalmente no que diz respeito à eutrofização dos corpos d'água, devido a preocupação em relação à saúde pública (BRANDÃO, 2008; MANTOVANI *et al.*, 2011). Sendo assim, esse estudo visa avaliar a toxicidade de extratos da assembléia fitoplanctônica, bem como um estudo da contribuição tóxica de uma cepa de *Synechococcus* sp. isolada da água dos viveiros de cultivo de camarão em diferentes organismos.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo geral

Avaliar a toxicidade de extratos da assembléia fitoplanctônica e de cianobactérias presentes na água de viveiros de cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em diferentes organismos.

2.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a estrutura da assembléia fitoplanctônica da água dos viveiros de cultivo de camarão marinho em relação a composição específica e a abundância relativa.
- ✓ Verificar a toxicidade do extrato da assembléia fitoplanctônica em camundongos.
- ✓ Isolar cianobactérias da água de cultivo de camarão marinho e cultivá-las em laboratório.
- ✓ Identificar, através de técnicas morfológicas e de biologia molecular, as cianobactérias isoladas da água dos viveiros de cultivo de camarão marinho.
- ✓ Verificar a toxicidade do extrato e das células vivas das cianobactérias isoladas em camundongos.
- ✓ Avaliar a toxicidade do extrato da cianobactéria isolada em misidáceos.

2.3. Material e Métodos

2.3.1. Área de estudo

Para o estudo, foram selecionadas três fazendas de carcinicultura onde foram realizadas as coletas, uma delas localizada no litoral leste e duas no litoral oeste do estado do Ceará (Figura 1).

A fazenda A está situada na zona rural do município de Granja e é banhada pelo rio Coreaú, cuja bacia está localizada entre as latitudes 02°54'S e 03°42'S e longitudes 40°30'W e 41°00'W, tendo suas nascentes na Serra da Ibiapaba. O rio Coreaú tem uma extensão total de aproximadamente 150 Km, tendo como afluente principal o rio Itacolomi. O manguezal compreende uma área de aproximadamente 4.620 ha, correspondendo a 20% dos manguezais do Ceará. Com uma área de 47,99 ha de espelho d'água, distribuídos em 60 ha com 12 viveiros, esta fazenda é considerada de médio porte. Tem uma produtividade média de 1.800 kg/ha/ciclo, trabalhando em um sistema extensivo. Não apresenta sistema de recirculação de água, nem bacia de decantação.

A fazenda B está localizada no rio Acaraú, cuja bacia hidrográfica abrange um total de 27 municípios numa área de 14.000 km², sendo considerada a segunda maior bacia hidrográfica do Ceará, onde estão alguns dos mais importantes açudes cearenses. O rio Acaraú nasce na Serra das Matas percorrendo 320 km até chegar ao mar na cidade de Acaraú. Com 70 ha e 13 viveiros, esta fazenda é considerada de médio porte. Tem uma produtividade média de 1.500 kg/ha/ciclo, trabalhando em um sistema semi-intensivo/extensivo. Também não apresenta sistema de recirculação de água nem bacia de decantação.

A fazenda C está ligada ao regime de água do rio Jaguaribe, que tem 610 Km em sua totalidade e uma bacia de cerca de 72.043 Km², que drena as partes meridional e oriental do Estado do Ceará. Essa região encontra-se inserida no litoral Leste, a cerca de 125 Km da cidade de Fortaleza. Com 700 ha e 222 viveiros com tamanho médio de 2 ha, é uma fazenda de grande porte e apresenta sistema de cultivo semi-intensivo com média de 30 camarões por m². A produção média é de 2.300 kg/ha/ciclo. Possui duas bacias de decantação e uma recirculação parcial da água.

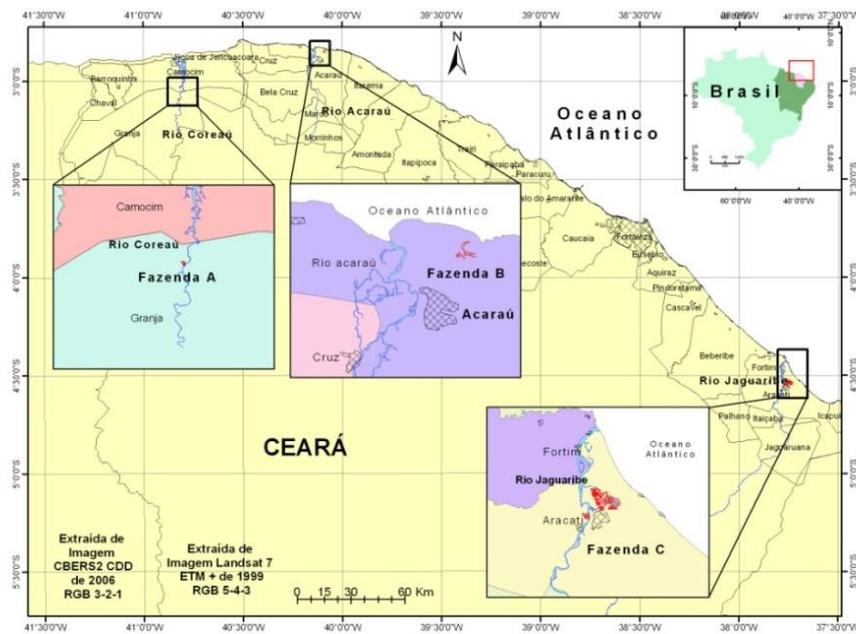


Figura 1- Mapa com a localização das fazendas onde foram coletadas as amostras utilizadas no estudo.

2.3.2. Coleta das amostras

As coletas foram realizadas nas três fazendas de cultivo de camarão marinho descritas no item anterior, durante o período seco, entre agosto de 2005 e janeiro de 2006, e o período chuvoso, de abril a setembro de 2006. Em cada fazenda foram selecionados dois viveiros sendo as amostragens realizadas com 0, 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo.

Amostras de água dos viveiros de cultivo de camarão foram coletadas para obtenção do extrato da assembléia fitoplânctônica. Para isso, garrafas plásticas com 4 L foram utilizadas. Estas eram mergulhadas até aproximadamente o meio da coluna d'água e ressuspendidas até a superfície, retornando completamente cheias. Posteriormente eram identificadas e acondicionadas em isopor com gelo até a chegada ao laboratório.

Para a análise da abundância relativa da assembléia fitoplânctônica, amostras de água foram coletadas diretamente em frascos âmbar previamente identificados. Estes eram mergulhados na coluna d'água até atingir um volume aproximado de 200 mL. Utilizou-se dois frascos para cada viveiro, sendo um fixado com solução de formaldeído PA neutralizado com bórax (filtrado antes da utilização) 0,4% e o outro com lugol 1%. As amostras fixadas com lugol foram envoltas em papel alumínio para evitar oxidação.

Amostras da água também foram coletadas para a análise da composição específica da assembléia fitoplanctônica dos viveiros. Um arrasto com rede de plâncton padrão com malha de 10 μm foi realizado durante 20 minutos em toda extensão do viveiro. Após o arrasto, uma parcela das amostras foi acondicionada em frascos de vidro transparente de boca larga, com formaldeído PA neutralizado com bórax (filtrado antes da utilização), numa concentração final de 4%; e o restante da amostra colocado em outro frasco com meio de cultivo Guillard f/2 (GUILLARD, 1995) para o isolamento de cianobactérias no laboratório. Essas últimas eram mantidas em gelo até chegada ao laboratório.

2.3.3. Análise da assembléia fitoplânctonica

2.3.3.1. Estrutura da assembléia fitoplanctônica

As análises da composição específica e a abundância relativa foram realizadas em parceria com o Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Em laboratório, as amostras foram observadas em microscópio óptico com luz direta, equipado com objetivas de 10, 20, 40 e 100X, com contraste de fase e com equipamento de fotomicrografia. A identificação foi realizada com base nas características morfológicas e morfométricas das células e ainda, quando necessário, nas suas formas de organização em cadeias e/ou colônias. Nesta etapa foram consideradas as descrições, figuras, fotomicrografias e dimensões que constam nos manuais, catálogos, livros e artigos da bibliografia especializada, tais como: CUPP (1943); DREBES (1974); SOURNIA (1986); RICARD (1987); ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK (1988); ROUND *et al.*, (1990); HALLEGRAEFF *et al.*, (1995); TOMAS (1995); KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS (2000); FERRARIO *et al.*, (2002).

Para a determinação da abundância relativa de cada viveiro foi realizada uma contagem do número de células $\times \text{L}^{-1}$ através de microscópio invertido, empregando-se o método tradicional de UTERMÖHL (1958). Na preparação das alíquotas para contagem (homogeneização, volume sedimentado, tempo de sedimentação) e na contagem do número de células ou cadeias foram seguidas as recomendações feitas por EDLER (1979) e SOURNIA (1978) os quais também descrevem o método de UTERMÖHL. De todas as amostras coletas, foram contadas alíquotas tanto das amostras fixadas com solução de lugol

como fixadas com a solução de formol, sendo no final obtida uma média geral do número de células.

2.3.3.2. Obtenção dos extratos

Quatro litros de água dos viveiros foram filtradas em bomba de vácuo com membrana de porosidade de 0,45 µm. O filtro junto com o material retido foi colocado sob agitação em agitador magnético com metanol P.A. para extração. Este foi então filtrado em papel de filtro, para obtenção do extrato líquido e colocado para evaporar em estufa a 50°C até completa evaporação do metanol.

2.3.3.3. Avaliação da toxicidade

Camundongos da espécie *Mus musculus* (Figura 2) foram fornecidos pelo Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos no biotério do departamento de Fisiologia e Farmacologia com água e alimento *ad libitum*. O manejo foi realizado procurando seguir todos os princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais. Para os ensaios foram utilizados somente camundongos machos, pesando entre 25 e 30 g.



Figura 2- Camundongos *Mus musculus*.

Para este ensaio foram utilizados grupos de três camundongos (n=3). Estes eram tratados por via intraperitoneal com os extratos da assembléia fitoplânctônica na dose de 50 mg/kg. Para solubilizar os extratos e como controle negativo utilizou-se água do mar filtrada.

Os animais foram observados quanto ao seu comportamento e sobrevivência durante a primeira hora. Após 24 horas, foram sacrificados para a retirada dos rins e fígado. Estes foram analisados macroscopicamente quanto ao tamanho, peso e alteração da cor.

Posteriormente foram fixados em formol a 10% por 24 horas, sendo em seguida aplicado o processo de desidratação utilizando concentrações crescentes de álcool e por último embutidos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em fatias de 5 µm em um microtômo, e então fixadas em lâminas. Após a desparafinização das lâminas em xilol, e hidratação em concentrações decrescentes de álcool, foram coradas com hematoxilina e eosina para observação em microscópio dos possíveis danos, como por exemplo, necroses, hemorragias, esteatoses, causados pela exposição aos extratos da comunidade fitoplanctônica.

2.3.4. Isolamento e identificação das cianobactérias

2.3.4.1. Isolamento e identificação morfológica

O isolamento das cianobactérias dos viveiros de camarão marinho foi realizado através de meio sólido (ágar acrescido do meio de cultivo) em placas de Petri (STEIN, 1978), as quais eram mantidas em temperatura de 25 ± 1 °C com iluminação constante até que houvesse crescimento algal, sendo posteriormente transferidas para tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultivo ASN III próprio para cianobactérias marinhas (RIPPKA *et al.*, 1979) (mesmo utilizado no meio sólido) de composição: NaCl 25 g, MgCl₂.6H₂O 2 g, KCl 0,5 g, NaNO₃ 0,75 g, K₂HPO₄.7H₂O 0,02 g, MgSO₄.7H₂O 3,5 g, CaCl₂.2H₂O 0,5 g, ácido cítrico 0,003 g, citrato férrico amoniacal 0,003 g, EDTA 0,0005 g, Na₂CO₃ 0,02 g, glicina-glicina 8g/100 mL 10 mL, elementos traços (H₃BO₃ 2,86 g/L, MnCl₂.4H₂O 1,81 g/L, ZnSO₄.7H₂O 0,222 g/L, Na₂MoO₄.2H₂O 0,390 g/L, CuSO₄.5H₂O 0,079, Co(NO₃)₂.6H₂O 0,049) 1 mL, água destilada 1 L.

Após o isolamento, a cepa foi enviada para o Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco para identificação seguindo a metodologia descrita no item 2.3.3.1.

2.3.4.2. Identificação genotípica

Para a confirmação da identificação morfológica da cepa isolada, foi realizada uma identificação molecular no Laboratório de Ecotoxicologia, Genética e Evolução (LEGE) da Universidade do Porto, Portugal.

Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada através de 2 mL da cultura da cianobactéria isolada com Purelink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

A presença do DNA genômico foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (Molecular Biology Agarose, BioRad) a 1%, numa solução tampão de Tris-Acetato EDTA (TAE 1x, BioRad – 40mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8,3). A voltagem aplicada dependeu do tamanho do gel, variando entre 80 a 100V, por um período de 30 a 45 min. Ao gel de agarose foi adicionado 5 µL de brometo de etídio (BioRad) de uma solução stock de 10 mg/mL. Como padrão foi utilizado um marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen, fragmentos de 100bp a 12kb) e outro de 100bp (EZ Load Molecular Ruler, BioRad).

Amplificação por PCR

Os pares de iniciadores universais 27F (5'-AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG-3') - 781R (5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3') e 359F (5'-TACGAGCTCTACGTCTGGAC-3') - 1494R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3') foram utilizados na amplificação dos fragmentos do gene 16S rRNA por meio de PCR. Todas as reações foram preparadas com 20 µL, contendo 1x tampão, 2,5 mM MgCl₂, 250 µM de cada trifosfato de desoxinucleotídeo, 10 pmol de cada iniciador, 0.5 unidade de TAQ DNA polimerase e 5 a 10 ng do DNA total. As reações ocorreram em um termociclador BioRad MyCycler, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 92 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 20 segundos a 92 °C, 30 segundos a 50 °C, 2 minutos a 72 °C e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Posteriormente, para observar a presença e a quantidade de DNA, foi realizada uma corrida em gel de agarose, nas mesmas condições descritas no item anterior. A análise dos cromatogramas foi realizada com o programa FinchTV version 1.4.0.

Sequenciamento

Os produtos das amplificações foram preparados para sequenciamento, com vista a determinar, de forma mais exata, o gênero e, se possível, a espécie. O sequenciamento foi realizado para os dois fragmentos do gene 16S rRNA (27F-781R e 359F-1494R).

Após a amplificação inicial destes fragmentos, foi feita uma nova amplificação, para um volume de 100 µL, a fim de fazer o sequenciamento. O volume dos reagentes para a reação de PCR mantiveram-se nas mesmas proporções anteriormente descritas. O produto da reação foi purificado com o kit “NucleoSpin[®] Extract II” (Macherey-NagelR), utilizando o protocolo para limpeza de DNA (protocol for PCR clean-up) de acordo com o fabricante. A única modificação foi no passo de eluição, a qual foi realizada com 30 µL de água ultra-pura estéril. Posteriormente, a amostra foi enviada para sequenciamento pela empresa STABVIDA.

Uma vez que se amplificou a mesma região dos genes em dois sentidos, com vista a tornar a sequência obtida mais completa, utilizaram-se dois programas disponíveis na internet. O “reverse complement” (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) tinha como objetivo desenvolver a sequência de modo inverso, e o multialin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) alinhava as duas sequências, permitindo por tratamento manual completar bases em falta ou possíveis erros. Este processo foi realizado para os dois fragmentos do gene 16S rRNA, e posteriormente utilizado novamente o programa multialin, para confirmar o resultado.

2.3.5. Obtenção do extrato da cianobactéria

Para a obtenção do extrato bruto, o cultivo da cianobactéria isolada foi realizado em erlenmeyers de 1000 mL com meio de cultivo ASN III (RIPPKA *et al.*, 1979) em incubadora com condições controladas de temperatura (25 ± 1 °C) e fotoperíodo (12h claro: 12h escuro).

Quando o cultivo encontrava-se em fase exponencial o mesmo foi centrifugado (Hettich[®]) a 3000 rpm por 5 minutos. O material precipitado foi congelado, liofilizado e em seguida ressuspendido em metanol PA, sonificado (Unique[®]) por 5 minutos a fim de romper a membrana celular para promover a liberação do conteúdo e finalmente evaporado em estufa a 60 °C.

Para a determinação do rendimento do extrato, o seguinte cálculo foi realizado a fim de obter-se a relação entre volume de cultura, número de células e massa de extrato:

1º passo: foi determinado o número de células contido em 1L de cultura (antes da centrifugação);

2º passo: foi determinado o número de células contido no sobrenadante remanescente da centrifugação deste 1L de cultura e subtraído do valor encontrado na primeira contagem;

3º passo: determinação da massa de extrato bruto através da diferença do peso úmido e seco (depois da liofilização, extração e remoção do sal) determinando assim, o rendimento em relação ao volume da cultura e o número de células.

2.3.6. Avaliação da toxicidade da cianobactéria

Misidáceos

Os microcrustáceos *Mysidopsis juniae* (Figura 3) foram fornecidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia Marinha do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR/UFC. Esses organismos foram cultivados em aquários de 10 L, com água do mar filtrada (membrana Millipore de 0,45 µm) com salinidade 35. Cada aquário recebeu aproximadamente uma proporção de 300 fêmeas para 75 machos. O cultivo foi mantido em temperatura constante a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, aeração suave e fotoperíodo de 12 h luz e 12 h escuro. Diariamente os animais foram alimentados com náuplios de *Artemia* sp. enriquecidos com óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau. Os indivíduos com um a oito dias de nascidos foram separados para serem usados nos ensaios.

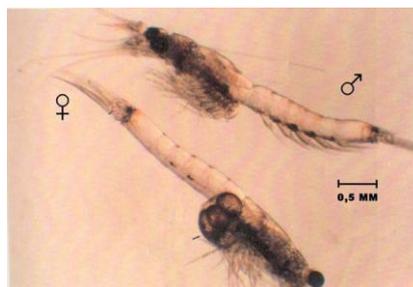


Figura 3 - Fêmea e macho adultos de *Mysidopsis juniae*.

O ensaio de toxicidade aguda do extrato da cianobactéria isolada da água dos viveiros de camarão marinho e cultivada em laboratório foi realizado utilizando *M. juniae* e seguiu a metodologia descrita pela norma L5.251 de 1992 da CETESB, modificada.

As concentrações testadas em triplicata foram de 10; 30; 100 e 300 mg/L, sendo estas feitas em balões volumétricos de 1 L e colocados 300 mL em béqueres. Como controle foi utilizada água do mar (oceânica) filtrada em membrana de 0,45 m. Cada béquer recebeu 10

juvenis de misidáceo e náuplios de artemia *ad libitum*. Após preparados, estes foram colocados em uma sala com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo 12 h luz e 12 h escuro. Uma alíquota de cada concentração e controle foi separada para a medição inicial da salinidade, pH e oxigênio dissolvido.

A cada 24 horas foram contados os números de animais mortos, sendo estes retirados por uma pipeta de boca larga. Em seguida era oferecida alimentação aos indivíduos remanescentes. A finalização do ensaio após 96 horas consistiu na contagem dos indivíduos vivos e mortos e a mensuração das variáveis físico-químicas (salinidade, pH e oxigênio dissolvido).

Camundongos

Os camundongos *M. musculus* também foram utilizados para avaliar a toxicidade do extrato da cianobactéria isolada, assim como das células vivas dessa cianobactéria. Os animais receberam injeções intraperitoneais das células vivas na concentração de 10^6 cél/mL e o extrato na dose de 50mg/kg. Todo o procedimento experimental seguiu o mesmo descrito no item 2.3.3.3.2., diferenciando apenas que nestes ensaios o controle utilizado foi o tampão Fosfato-Salino (PBS).

2.3.7. Análises estatísticas

Os resultados obtidos nos ensaios com misidáceos foram analisados através do método “Trimmed Spearman-Kärber” (HAMILTON *et al.*, 1978). Esse método estima a concentração letal média (CL₅₀ – 96 horas) e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) utilizando os dados de mortalidade observados em cada concentração.

Para verificação de diferenças significativas entre os pesos dos fígados e rins dos camundongos tratados com os extratos da assembléia fitoplanctônica com os respectivos controles foi utilizado análise de variância (ANOVA) unifatorial ($p < 0,05$) utilizando o Graphpad Prism 5.00 (2007). Esta análise serviu também para a comparação nos ensaios do extrato da cianobactéria isolada e das células vivas dessa cianobactéria (dados não mostrados).

2.4. Resultados

2.4.1. Assembléia fitoplanctônica

2.4.1.1. Composição específica e a abundância relativa

A análise da abundância relativa das amostras da assembléia fitoplanctônica revelou que as cianobactérias corresponderam à maior parcela do fitoplâncton nos dois períodos estudados, seco e chuvoso nas 3 fazendas avaliadas (Figura 4). No segundo ciclo de coletas, no período chuvoso, o número de espécies identificadas, inclusive de cianobactérias, foi bem superior ao do primeiro ciclo (período seco) (Anexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Período Seco

A análise dos viveiros 1 e 2 da fazenda A revelou uma maior abundância de fitoplâncton nas amostras coletadas com 120 e 90 dias de cultivo, respectivamente, porém inferiores àquelas encontradas nos viveiros das fazendas B e C, com valor máximo de 2.280 céls/mL no viveiro 1 e 980 céls/mL no viveiro 2. Foi observado ainda, a presença em pequenas quantidades de cianobactérias como *Pseudoanabaena cf. Limnetica*, onde essa apareceu durante todo o ciclo de cultivo com exceção no 90 dias do viveiro 1 e 30 dias no viveiro 2 e *Planktothrix agardhii*, *Anabaena sp.*, *Cylindrospermopsis sp.*, *Oscillatoria sp.* e ainda euglenofíceas, dinoflagelados, diatomáceas e fitoflagelados (Anexo 1).

As amostras obtidas da fazenda B tiveram maior abundância de fitoplâncton principalmente no viveiro 1 (57.044 céls/mL) (30 dias de cultivo) e no viveiro 2 (50.176 céls/mL) (60 dias de cultivo). Nas amostras do viveiro 1 (30 dias de cultivo) foi observado um crescimento excessivo (52.800 céls/mL) de cianobactérias não identificadas, onde essas apareceram somente nesta coleta. *Pseudoanabaena cf. limnetica* apareceram durante todo o ciclo de cultivo do viveiro 1 (exceção, 30 dias de cultivo) e 2, sendo o maior número de 49.600 céls/mL com 60 dias de cultivo no viveiro 2. *Anabaena sp.*, *Lyngbya sp.*, *Oscillatoria sp.* e *Spirulina sp.* ainda foram identificadas nesses viveiros, mas em números muito baixos. Além dessas, euglenofíceas, cryptofíceas, dinoflagelados, diatomáceas e fitoflagelados também apareceram nas análises. Vale ressaltar que a abundância relativa do fitoplâncton presente nessas amostras foi bem superior às das fazendas A e C (Anexo2).

A análise do viveiro 1 da fazenda C revelou uma maior abundância de fitoplâncton nas amostras coletadas no período 0 e 120 dias de cultivo (5.784 e 9.128 céls/mL, respectivamente), enquanto que no viveiro 2 a maior quantidade foi obtida com 90 dias de cultivo (7.740 céls/mL). A análise da composição específica dessas amostras revelou o aparecimento de apenas três espécies de cianobactérias, *Anabaena sp.*, *Cylindrospermopsis sp.* e *Pseudoanabaena cf. Limnetica*, sendo esta última responsável pelo maior abundância nos viveiros, já que essa espécie assim como nas demais fazendas estudadas, apareceu em todo o ciclo de cultivo. Foram identificadas ainda euglenofíceas, cryptofíceas, dinoflagelados, diatomáceas e fitoflagelados (Anexo 3).

Período chuvoso

Na fazenda A foram identificadas 18 espécies de cianobactérias, tendo destaque *Cylindrospermopsis raciborskii*, que apareceu durante todo o ciclo de cultivo nos dois viveiros analisados, com números que variaram de 12 céls/mL (0 dia de cultivo) a 127.400 céls/mL (120 dias de cultivo) no viveiro 1 e 356 céls/mL (0 dia de cultivo) e 109.480 céls/mL (120 dias de cultivo) no viveiro 2. Vale destacar ainda o aparecimento do grupo das clorofíceas com 22 espécies identificadas, grupo este o qual não havia aparecido no período seco e de espécies reconhecidamente produtoras de toxinas, como *Microcystis aeruginosa*, *M. wesenbergui* e *Anabaena constricta* (Anexo 4).

Na fazenda B houve uma redução na abundância relativa de fitoplâncton quando comparado com o período seco. Contudo, em relação às cianobactérias houve um crescimento de espécies que não apareceram no outro ciclo, como: *Geitlerinema amphibium* (17.649 céls/mL) no viveiro 1 (90 dias de cultivo) e *G. unigranulatum* (15.320 céls/mL) no viveiro 2 (90 dias de cultivo), além de *C. raciborskii*, mas em quantidades inferiores às encontradas na fazenda A, com um máximo de 3.120 céls/mL no viveiro 1 com 90 dias de cultivo. Assim como na fazenda A, nesta também apareceram o grupo da cianofíceas representado pelas espécies *Closterium ehrenbergianum*, *Kirchneriella obesa* e *Tetrallantos lagerheimii* (Anexo 5).

Na fazenda C, o aparecimento das espécies *G. amphibium*, *G. unigranulatum* e *C. raciborskii* praticamente dominaram a assembléia de fitoplâncton durante o ciclo de cultivo. A maior abundância relativa de cianobactérias foi com 30 dias de coleta no viveiro 1

(107.240 céls/mL) e no viveiro 2 (49.880 céls/mL). Assim como nas demais fazendas houve ainda o aparecimento de euglenofíceas, dinoflagelados, diatomáceas, fitoflagelados e clorofíceas, mas na maioria das vezes em menor abundância que as cianobactérias (Anexo 6).

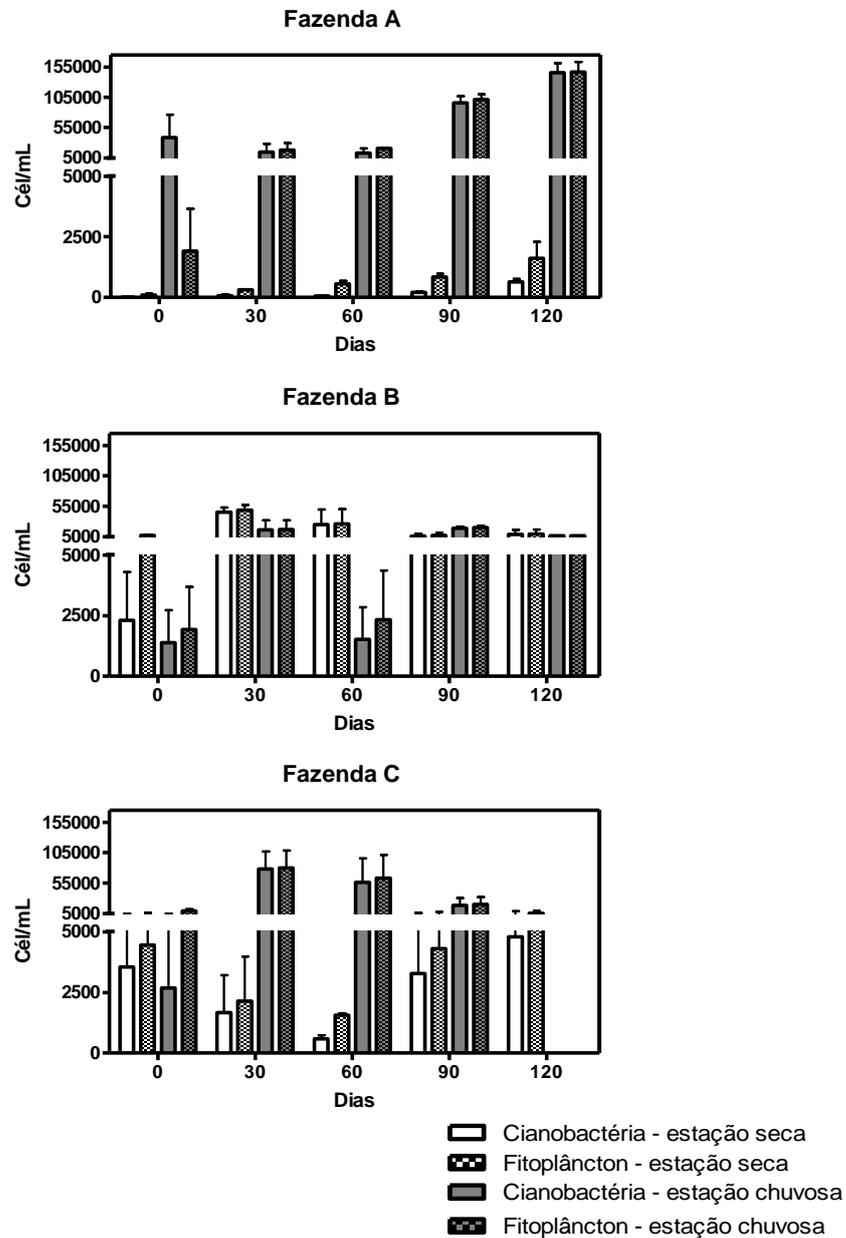


Figura 4 – Abundância relativa (céls./mL) da assembléia fitoplanctônica e do grupo das cianobactérias nos dois viveiros analisados das três fazendas de cultivo de camarão marinho, nos períodos seco e chuvoso.

2.4.1.2. Ensaios de toxicidade

Nos ensaios de toxicidade aguda com camundongos não foi observada nenhuma letalidade nos animais tratados com os extratos obtidos da assembléia fitoplanctônica dos viveiros analisados nos dois períodos de coleta. A análise do peso dos fígados e rins não mostrou diferença entre as amostras ($p > 0,05$; ANOVA) e o grupo controle (Anexos 7, 8, 9, 10, 11 e 12).

As análises histopatológicas, por outro lado, permitiram identificar alterações que ocorreram ao nível celular e, ao mesmo tempo, mostraram algum efeito tóxico causado pelos extratos. As principais alterações observadas estão descritas por fazenda na tabela 1.

Nos rins dos animais tratados com os extratos, foi comumente observada hemorragia glomerular e tubular (Figuras 5A e B), com destaque para as amostras coletadas na fazenda A tanto no período seco como chuvoso, e na fazenda B no período seco. A necrose tubular aguda (Figura 5C) foi a manifestação toxicológica mais severa, entretanto foi observada apenas nos animais tratados com a amostra obtida na fazenda A durante o período seco no início do ciclo de cultivo. Também foi observada a presença de cilindrohialino (Figura 5D) nos rins dos animais tratados, entretanto, essa alteração também foi observada nos animais controles, o que sugere que essa alteração não está necessariamente relacionada à presença da toxinas nas amostras.

Tabela 1- Fazenda, ciclo, período das coletas e análises histopatológicas dos camundongos tratados com extratos da assembléia fitoplanctônica da água de cultivo de camarão marinho. “X” significa presença do dano.

Fazenda	Ciclos (dias)	Período	Áreas hemorrágicas	Necrose tubular aguda	Cilindrohialino	Tumefação celular do epitélio tubular	Vacuolização isomérica	Hemorragia glomerular e tubular	Intensa tumefação celular de hepatócitos	Esteatose em microgotas	Necrose focal	Focos inflamatórios
A	0	Seco	X	X	X				X	X		
	30							X	X			
	60							X	X			
	90		X					X	X	X		
	120		X					X	X	X		
	0	Chuvoso					X	X	X			X
	30					X					X	
	60		X			X		X	X	X		
	90		X			X		X	X			
	120		X			X				X		
B	0	Seco	X					X	X	X		
	30		X					X	X	X		
	60							X	X	X		
	90							X	X	X		
	120							X	X	X		
	0	Chuvoso			X	X				X		
	30									X		X
	60		X			X						
	90									X		X
	120		X			X			X	X	X	X
C	0	Seco	X					X	X			
	30											
	60											
	90											
	120		X			X						
	0	Chuvoso			X	X		X	X	X		
	30									X		
	60		X			X			X	X	X	
	90		X			X						
	120		X			X			X	X		

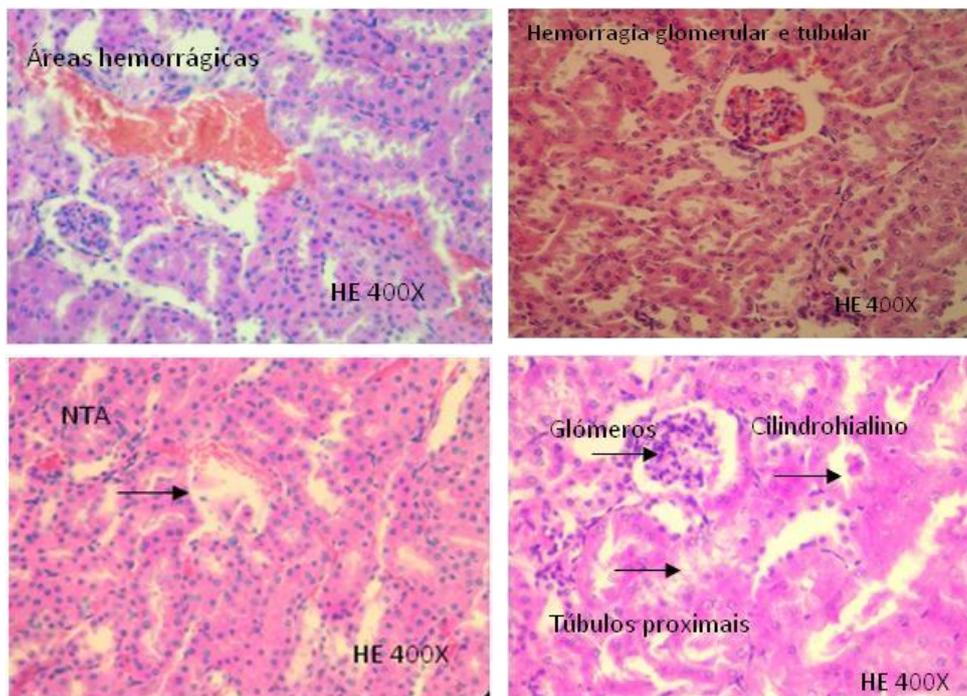


Figura 5 – Alterações histopatológica observadas nos rins dos animais tratados com extratos da comunidade fitoplanctônica da água de viveiros de camarão: A– áreas hemorrágicas; B – Hemorragia glomerular e tubular; C - Necrose tubular aguda ; D – Cilindrohialino.

No fígado, as alterações mais comumente observadas envolvem a intensa tumefação celular de hepatócitos (Figura 6A), e esteatose em microgotas (Figura 6B), sendo encontradas nos animais tratados com amostras das três fazendas, com menor frequência naqueles tratados com amostras da fazenda C. A necrose focal de hepatócitos (Figura 6C), alteração característica de microcistina, apareceu apenas nos animais tratados com as amostras do período chuvoso, coletadas na fazenda A viveiro 2 com 30 dias de cultivo e na fazenda B no viveiro 1 com 120 dias de cultivo. Focos inflamatórios (Figura 6D) foram observados nas lâminas dos animais tratados com as amostras do período chuvoso coletadas nas fazendas A (viveiro 1 em início de cultivo), C (viveiro 1 com 90 dias de cultivo) e B (viveiro 1 e 2 com 90 e 30 dias de cultivo, respectivamente).

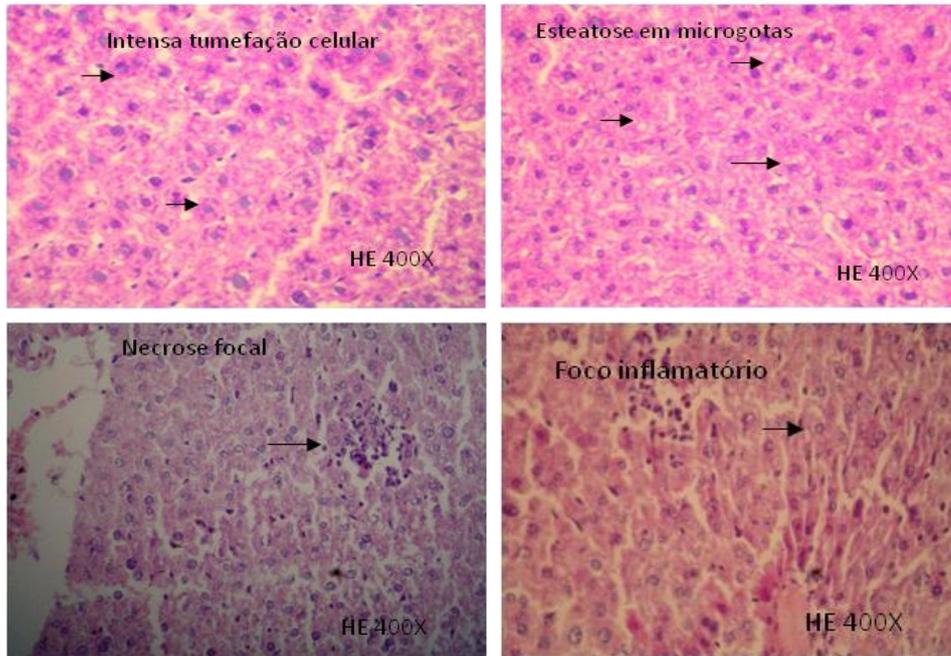


Figura 6 - Alterações histopatológica observadas no fígado dos animais tratados com extratos da comunidade fitoplanctônica da água de viveiros de camarão: A – tumefação dos hepatócitos; B – Esteatose em microgotas; C - Necrose focal dos hepatócitos; D – Focos inflamatórios.

2.4.2. Cianobactérias

2.4.2.1. Isolamento e identificação morfológica

Foram isoladas duas cianobactérias da água dos viveiros de camarão nos dois períodos de coleta, identificadas morfológicamente como *Synechococcus* sp. e *Planktrotrix agardii* (Figura 7), sendo que apenas uma delas a *Synechococcus* sp. (Figura 8) cresceu em condições ótimas em laboratório para a realização dos ensaios.

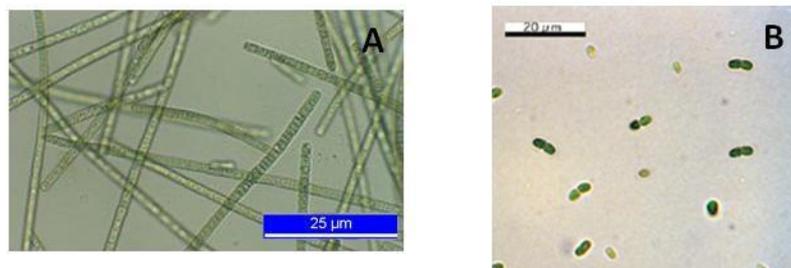


Figura 7 - *Planktrotrix agardii* (A) e *Synechococcus* sp.(B).



Figura 8 - Cultivo de *Synechococcus* sp.

2.4.2.2. Identificação genotípica

A análise da sequência obtida através do estudo molecular permitiu confirmar a identificação ao nível de gênero, com similaridade de 99% para a cianobactéria *Synechococcus* sp.

2.4.2.3. Ensaios de toxicidade

Misidáceos

Na exposição aguda dos misidáceos *M. juniae* ao extrato metanólico de *Synechococcus* sp., a CL_{50} encontrada foi de 48,62 mg/L (42,78 – 55,26). Nas maiores concentrações (100 e 300 mg/L) foram evidenciadas quedas do oxigênio dissolvido de 5,0 e 5,5 mg/L para 1,7 e 0,7 mg/L, respectivamente, no segundo dia de exposição, o que pode ter causado a morte de todos os indivíduos, já que o pH e salinidade estavam dentro dos limites toleráveis para a espécie (BADARÓ-PEDROSO *et al.*, 2002). Nas demais concentrações, observou-se um aumento do oxigênio dissolvido no final do ensaio, enquanto que demais variáveis também permaneceram dentro dos limites toleráveis (Anexo 13).

Camundongos

Nos ensaios com camundongos *M. musculus*, não foram observados comportamentos anormais nos animais tratados com as células vivas e nem com o extrato metanólico da *Synechococcus* sp., bem como não observou-se morte dos animais tratados.

Nos camundongos do grupo controle, foram observados fígados de cor vinhosa escurecida, com congestão da veia centrolobular, moderada tumefação celular de hepatócitos, hiperplasia das células de Kupffer, presença de focos inflamatórios dispersos e de denso

infiltrado de células mononucleares em região perivenular. Já os rins se apresentaram pardacentos, com a estrutura glomerular preservada, moderada tumefação celular do epitélio tubular, presença de hemorragia glomerular e intersticial (por entre os túbulos proximais e distais).

No animais tratados com células vivas de *Synechococcus* sp., foram observados fígados de cor vinhosa intensamente escurecida, mas com as mesmas características encontradas no controle, como congestão da veia centrolobular, portal e sinusoidal e intensa tumefação celular de hepatócitos. Já os rins apresentaram coloração escurecida e alguns danos não observados no controle, como extensas áreas de hemorragia glomerular e intersticial e alguns cilindrohialinos.

Praticamente não houve alteração no fígado dos animais tratados com o extrato da *Synechococcus* sp. em relação ao controle. Estes também apresentaram um fígado de cor vinhosa escurecida, com congestão da veia centrolobular (portal e sinusoidal), moderada tumefação celular de hepatócitos, hiperplasia das células de Kupffer e discreto infiltrado de células mononucleares na região perivenular. Enquanto os rins se apresentaram pardacentos, com a estrutura glomerular preservada, porém alguns glomérulos exibiam proliferação celular moderada, tumefação celular do epitélio tubular, trecho de edema peritubular e presença de hemorragia glomerular e intersticial (por entre os túbulos proximais e distais).

2.5. Discussão

Segundo Lio-Po *et al.* (2005) a introdução de microalgas planctônicas nos tanques de cultivo conduz a melhores resultados de sobrevivência e crescimento em razão da melhoria da qualidade da água, produção natural do oxigênio, estabilização do pH e regulação da população bacteriana. Devido a essas características, alguns autores consideram a comunidade fitoplanctônica fundamental para o sucesso do cultivo de organismos aquáticos (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2001).

No Brasil, as microalgas mais utilizadas na aquicultura marinha são espécies dos gêneros *Thalassiosira*, *Skeletonema* e *Chaetocheros* (Bacillariophyta), *Tetraselmis* (Prasinophyceae) e *Dunaliella* (Chlorophyta) (LOURENÇO, 2006) e segundo Boyd (1990) as melhores para alimentação de camarões pertencem à classe Bacillariophyta. Dentre as espécies e/ou gêneros identificados no presente estudo, não foram encontradas as microalgas descritas acima, apenas *Thalassiosira* sp., que apareceu em dois períodos de coleta e em pequenas quantidades. Por outro lado, foi observada uma grande quantidade de um grupo denominado de diatomáceas pennales, as quais foram as únicas que apareceram nos dois períodos de coleta e em quase todos os ciclos de cultivo.

Outro grupo que chamou atenção pelo aparecimento nos dois períodos das coletas, foi o das cianobactérias, que segundo a análise da composição específica e abundância, estas corresponderam à maior parcela da assembléia do fitoplâncton, tanto na estação seca quanto na chuvosa, demonstrando que as condições presentes nos viveiros estudados foram propícias ao crescimento desses organismos. Esse resultado é corroborado por outros autores o qual mostram que os viveiros de cultivo de camarão são locais ideais para o crescimento desses organismos, devido provavelmente ao uso de fertilizantes utilizados durante os cultivos, como o trabalho realizado por Pereira Neto *et al.* (2008) na avaliação da comunidade planctônica e bentônica de microalgas em viveiros de camarão (*L. vannamei*) de uma fazenda de cultivo em Pernambuco. Neste, o autor observou que a divisão Bacillariophyta foi o grupo mais diversificado e Cyanophyta foi um grupo dominante na escala temporal e espacial, com porcentagem muito acima dos demais grupos, durante os períodos estudados (setembro/2005 a fevereiro/2006 e março a agosto/2006), períodos estes semelhantes ao da presente pesquisa (agosto/2005 a janeiro/2006 e abril a outubro/2006).

Fonseca (2006) analisando o padrão da sucessão fitoplanctônica de um viveiro de cultivo de camarão no estado do Ceará, observou um decréscimo da assembléia de diatomáceas e um acréscimo da assembléia de cianobactérias ao longo do ciclo de cultivo, sendo observados valores máximos de $843,7 \times 10^3$ céls/mL no 50º dia de cultivo. Na presente pesquisa a maior floração foi de 163.440 céls/mL, em um dos viveiros da fazenda A com 120 dias de cultivo, durante o período chuvoso. Já em um estudo realizado em uma fazenda dos Estados Unidos para descobrir a causa da mortandade do organismos, Zimba *et al.* (2006) observaram que o grupo dominante do fitoplâncton eram as cianobactérias, com as espécies *Anabaena/Aphanizomenon* e *M. aeruginosa*, sendo esta última responsável por mais de 90% do número total de células do fitoplâncton, além de terem sido encontrados cianotoxinas do tipo microcistina-LR na água dos viveiros, hepatopâncreas e músculos dos animais.

Segundo Sousa (2006) existem cerca de 2.400 espécies de cianobactérias, das quais 40 são conhecidas como produtoras de toxinas (APELDOORN *et al.*, 2007). *Pseudoanabaena* cf. *limnetica*, *Anabaena* sp. e cianobactérias da ordem Chroococcales (VIEIRA *et al.*, 2003, ROSA *et al.*, 2005), *Cylindrospermopsis raciborskii* (SANTOS, 2009) e *Microcystis aeruginosa* (ALEXOVA *et al.*, 2011) foram algumas espécies identificadas no presente estudo e reconhecidas na literatura como produtoras de toxinas.

Em avaliações realizadas na ocasião dos primeiros relatos do vírus da mionecrose idiopática (IMNV) em camarões da região Nordeste, Nunes *et al.* (2004) observaram correlação entre o número de cianobactérias presentes nos viveiros e a intensidade de mortalidade nos viveiros, mostrando que a presença desses organismos deprime a resistência dos camarões, deixando-os mais vulneráveis às patologias. Contudo, na presente pesquisa apesar da grande abundância de cianobactérias presentes nos viveiros, além de espécies produtoras de toxinas, não houve relato por partes dos produtores das três fazendas analisadas sobre mortandade ou doenças nos animais cultivados.

Os viveiros da carcinicultura são grandes reservatórios de água, os quais tem alta concentração de material orgânico em suspensão e nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, resultado basicamente dos restos de ração, produtos de excreta, fitoplâncton e fertilizantes, tendo assim um potencial para se tornarem ambientes eutrofizados (FREITAS *et al.*, 2008). Devido a isso, os carcinicultores fazem contínuas renovações de água, gerando grandes volumes de efluentes.

Segundo BOYD (1990) e TUCKER (1992) esses efluentes podem não apresentar alta carga de nutrientes, como os efluentes domésticos, porém boa parte da matéria orgânica, na forma de alimento e produtos fertilizantes, não é metabolizada e/ou não é consumida totalmente pelos animais, acumulando-se nos viveiros e posteriormente liberados para o ambiente durante a despesca. Contudo, a qualidade dessas águas pode ser alterada devido a vários fatores, como, clima, tipo de viveiro, manejo adotado, taxa de renovação da água, densidade de estocagem dos animais, espécies cultivadas, qualidade e quantidade de alimento fornecido (SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

Alguns autores afirmam ainda que, apesar de ser considerado elevado o valor de diluição das descargas de efluentes oriundas da aquíicultura, o lançamento direto nos ambientes límnicos entre eles os estuários, ambientes naturalmente ricos em nutrientes, pode resultar em eutrofização, gerando o aumento excessivo do fitoplâncton e uma queda de oxigênio dissolvido à noite (GUO; LI, 2003).

Das três fazendas estudadas, duas são de médio porte (A e B) e uma de grande porte (C), chegando a ter mais de 200 viveiros, cada um com aproximadamente 2 ha e apenas esta última realizava recirculação parcial da água, além de possuir duas bacia de sedimentação. A densidade de estocagem era de até 30 camarões/m² em duas das fazendas (B e C), o que caracteriza um sistema de cultivo semi-intensivo enquanto a fazenda A apresenta um sistema extensivo. O que observa-se é que das três fazendas, apenas uma possui bacia de sedimentação, que servem para o tratamento do efluente antes de ser descartado no corpo receptor, além de fazer uma recirculação parcial da água, recursos exigido por lei (CONAMA nº 312 de 2002) para tentar minimizar a carga poluidora dos viveiros aos corpos hídricos. Com essa falta de cuidado com os efluentes, essas fazendas podem estar gerando contaminação para importantes rios do estado onde as mesmas estão localizadas como os rios Coreaú, Acaraú e Jaguaribe.

Os estudos ecotoxicológicos fundamentados em bioensaios realizados em laboratório e/ou em campo vêm sendo utilizados para monitoramento de poluição e contaminação de corpos d'água como forma de melhor integrar, explicar objetivamente resultados e subsidiar a tomada de decisões rápidas e seguras.

Os bioensaios com camundongos são amplamente utilizados para comprovar a toxicidade de cianobactérias (LUGOMELA *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; SOTERO-SANTOS *et al.*, 2008) sendo assim um procedimento padrão nesse tipo de análise.

Os testes com camundongos *Mus musculus* não evidenciaram toxicidade aguda para os extratos obtidos da assembléia fitoplanctônica dos viveiros das três fazendas, nos dois períodos estudados, porém alterações histopatológicas foram encontradas nos rins e fígados destes animais. Segundo NOBRE *et al.* (2003) e VIEIRA *et al.* (2005), estes órgãos podem ser considerados alvo da ação de algumas toxinas isoladas de cianobactérias. No fígado por exemplo, o modo de ação de hepatotoxinas, um tipo de cianotoxina, leva a uma retração dos hepatócitos, provocando a perda de contato entre eles com as células que formam os capilares sinusoidais, desenvolvendo graves lesões internas (HANSEN *et al.*, 2001).

Moreira (2007) estudando a toxicidade do extrato de uma floração de cianobactérias em camundongos, observou que a exposição por 28 dias ao extrato, que dentre outros compostos possuía MC-LR e MC-RR, não alterou o peso relativo dos órgãos, nem causou alterações macroscópicas, contudo alterações histopatológicas foram observados no fígado e rins dos animais, como focos discreto de necrose lítica hepatocelular. Vale ressaltar que na identificação das espécies presentes na floração estavam, *Microcystis protocystis*, *Microcystis panniformis*, *Anabaena oumiana*, *Anabaenopsis elenkinni* cf. *circularis*, *Cylindropermopsis raciborskii* e *Shaerocavum brasiliense*, todas com exceção desta última são potencialmente tóxicas e algumas delas também foram encontradas no presente estudo como *Cylindropermopsis raciborskii* e *Microcystis protocystis*. Já Vieira *et al.* (2003) demonstraram que o fígado de camundongos tratados com cepas de *Radiocystis fernandoi* produtoras de microcistinas apresentavam-se hemorrágicos e com peso correspondendo a 10% do peso corpóreo do animal. No presente trabalho não foi observado alteração no peso do fígado e rins dos animais tratados em ambos os períodos de coleta, contudo como já comentado algumas alterações histopatológicas foram observadas e estas podem estar relacionadas à cianotoxinas.

Martins *et al.* (2005) demonstraram uma série de alterações histopatológicas decorrentes da injeção de extratos de cianobactérias isoladas da costa portuguesa. Os danos hepático incluíram necrose hepatocelular, núcleo picnótico, dilatação do espaço sinusoidal,

vacualização citoplasmática com perda do núcleo e degeneração granulovacuolar. Com relação aos efeitos renais, esses autores observaram necrose tubular, vacualização das células da cápsula, atrofia dos glomérulos e hemorragia, sendo esses efeitos atribuídos à presença de microcistina.

Na presente pesquisa, comparando a fazenda C com as fazendas A e B no período seco, podemos constatar que o fígado e os rins dos animais tratados com os extratos desta fazenda (C) não causaram tantas alterações, embora tenha ocorrido florescimento da cianobactéria *Pseudoanabaena cf. limnetica*.

Áreas hemorrágicas foram visualizadas nos rins de camundongos das fazendas A e B nas coletas iniciais do período seco. Na fazenda B, isto coincidiu com o crescimento excessivo de cianobactérias da ordem Chroococcales. Na fazenda A, por outro lado, observou-se necrose tubular aguda nos animais tratados com amostras obtidas em um dos viveiros analisados apenas no início do ciclo de cultivo (zero dia) e o aparecimento de duas espécies de cianobactérias. Essas alterações, como dito anteriormente, podem estar relacionadas à presença de microcistina nas amostras. Efeitos hepáticos como esteatose em microgotas e sinusóides evidentes reforçam a presença de hepatotoxinas nas amostras.

A necrose focal de hepatócitos, alteração também característica de microcistina, apareceu apenas nos animais tratados com as amostras do período chuvoso, coletadas na fazenda A com 30 dias de cultivo e na fazenda B com 120 dias de cultivo. Nesses viveiros houve o aparecimento de espécies reconhecidamente produtoras de microcistinas como *Planktothrix agardhii* e *Pseudoanabaena limnética*.

Sendo assim, as análises histopatológicas mostram a presença de alterações relacionadas à ocorrência de toxinas em algumas das amostras estudadas, embora em quantidades residuais, inferiores àquelas capazes de causar letalidade, o que vem a corroborar que algumas espécies do fitoplâncton encontradas nas amostras apresentam potencial tóxico. Entretanto, nem sempre foi possível correlacionar a presença ou não de danos à presença destas espécies. Um outro fato é que alguns dos danos são reversíveis, como por exemplo nos casos de necrose focal de hepatócitos, onde não havia fibrose e portanto é possível a regeneração do tecido.

Apesar do grande número de espécies de cianobactérias identificadas nas águas dos viveiros das três fazendas estudadas, foram isoladas apenas duas, a espécie *Planktotrix agardhii* e *Synechococcus* sp. que a princípio, pela identificação morfológica, havia sido identificada como *Anabaena* sp. Porém, pelas diferenças na morfologia, acredita-se que a cepa não estava totalmente pura e assim possa ter ocorrido uma dominância de *Synechococcus* sp., com isso a identificação genotípica foi de crucial importância, mostrando uma similaridade de 99% para *Synechococcus* sp.

No cultivo em laboratório, utilizando o meio ASN III, com temperatura e fotoperíodo controlados, *Synechococcus* sp. cresceu rapidamente e sem contaminação, mas o mesmo não aconteceu com *P. agardhii*. O cultivo desta estava sempre contaminado com a outra espécie e não vingava quando o volume era aumentado. Sendo assim, prosseguiu-se com o estudo apenas da cepa de *Synechococcus* sp., uma vez que foi possível cultivar grandes volumes para obtenção dos extratos, utilizados nos ensaios de toxicidade.

Synechococcus sp. é uma cianobactéria picoplanctônica (0,2 à 2,0µm), distribuídas especialmente nos oceanos tropical e subtropical, tendo um importante papel na ecologia da comunidade planctônica, especialmente em regiões oligotóficas e mesotróficas (CAMPBELL; VAULOT, 1993). Os membros deste grupo estão adaptados à vida nos oceanos com elevadas exigências de Na⁺, Cl⁻, Mg²⁺ e Ca²⁺, além disso, tem a capacidade de adquirir metais traço em concentrações submicromolar encontradas nos mares oligotróficos (WATERBURY; WEEBB, 2011).

Devido à difícil identificação, esses organismos são muitas vezes negligenciados nos estudos de comunidades fitoplanctônicas, tendo assim pouco conhecimento a cerca de seu potencial tóxico (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009). Contudo, trabalhos como os de Sivonen; Börner (2008) mostram a produção de microcistina por diversos gêneros, como *Arthrospira*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Plectonema*, *Pseudanabaena*, *Synechocystis* e inclusive *Synechococcus*.

Martins *et al.* (2007) trabalhando com várias cepas dos gêneros *Synechococcus* e *Synechocystis* isoladas da costa de Portugal, mostraram que alguns extratos brutos e metanólicos apresentaram-se tóxicos para rotíferos (*Brachionus plicatilis*), embriões de ouriço do mar (*Paracentrotus lividus*), mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) e náuplios de

Artemia salina. Estes últimos, quando expostos a concentrações de 100 mg/mL do extrato bruto derivado de quatro entre as seis cepas de *Synechococcus* sp. testadas, morriam após 24 h de exposição. Com relação à exposição aos extratos metanólicos, apenas três cepas apresentaram alguma toxicidade em porcentagem de mortalidade ($16,1 \pm 5,2\%$; $8,2 \pm 0,8\%$ e $12,4 \pm 4,2\%$) após 48 h. Para os rotíferos, apenas uma cepa de *Synechococcus* apresentou toxicidade, acarretando numa mortalidade de $20,9 \pm 5,5\%$ aos animais expostos ao extrato bruto por 24 h.

No presente estudo, a exposição dos misidáceos ao extrato metanólico de *Synechococcus* sp., levou a uma mortandade de 13,3% na concentração de 30 mg/L no período de 96 h de exposição, enquanto na concentração de 100 e 300 mg/L houve uma mortandade de 100% com 48 h de exposição, mas essas mortes podem estar relacionadas à queda de oxigênio dissolvido nas três réplicas das duas concentrações. A queda dessa variável pode ter se dado pelo fato de o ensaio ser do tipo estático, ou seja, sem renovação da solução teste e sem aeração, contudo esse resultado foi observado com apenas 48 horas de exposição, assim não podemos descartar um possível efeito da toxina ou ainda como relatado por Takenaka *et al.* (2007) que avaliando a toxicidade de extratos de florações de cianobactérias de reservatórios do Rio Tietê-SP em *Ceriodaphnia dubia* e *C. Silvestrii*, encontraram resultados similares, onde os autores afirmam que devido à processos de decomposição observados nos ensaios como: odor, redução do pH e da concentração de oxigênio dissolvido, pode ter havido proliferação de bactérias e de outros microrganismos nas suspensões dos extratos.

Os efeitos causados da intoxicação por cianobactérias tem sido descrito para diferentes organismos como *Artemia* e *Daphnia* (LINDSAY *et al.*, 2006), caranguejo (DEWES *et al.*, 2006), moluscos (JUHEL *et al.*, 2006) e peixes (SILVA, 2008). Porém, Martins *et al.* (2007) afirmam que o impacto de cianobactérias em invertebrados marinhos necessita ser melhor investigado para elucidar os danos a longo prazo induzidos pelo contato com esses microrganismos.

Um desses estudos seriam os de bioacumulação, como os trabalhos de Engström-Öst *et al.* (2002), o qual verificaram a bioacumulação e transferência de cianotoxina produzida pelo genêno *Nodularia* em misidáceo, evidenciando o risco dessas toxinas alcançarem outros níveis tróficos. Ferrão-Filho *et al.* (2009) afirmaram que o zooplâncton é a principal rota de

bioacumulação de cianotoxina, enquanto que o estudo realizado por Chorus; Bartram (1999) mostrou a bioacumulação de cianotoxina em salmão e em larvas de caranguejo. Essa transferência entre os níveis tróficos pode atingir níveis superiores, podendo chegar aos seres humanos, principalmente através do consumo desses organismos, tornando-se num risco também para a saúde pública.

Já para os ensaios com camundongos, não houve letalidade dos animais expostos tanto ao extrato quanto às células vivas de *Synechococcus* sp., observando-se apenas alterações histopatológicas no rim e fígado dos animais, algumas delas semelhantes à encontradas nos extratos da assembléia fitoplanctônica, como por exemplo hemorragias glomerular e intestinal nos rins. Entretanto, mais uma vez, esses danos não apresentaram grande severidade, podendo ser reversíveis caso os animais parassem de receber as doses. Apesar disso, essas alterações mostram certa toxicidade, mesmo que baixa, da cepa estudada. Isso fica também evidenciado em um trabalho realizado por Feitosa (2010) estudando a citotoxicidade da mesma cepa do presente trabalho às células HB4a, no qual o autor observou que o extrato metanólico mostrou-se tóxico para a membrana de eritrócitos de camundongos *Mus musculus*, evidenciado nas maiores concentrações (300 e 1000µg/mL), sugerindo morte celular.

Como dito anteriormente, o gênero *Synechococcus* muitas vezes é negligenciado nos estudos de identificação de assembléias fitoplanctônicas, como consequência existe pouco conhecimento a cerca de seu potencial tóxico, diferentemente de outros melhores estudados, como por exemplo, *Microcystis* (HAZANATO; YASUNO, 1987; HIETALA *et al.*, 1995; DAWSON, 1998; FERRÃO-FILHO *et al.*, 2002; FERRÃO-FILHO; AZEVEDO, 2003; BUTLER *et al.*, 2009). No presente estudo, *Synechococcus* sp. não apareceram nas análises da composição específica, mas estavam presentes nos viveiros, de onde puderam ser isoladas. Dessa forma, há necessidade de mais atenção a esse gênero, pois este trabalho mostra a possível capacidade de produção de toxina por esses organismos.

2.6. Conclusões

A análise da bundância relativa e composição específica da assembléia fitoplanctônica da água dos viveiros de cultivo de camarão marinho, mostrou um grande número de espécies de quase todas as classes do fitoplâncton, inclusive cianobactérias, sendo que essas apareceram em maior diversidade no período chuvoso, mostrando que os viveiros estudados estavam propícios ao aparecimentos desses organismos.

Danos nos rins e fígados dos camundongos expostos aos extratos da assembléia fitoplanctônica da água dos viveiros de cultivo de camarão marinho foram observados, evidenciando assim, a possível presença de toxinas nesses extratos, apesar da não observação de mortande nem de comportamentos anormais nos animais.

A toxicidade do extrato e das células vivas de *Synechococcus* sp. em camundongos foi evidenciada apenas por danos observados no fígado e rins dos animais tratados, danos esses que apesar de reversíveis, confirmam a possível produção de toxina pela cepa estudada. Na exposição dos misidáceos ao extrato de *Synechococcus* sp., foi encontrada uma CL₅₀ de 48,62 mg/L (42,78 – 55,26).

3. CAPÍTULO 2. Toxicidade do Metabissulfito de Sódio

3.1. Introdução

O metabissulfito de sódio (MBS) ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), conhecido também como pirossulfito de sódio e bissulfito de sódio, é um sal inorgânico na forma de pó, incolor e com leve odor de dióxido de enxofre, sendo classificado como perigoso, além de ser nocivo por inalação ou ingestão e causar ainda irritação nos olhos e garganta (QGN, 2004). Em contato com água produz dióxido de enxofre (SO_2) e bissulfito de sódio (NaHSO_3), agentes redutores fortes (MACHADO; TOLEDO, 2006). Adicionalmente é um agente sulfitante, e por isso classificado como aditivo alimentar, atuando na inibição da deterioração provocada por bactérias, leveduras e fungos em alimentos ácidos, bem como na inibição de reações de escurecimento enzimático e não enzimático durante processamento e estocagem (LECLERCQ *et al.*, 2000). Além da indústria alimentícia, esse produto é utilizado nas indústrias farmacêutica (BALBANI *et al.*, 2006), galvanoplastia (PIMENTEL, 2003), têxtil (EPA, 1997), curtume (PACHECO, 2005), pesqueira (SILVA JUNIOR; OLIVEIRA, 2005) dentre outras.

O uso do MBS na atividade da carcinicultura tem como objetivo evitar a ocorrência de melanose (manchas pretas) no camarão. Essas manchas devem-se ao aparecimento de estruturas melanínicas formadas pela oxidação de compostos do tipo mono e polifenóis, através de reações enzimáticas na presença de oxigênio molecular (MARCOS; MAQUEDA, 2003). Após a despesca, os camarões são imediatamente sacrificados por meio de choque térmico em uma solução aquosa com gelo e MBS, sendo a concentração e o tempo de imersão estabelecidos pelo tamanho dos camarões, o que pode ser de 7 a 9 % e de 12 a 15 minutos de imersão. Quanto à utilização para o beneficiamento de camarão, o MBS é aprovado pelo Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS/Nº4/88) e FDA (Food and Drugs administration, EUA), desde de que as concentrações não ultrapassem no produto final (produto cru) 100 ppm (NUNES *et al.*, 2005).

No entanto, apesar da eficácia e importância da utilização desse produto, inúmeros efeitos adversos à saúde humana têm sido relacionados à sua ingestão, principalmente crises asmáticas em indivíduos com sensibilidade a sulfitos (ANIBARRO *et al.*, 1992; VALLY; THOMPSON, 2003). Já em relação a questão ambiental, quando esse composto é lançado no ambiente, por ser um agente oxidante, reage com oxigênio dissolvido da água formando

sulfato ácido de sódio que se dissocia em sódio e íons bissulfito, diminuindo assim a concentração de oxigênio na água, onde cada miligrama de bissulfito de sódio consome 0,15 mg/L de oxigênio dissolvido (CRUZ, 2004). Sabe-se que o oxigênio é essencial à vida dos organismos, participando de diversas atividades oxidativas e liberando a energia necessária para o trabalho biológico, sendo assim, baixas concentrações desse parâmetro na água podem causar efeitos negativos no crescimento, alimentação, reprodução e ainda o aumento na incidência de doenças nos organismos aquáticos (KUBITZA, 1998).

Outro problema que tem sido relacionado a essa questão do oxigênio, é a produção das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), as quais podem causar danos em macromoléculas. Tem sido sugerido que a produção de EROs em anóxia / hipóxia é reduzida e não há motivos para melhoria das defesas antioxidantes. No entanto, os animais que sofrem naturalmente grande variação na disponibilidade de oxigênio são capazes de aumentar o seu potencial antioxidante em hipóxia ou de hibernação; sendo esse, um mecanismo de preparação usado para lidar com o estresse oxidativo fisiológico que ocorre rapidamente durante a reoxigenação futura (HERMES-LIMA *et al.*, 1998; HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVIN, 2002). Com isso, para tentar reduzir os efeitos negativos desse estresse, os organismos dispõem de um eficaz sistema de defesa contra as EROs, o qual incluem: antioxidantes não-enzimáticos (ácido ascórbico, alfa-tocoferol, ácido úrico, etc) e antioxidantes enzimáticos (superóxido desmutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione-s-transferase, etc).

As glutathione-s-transferase (GSTs) pertencem a uma família multifuncional de proteínas envolvidas no processo de detoxificação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos como herbicidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais. Esta, catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com compostos endógenos ou exógenos de poluentes, gerando produtos menos tóxicos e mais solúveis em água, sendo assim mais facilmente excretados pelas células (CALLAGHAN *et al.*, 2002). A atividade da GST entre outros biomarcadores são muito utilizados no monitoramento da qualidade de ecossistemas aquáticos (MONTEIRO *et al.*, 2006; QUINTANEIRO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Enquanto que a catalase (CAT) é uma heme proteína citoplasmática componente de defesa antioxidante primário na qual exerce a função de reduzir o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a água e oxigênio (AEBI, 1984). Segundo Chandran *et al.* (2005) e Avilez

et al. (2008) esta é importante para o monitoramento por ser uma enzima que apresenta elevada atividade quando o organismo se encontra em estresse oxidativo.

Já a acetilcolinesterase (AChE) é conhecida por desempenhar um papel importante na neurotransmissão colinérgica e na degradação hidrolítica do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas na maioria das espécies animais. Xuereb *et al.* (2009) afirmam que a inibição dessa enzima leva à superestimulação dos sistemas nervosos central e periférico, resultando até mesmo em efeitos deletérios neurotóxicos nos organismos. Em invertebrados, o acúmulo de acetilcolina devido a inibição da AChE induz hiperatividade, tremores, convulsões e paralisia (LUND *et al.*, 2000) e segundo BÁLINT *et al.* (1995) a inibição dessa enzima pode ser perigosa para peixes, principalmente por atingir a atividade natatória, comprometendo a alimentação e a fuga de seus predadores.

Apesar de existir uma legislação que obrigue as fazendas de camarão a construir bacias de sedimentação, sendo essas destinadas para o tratamento dos efluentes, inclusive para a solução de MBS utilizada nas despesas, muitas não cumprem tal legislação e assim descartam sem tratamento o MBS nos corpos receptores. Como foi descrito por Cruz (2004), onde este reporta que segundo relato de carcinicultores, consultores e trabalhadores, o descarte da solução de MBS é realizada de várias maneiras: no próprio local da drenagem, disposto a céu aberto, enterrado em valas escavadas e até em cisternas fechadas localizadas próximo aos viveiros, onde este passa por um processo de neutralização.

De acordo com a Resolução CONAMA N° 20 de 1986, o teor máximo de sulfito contido em efluentes lançados nos corpos d'água era de 1,0 ppm, porém essa resolução foi substituída pelo CONAMA N° 357 de 2005, sendo que esta última não faz referência a quantidade de sulfitos. Apesar do valor descrito na antiga resolução, não se sabe a quantidade desse produto que poderia ser lançado no ambiente sem causar danos ao ecossistema, uma vez que poucos dados para a ecotoxicidade desse produto são encontrados na literatura, como os estudos de Aragão *et al.* (2008) que avaliaram a toxicidade aguda do MBS em *Mysidopsis juniae* e encontraram uma CL_{50} (96h) de $38,2 \pm 4,7$ mg/L.

Outros estudos estão relacionados aos efeitos genotóxicos, como os de Rencuzogullari *et al.* (2001a) que expõem *Allium cepa* ao MBS nas concentrações de 7,5, 15 e 30 mg/L por 10 e 20 h, observaram uma diminuição significativa do índice mitótico em todas as

concentrações e períodos de tratamento. Esses autores afirmam que esses resultados mostraram que o referido produto tem um efeito citotóxico em concentrações muito inferiores às sugeridas pelo Ministério da Agricultura da Turquia (máximo de 300 mg/L em alimentos), já Carvalho *et al.* (2011) avaliaram a toxicidade e mutagenicidade causada pelo MBS descartado por uma fazenda de camarão no corpo hídrico no estado do Piauí. Os resultados mostraram que todas as amostras tanto da água quanto do sedimento (10, 25 e 50 % de diluição) coletadas a 100 m a jusante e a montante da fazenda e no ponto de descarga do produto, durante as estações seca e chuvosa, induziram toxicidade, observada pela inibição do crescimento da raiz e do índice mitótico de *A. cepa*. Contudo, não foram detectados nem micronúcleos nem aberrações cromossômicas. Porém, Mishra *et al.* (2011) observaram um aumento nas anormalidades cromossômicas, como os micronúcleos e ainda uma diminuição das raízes e índice mitótico expondo o mesmo organismo teste em MBS nas concentrações de 10, 20 e 30 mg/L com 10 e 20 h de exposição

Com isso, torna-se necessário o desenvolvimento de mais pesquisas com o MBS para avaliar os efeitos quando este se encontra no meio ambiente. Sendo assim, os ensaios ecotoxicológicos agudos e/ou crônicos utilizando organismos de diferentes níveis tróficos poderiam auxiliar em uma melhor avaliação dos possíveis danos à biota quando esses estão em contato com o referido produto.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo geral

Avaliar a toxicidade ambiental do metabissulfito de sódio através de realização de bioensaios com organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos.

3.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar a toxicidade e avaliar níveis de efeitos para as espécies selecionadas *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Palaemon serratus* e *Daphnia magna*.
- ✓ Verificar se a exposição ao metabissulfito de sódio provoca alterações no consumo do oxigênio em *Palaemon serratus*.
- ✓ Verificar se a exposição ao metabissulfito de sódio provoca estresse oxidativo (Catalase, Glutathione-S-Transferase) ou efeitos neurológicos (Acetilcolinesterase) em *Palaemon serratus* e *Danio rerio*.
- ✓ Verificar se a exposição ao metabissulfito de sódio causa efeitos no desenvolvimento embrio-larval de *Danio rerio*.

3.3. Material e Métodos

3.3.1. Solução estoque

As soluções de MBS (Sigma Aldrich Inc.) foram preparadas no dia da realização dos ensaios utilizando-se como diluente água do mar artificial à 35 de salinidade (sal marinho diluído em água destilada) para os ensaios realizados com camarões e água destilada para os ensaios com organismos dulcícolas (peixes, daphnia e microalga).

3.3.2. Organismos teste

Os bioensaios foram realizados utilizando quatro espécies de diferentes níveis tróficos e filéticos. Todos os organismos foram fornecidos ou coletados pelo Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal. Seguem abaixo os detalhes pertinentes a cada uma das espécies utilizadas.

3.3.2.1. *Pseudokirchneriella subcapitata*

A microalga *P. subcapitata* (Figura 9) é recomendada como espécie padrão para ensaios de toxicidade com algas (OECD, 2006a), sendo cultivada em sala com temperatura de 20 °C e fotoperíodo de 16 h luz: 8 h escuro, em frascos de 5 litros com meio MBL (GUILHERMINO, 1996). Para a realização do ensaio, as células deveriam estar na fase exponencial de crescimento, numa concentração de 10^5 céls/mL.

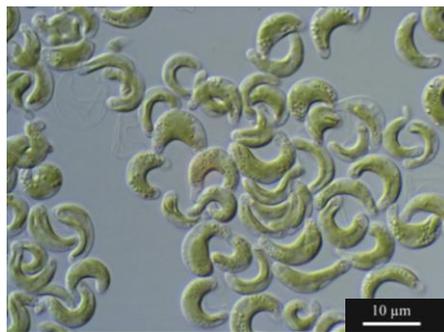


Figura 9 – Microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*

3.3.2.2. *Daphnia magna*

O microcrustáceo de água doce, *Daphnia magna* tem sido amplamente utilizado como indicador biológico em estudos de controle da qualidade da água, ensaios de toxicidade na

avaliação de efluente e de diversas substâncias (VIGANÓ 1993; DAO *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2011).

As culturas de *D. magna* (Figura 10) eram mantidas em frascos de vidro de 1 L com meio água dura ASTM (ASTM, 1980), renovadas três vezes por semana e alimentadas diariamente com *P. subcapitata* na concentração de 3×10^5 céls/mL suplementada com 0,4 mL de extrato orgânico de *Ascophyllum nodosum* (BAIRD *et al.*, 1989). As culturas eram mantidas em câmara com fotoperíodo (16 h luz: 08 h escura) e temperatura (20 ± 1 °C).



Figura 10 – Cladóceros *Daphnia magna*.

3.3.2.3. *Palaemon serratus*

Os camarões *Palaemon serratus* (Figura 11) foram coletados na Ria de Aveiro, Portugal, através de uma rede tipo pulsar. Estes eram levados ao laboratório, separados por tamanho, onde apenas os juvenis (20 a 25 mm) eram utilizados nos ensaios e posteriormente colocados em aquários preparados com água do mar artificial com salinidade de 35 ± 1 . Os animais eram aclimatados por quatro dias antes da realização dos ensaios e náuplios de artemia eram ofertados com alimento *ad libitum*. Em relação ao modelo biológico do estudo, esses animais tem sido muito bem reportados em diferentes trabalhos ecotoxicológicos, inclusive de biomarcadores (LOVELL *et al.*, 2005; FRASCO *et al.*, 2006; FRASCO *et al.*, 2008).



Figura 11 – Camarão *Palaemon serratus*.

3.3.2.4. *Danio rerio*

Os peixes paulistinhas, como chamado vulgarmente o *D. rerio* (Figura 12) ou ainda zebrafish em inglês, são amplamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos (BERTOLETTI, 2009; KIENLE *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009; DOMINGUES *et al.*, 2010). Os ensaios do desenvolvimento embrio-larval com paulistinhas têm sido cada vez mais utilizados em ecotoxicologia, tanto para complementar as informações dadas pelos ensaios com adultos como também uma alternativa de substituição aos mesmos (DOMINGUES *et al.*, 2010).

Somente *D. rerio* linhagem ABtw foram utilizados. A água do cultivo foi tratada por osmose reversa e filtros de carvão ativado. A temperatura da sala de cultivo era mantida a $28,0 \pm 1$ °C com fotoperíodo de 16 h luz:08 h escuro, e a água ajustada com as seguintes propriedades: condutividade 750 ± 50 mS, pH em $7,5 \pm 0,5$, oxigênio dissolvido, igual ou superior a 95% de saturação. Os peixes adultos eram alimentados duas vezes ao dia com dieta artificial comercialmente disponível (ZM 400 Granular) e artêmia. Para a coleta dos ovos, bolas de vidro eram colocadas nos aquários um dia antes dos ensaios para que os adultos não comessem os ovos. No dia seguinte, esses eram separados, lavados com uma peneira e observada a fertilização em microscópio.



Figura 12 – Peixe *Danio rerio*.

3.3.3. Avaliação da toxicidade

3.3.3.1. Inibição do crescimento

Pseudokirchneriella subcapitata

Para esse ensaio utilizou-se o método descrito por Blaise; Féraud (2005) com algumas modificações. O experimento foi realizado em triplicata com placas estéreis de 24 cavidades, onde eram adicionados 100 µL de algas numa concentração de 10^5 céls/mL e 900 µL da

solução de MBS de modo que fossem atingidas as concentrações de 19; 29; 44; 66; 100; 150; 225 mg/L. Como controle foi utilizado o meio de cultivo das algas (MBL). As placas foram mantidas em luz ininterrupta a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 72h. A taxa de inibição foi avaliada pela leitura em espectrofotômetro (Jenway, 6505 uv/vis spectrophotometer) da absorbância a 440 nm.

3.3.3.2. Ensaios de letalidade

Daphnia magna

Este ensaio seguiu o protocolo padronizado da OECD (2004), onde filhotes da 3ª geração com até 24 horas após o nascimento foram expostos às concentrações de 29; 44; 66; 100; 150 e 225 mg/L do MBS. O ensaio consistiu em expor 5 organismos em frascos de vidro com 20 mL da solução teste e como controle meio ASTM (ASTM, 1980), nas mesmas condições do cultivo. Contagens do número de animais mortos com 24 e 48 horas foram realizadas. As variáveis pH e oxigênio dissolvido foram medidas no início e ao final do ensaio.

Palaemon serratus

Os animais foram expostos em triplicata a diferentes concentrações do MBS (15; 30; 50 e 100 mg/L), sendo o controle água do mar artificial com salinidade de 35 ± 1 , em frascos de vidro de 1 L, sem aeração. Cada frasco recebia 10 juvenis e eram fechados com uma malha para evitar fugas. A solução foi renovada com 48 horas nas mesmas concentrações devido a possível degradação do composto, assim como o controle, sendo o ensaio finalizado com 96 horas. Diariamente era observado se haviam animais mortos, para então serem retirados e posteriormente ofertado náuplios de artemia. Variáveis físico-químicas (salinidade, oxigênio dissolvido e pH) foram mensuradas no início, no dia da renovação da solução e ao final do ensaio.

3.3.3.3. Efeitos fisiológicos nos camarões

Taxa do consumo de oxigênio

O consumo do oxigênio foi determinado por um respirômetro simples e estático, usando seringas de 50 mL (Hamilton, USA). Para isso os camarões foram expostos por 24 horas nas mesmas condições descritas no item 3.3.3.2. nas concentrações de 7,5; 15 e 30 mg/L de MBS. Após essa exposição, os animais foram colocados nas seringas com água do mar artificial (50 mL) previamente oxigenada, sendo 1 camarão por seringa e 5 seringas por concentração. Todas foram então colocadas em um banho-maria fechado a 20 °C. Após 1 hora, a concentração inicial do oxigênio foi mensurada com um oxímetro (modelo 782, com eletrodo de oxigênio modelo 1302, Strathkelvin Instruments, Glasgow), onde uma alíquota de 70 µL da água de cada seringa foi retirada com uma seringa de 0,5 mL e injetada manualmente na câmara do eletrodo a uma taxa constante de 0.5 mL/min e a leitura anotada após 1 minuto. Ao final de 2 horas, as concentrações de oxigênio foram novamente mensuradas e os organismos colocados em estufa a 60 °C para análise do peso seco.

O consumo de oxigênio final foi determinado pela diferença no teor de oxigênio da água antes ($T_{inicial} = 1$ h) e depois ($T_{final} = 2$ h) e a taxa respiratória foi expressa em mg de oxigênio consumido por mg do organismo por hora. Cinco controles em branco (seringas com água do mar e ausência de organismos) foram utilizados para corrigir a depleção de oxigênio devido a fatores que não a respiração do organismo (p.ex. respiração microbiana).

Atividades enzimáticas

Para as análises das atividades enzimáticas foram escolhidas três enzimas. A acetilcolinesterase (AChE), onde a produção e funcionamento dessa enzima tem sido associada ao estresse oxidativo provocada por fatores ambientais (SOUZA *et al.*, 2010) e doenças neurológicas (TOIBER; SOREQ, 2005). Além disso a hipóxia direciona a uma mudança no estado oxidativo sendo um modulador potencial de resposta para a AChE. Já a glutationa-s-transferase (GST) e catalase (CAT), por estarem relacionadas ao estresse oxidativo, descritas na literatura como eficientes antioxidantes nas respostas de ambientes com baixas concentrações de oxigênio (GOROKHOVA *et al.*, 2012).

Para as análises das atividades das enzimas AChE, GST e CAT, os camarões foram expostos ao MBS nas mesmas condições experimentais descritas no item 3.3.3.2., sendo as concentrações 7,5; 15; 30 e 50 mg/L.

Ao final de 24 e 48 h de exposição ao MBS, 10 animais de cada concentração e do controle foram sacrificados para a retirada do hepatopâncreas e da cabeça sem os apêndices, que foram utilizados para o cálculo das atividades enzimáticas. Essas amostras eram colocadas em microtubos (2 mL) e acondicionados em gelo durante o processo de retirada. Posteriormente eram estocados em ultrafreezer (-80 °C) até a realização das leituras.

O teor de proteína em todas as amostras foi determinado, em quadruplicata, pelo método de Bradford (1976) a 595 nm utilizando γ -globulina como padrão. As leituras foram realizadas em um leitor de microplacas (Labsystem Multiskan EX). No dia das análises as amostras foram descongeladas em gelo e homogeneizadas em homogeneizador (Ystral GmbH D-7801) com tampões específicos para cada atividade.

Para determinações da atividade da AChE, as cabeças sem os apêndices dos camarões foram homogeneizadas em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 7,2. O sobrenadante obtido após a centrifugação do homogeneizado (4 °C, 6000 g, 4 min) foi utilizado como extrato enzimático. A atividade foi medida em leitor de microplacas (Labsystem Multiskan EX) em quadruplicata a 25 °C e leitura da absorbância em 414 nm utilizando como substrato acetiltiocolina de acordo com o método de Ellman *et al.* (1961) adaptado para análise em microplaca (GUILHERMINO *et al.*, 1996). A atividade foi expressa como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 nmol do produto por minuto por miligrama de proteína.

Já os hepatopâncreas foram utilizados para a análise da atividade da GST. Esses tecidos foram homogeneizados em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (Sigma Aldrich Inc.) 0,1 M; pH 6,5 e centrifugados (4 °C, 9000 g, 3 min) e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade de acordo com Habig; Jakoby (1981), utilizando o 1-cloro-2, 4 dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A leitura da atividade a 340 nm, também foi realizada em leitor de microplacas (Labsystem Multiskan EX) utilizando microplacas (GUILHERMINO *et al.*, 1996). A atividade foi expressa como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 nmol do produto por minuto por miligrama de proteína.

A atividade da CAT foi mensurada no hepatopâncreas, seguindo a metodologia descrita por Clairborne (1985). As amostras foram homogeneizadas em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (Sigma Aldrich Inc.), 0,05 M; pH 7,0 e centrifugadas (4 °C, 15000 g, 15

min) e o sobrenadante utilizado para as análises. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Jenway, 6505 uv/vis spectrophotometer) utilizando uma cubeta UV, onde foi colocado 50 µL da amostra, 500 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - 0,030 M) (Sigma Aldrich Inc.) e 950 µL do tampão. Posteriormente, a decomposição do substrato (H₂O₂) foi mensurada a 240 nm durante 90 seg e a atividade expressa em µmol por minuto por proteína.

3.3.3.4. Ensaios com *Danio rerio*

Desenvolvimento embrio-larval

O ensaio de toxicidade com embriões de *D. rerio* foi baseado na “Guideline on Fish Embryo Toxicity Test” (OECD, 2006b). Os embriões foram expostos durante 4 dias em placas de 24 cavidades, onde cada poço recebia um ovo com 24 horas e 2 mL da solução teste, MBS nas concentrações de 29, 44, 66; 100; 150; 225; 300 e 350 mg/L. Essas soluções foram preparadas com a mesma água utilizada nos controles (pH 7,5 ± 0,5 e condutividade 750 ± 50 mS). A temperatura durante o ensaio foi de 26,0 ± 1 °C. Os embriões e as larvas foram observadas diariamente com a ajuda de um microscópio estereoscópico (ZoomMicroscope-SMZ 1500, Nikon Corporation, Japan) e avaliadas as variáveis de desenvolvimento. Na fase de embrião, as variáveis avaliadas foram: coagulação do ovo, formação do otólito, pigmentação corporal e do olho, formação de somitos, batimento cardíaco, circulação da cauda, destacamento da cauda e brotamento do saco vitelino, já após a eclosão, foram avaliados: edemas, má formação da coluna, equilíbrio e mortalidade.

Ensaio com adultos

O ensaio com peixes adultos seguiu a OECD Guideline TG 203 (OECD, 1992) em condições de teste estático. Peixes adultos com comprimento e idade semelhantes (2 ± 0,5 cm, 1 ano de idade) foram selecionados. Todas as soluções teste foram preparadas por diluições sucessivas das soluções estoque em água com pH 7,5 ± 0,5 e condutividade 750 ± 50 mS, nas concentrações 19; 29; 44; 66 e 100 mg/L de MBS. A água utilizada como controle tinha as mesmas características de pH e condutividade. Dois peixes (um macho e uma fêmea) eram colocados em cada réplica (5 por concentração). Os peixes não foram alimentados e mortalidades e/ou alterações de comportamento foram registrados durante o período de exposição. Os valores de oxigênio dissolvido mantiveram-se iguais ou superiores

a 90% de saturação (ensaio aerado) e o fotoperíodo mantido com 12 h luz:12 h escuro, com temperatura de 26 ± 1 °C. Ao final de 96 h, os animais sobreviventes foram sacrificados e separados diferentes tecidos (cabeça, brânquia, fígado e músculo) para as análises enzimáticas. Esses tecidos foram colocadas em microtubos (Eppendorf, Hamburg, Germany) de 2 mL e armazenados em ultrafreezer (-80 °C) até a realização das leituras.

Atividade enzimática

Cabeça, fígado, brânquias e músculo foram utilizados para a análise da atividade da GST, sendo cabeça e músculo também utilizados para a determinação da atividade da AChE. Todos os protocolos para o cálculo dessas atividades e do teor de proteína seguiram os mesmo descritos no item 3.3.3.3. para os camarões.

3.3.4. Análises estatísticas

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda com *P. serratus* e *D. magna* foram analisados através do método “Trimmed Spearman-Kärber” (HAMILTON *et al.*, 1978). Esse método estima a concentração letal média (CL₅₀) e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) utilizando os dados de mortalidade observados em cada concentração.

O ensaio da taxa do consumo do oxigênio para os camarões, as atividades enzimáticas mensuradas nos camarões e nos peixes foram analisados por ANOVA unifatorial utilizando o Graphpad Prism 5.00 (2007).

Para o ensaio da taxa de inibição do crescimento das migroalgas, a concentração efetiva (CE₅₀) foi calculada pelo programa Toxrat[®]. Os resultados foram ainda comparados por ANOVA unifatorial.

O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$) para todas as análises realizadas e todos os resultados estão expreso como média \pm erro padrão da média (EPM).

3.4. Resultados

3.4.1. Avaliação da toxicidade

3.4.1.1. Inibição do crescimento: *Pseudokirchneriella subcapitata*

A exposição da microalga *P. subcapitata* ao MBS mostrou uma inibição do crescimento já na concentração mais baixa (19 mg/L), sendo totalmente inibido nas concentrações 150 e 225 mg/L (figuras 13), ficando a CE_{50} (72h) em 24,29 mg/L (13,77 – 32,01).

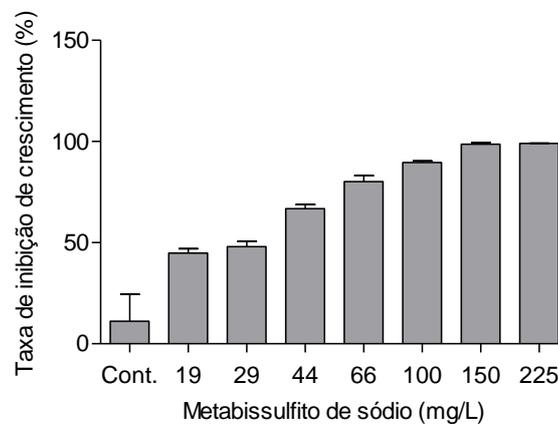


Figura 13 – Taxa de inibição de crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* em diferentes concentrações de metabissulfito de sódio.

3.4.1.2. Ensaios de letalidade

Daphnia magna

Nos ensaios com *D. magna* praticamente não houve sobreviventes após exposição ao MBS por 48 horas, excetuando o controle e a concentração de 29 mg/L na qual sobreviveram 18 indivíduos (Figura 14), sendo a CL_{50} de 34,90 mg/L. Essa alta mortalidade pode estar relacionada com os baixos valores de O.D. e pH. Onde esses apresentaram a partir da concentração de 66 mg/L, valores abaixo de 0,5 mg/L no início da exposição e valores abaixo de 4,0 no final da exposição, respectivamente (Anexo 8).

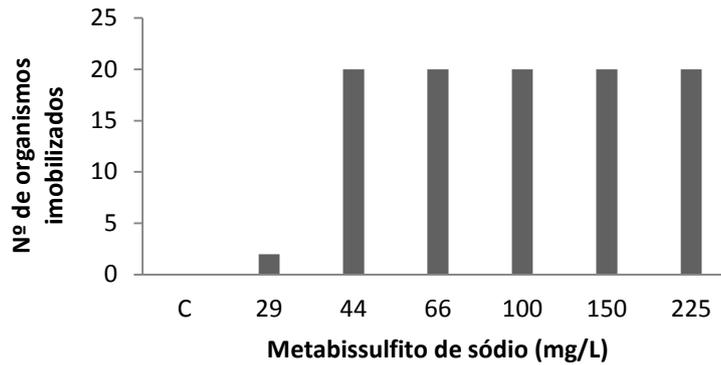


Figura 14 - Número de *Daphnia magna* imobilizados após exposição a diferentes concentrações do metabissulfito de sódio.

Palaemon serratus

A figura 15 mostra o número de camarões *P. serratus* mortos quando expostos ao MBS por 96 horas, onde se observa uma grande mortalidade na concentração mais alta (100 mg/L), sendo a CL_{50} encontrada de 69,65 mg/L (53,6 - 68,62).

As variáveis O.D., pH e salinidade nesse ensaio foram mesurados durante todos os dias da exposição. O O.D. variou de 7,20 a 0,36 mg/L e de 3,0 a 6,6 mg/L no início e ao final de 48 h de exposição, respectivamente. O pH no início do experimento variou de 8,16 a 6,82 e ao final das 48 h de exposição permaneceu entre 7,88 a 7,81. Ao final das 48 h de exposição uma nova solução foi preparada e os valores de O.D. variaram de 7,0 a 0,2 mg/L (solução nova) e de 1,5 a 3,1 mg/L (mais 48 h de exposição). O pH variou de 8,18 a 6,69 (solução nova), sendo ao final de mais 48 h de exposição, a variação ficando entre 7,79 e 7,60. A salinidade inicial foi de 35 e durante a exposição os valores não sofreram variações que pudessem afetar a toxicidade ou validação dos testes, ficando os valores entre o mínimo de 34 e o máximo de 37 (Anexo 9).

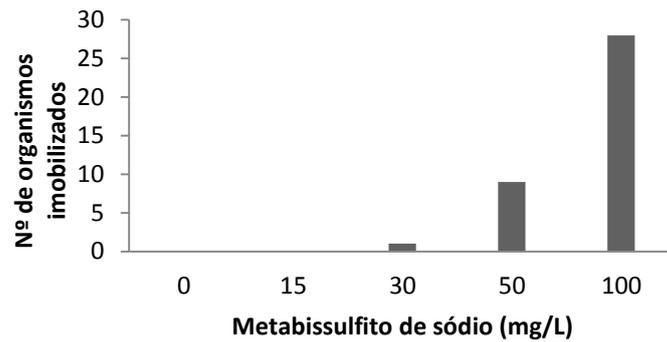


Figura 15 - Número de *Palaemon serratus* imobilizados após exposição a diferentes concentrações do metabissulfito de sódio.

3.4.1.3. Efeitos fisiológicos nos camarões

Taxa do consumo de oxigênio

A taxa do consumo de oxigênio foi mensurada nos camarões *P. serratus* após a exposição de 24 h ao MBS, e esta não mostrou alterações significativas no consumo de oxigênio em nenhuma das concentrações testadas ($F = 0.377$, $p = 0.77$) (Figura 16).

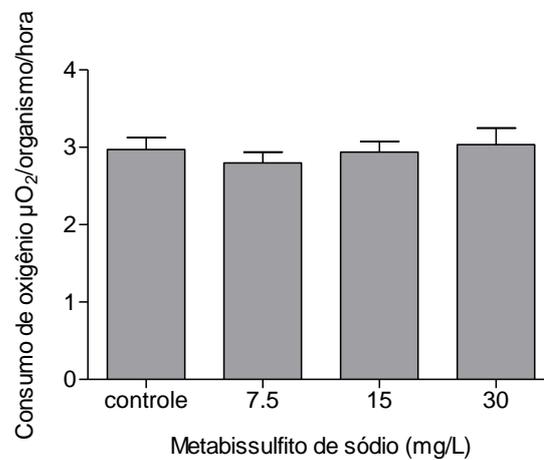


Figura 16 - Taxa do consumo de oxigênio (média \pm EPM) de camarão *Palaemon serratus* após exposição por 24 horas ao metabissulfito de sódio (ANOVA unifatorial).

Atividades enzimáticas

As atividades das enzimas AChE, GST e CAT também foram medidas para avaliar a toxicidade do MBS durante 24 e 48 h de exposição em juvenis de camarões *P. serratus*.

As figuras 17A e 17B, mostram a atividade da AChE na cabeça dos animais tratados com 24 e 48 h de exposição, respectivamente. Como pode-se observar, não houve diferença significativa ($F = 1.866$; $p = 0.0215$) entre as diferentes concentrações quando a exposição foi de 24 h, já quando essa exposição foi de 48 h observa-se uma diferença nas duas maiores concentrações (30 e 50 mg/L) ($F = 5.390$; $p = 0.0028$).

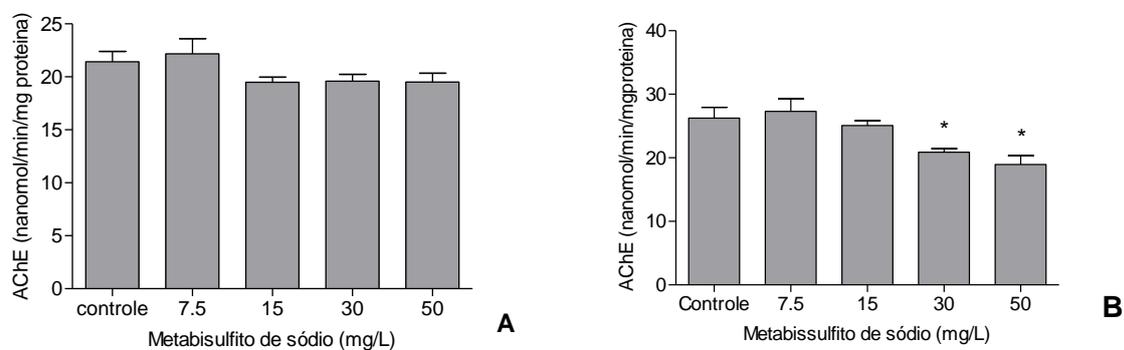


Figura 17 - Atividade da AChE (média \pm EPM) em cabeça de *Palaemon serratus*, expostos a diferentes concentrações do metabissulfito de sódio por 24 horas (A) e 48 horas (B). (* diferem estatisticamente do controle. ANOVA unifatorial, $p < 0,05$).

Também não foram observadas diferenças significativas nas atividades da GST ($F = 2.226$; $p = 0.0194$) e ($F = 4.981$; $p = 0.0116$) e nem da CAT ($F = 1.058$; $p = 0.0110$) e ($F = 1.609$; $p < 0.0001$), ambas mensuradas no hepatopâncreas, nos dois períodos de exposição (24 e 48 h), respectivamente (Figuras 18A e 18B e Figuras 19A e 19B, respectivamente).

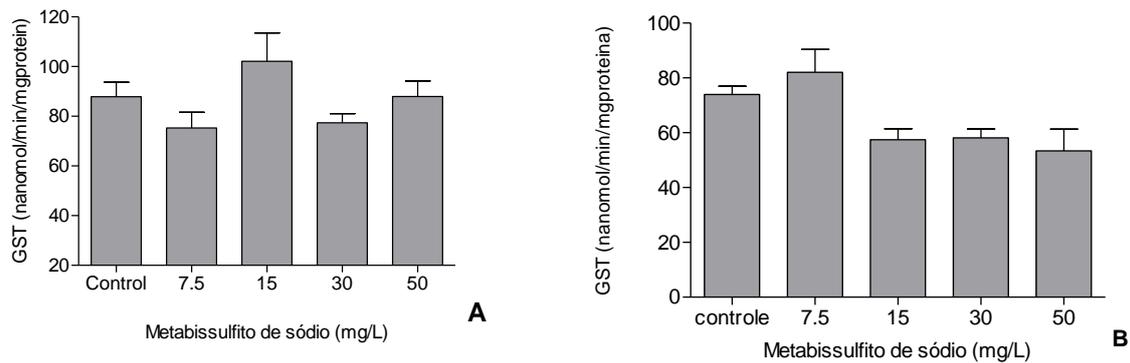


Figura 18 – GST (média \pm EPM) em hepatopâncreas de *P. serratus*, expostos ao metabissulfito de sódio por 24 horas (A) e 48 horas (B). ANOVA unifatorial ($p < 0,05$).

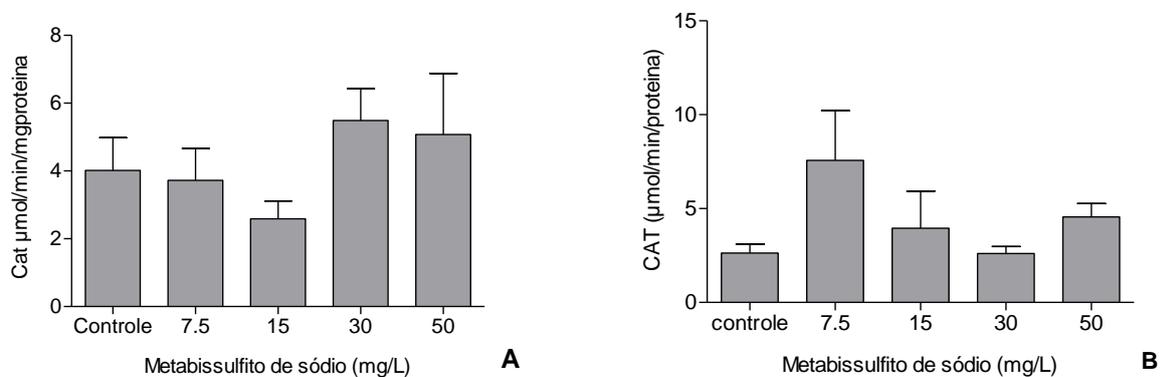


Figura 19 – CAT (média \pm EPM) em hepatopâncreas de *Palaemon serratus*, expostos em metabissulfito de sódio por 24 horas (A) e 48 horas (B). ANOVA unifatorial ($p < 0,05$).

3.4.1.4. Ensaio com *Danio rerio*

Desenvolvimento embrio-larval

No presente estudo, ovos de *D. rerio* fertilizados foram expostos em diferentes concentrações de metabissulfito de sódio. A figura 20 mostra a porcentagem de mortalidade desses ovos durante às 96 horas de exposição. As CL_{50} para cada 24, 48, 72 e 96 horas de exposição foram: 90,30 mg/L; 74,03 mg/L; 64,50 mg/L e 65,84 mg/L, respectivamente, onde observa-se um aumento da toxicidade com o aumento do tempo de exposição pelo menos até 72 horas, ocorrendo uma estabilização após esse tempo, podendo estar relacionado com a degradação do composto. A figura 21 mostra o número de ovos e embriões mortos (barras

pretas), a proporção de embriões que permaneceram vivos (barras cinza claras), eclodidos (barras brancas) e proporção de larvas mortas (barras cinza escuras). Observa-se ainda que nas maiores concentrações testadas (150 e 225 mg/L) os ovos morreram com 24 horas de exposição. O grupo controle apresentou desenvolvimento normal dos embriões como descrito por Kimmel *et al.* (1995) apresentando alguns efeitos como ovo coagulado, mas esses foram abaixo do exigido para validação do teste, que é uma mortalidade de 10 %.

A exposição dos ovos fertilizados ao metabissulfito de sódio, causou diferentes efeitos durante todo o desenvolvimento embrionário. Alguns efeitos como ovos coagulados, larvas sem equilíbrio, má formação do embrião podem ser observados na figura 22.

Outros efeitos como ausência do saco vitelino, má formação da cauda, ausência de otólito, retardo do desenvolvimento do olho, somito foram observados nas concentrações 29 e 44 mg/L. Já na concentração de 66 mg/L poucos ovos conseguiram eclodir, mas estes apresentaram efeitos como defeito na cauda, falta de equilíbrio, edemas e pigmentação anormal. Nas maiores concentrações (150 e 225 mg/L) todos os ovos de todas as réplicas foram destruídos. Os controles que estavam na mesma placa com as maiores concentrações (150 e 225 mg/L) foram todos destruídos sendo esses excluídos das análises.

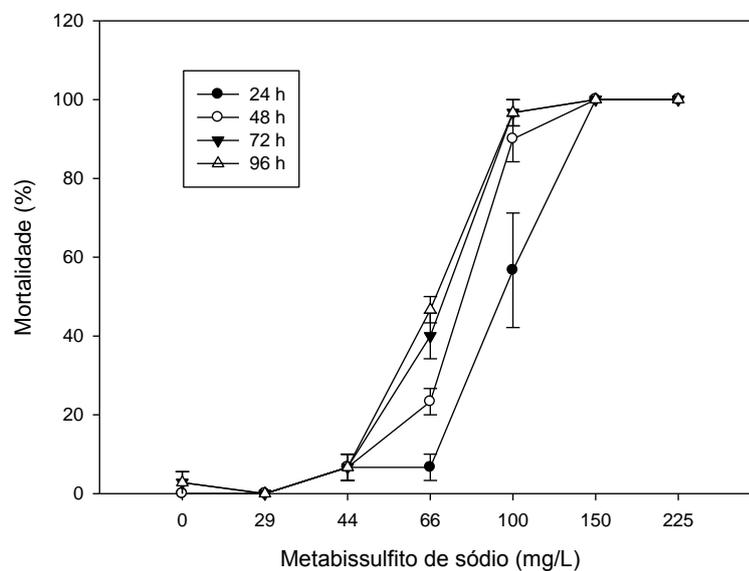


Figura 20 - Porcentagem de mortalidade durante o tempo de exposição de 96 horas dos ovos fertilizados de *D. rerio* nas diferentes concentrações testadas de metabissulfito de sódio.

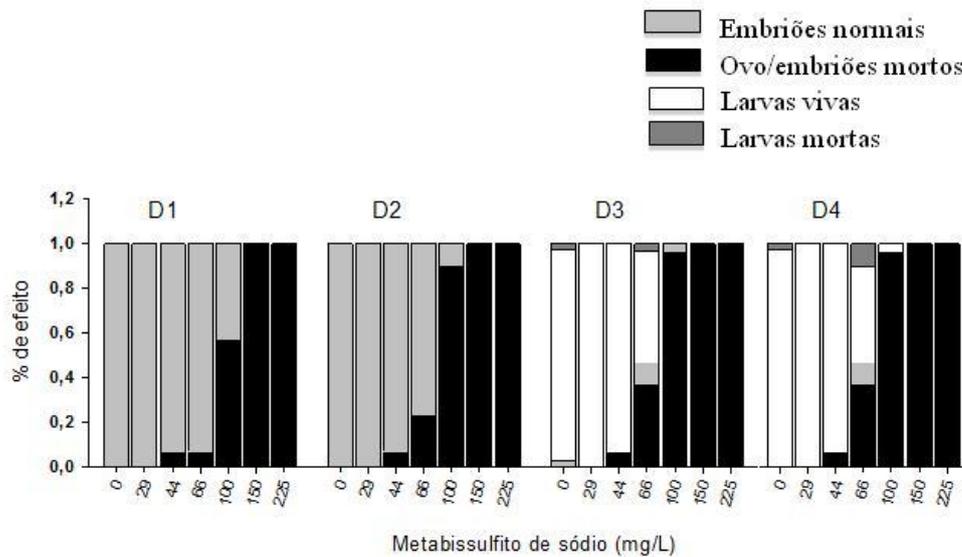


Figura 21 - Porcentagem dos diferentes efeitos causados pela exposição durante quatro dias (D1, D2, D3 e D4) de ovos de *Danio rerio* fertilizados ao metabissulfito de sódio.

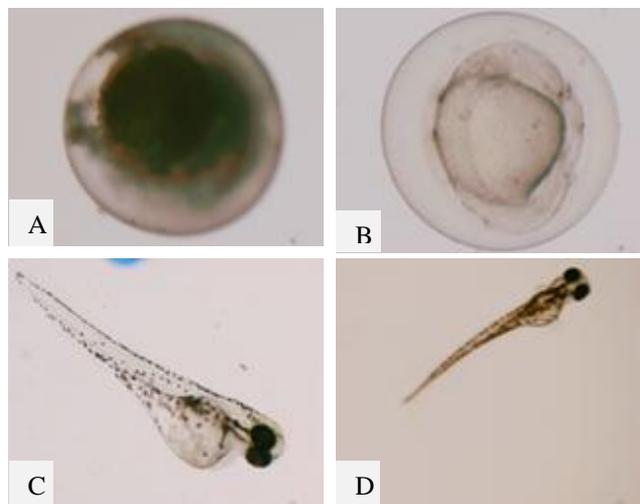


Figura 22 - Embriões e larvas de *D. rerio* expostos ao metabissulfito de sódio. A) Ovo coagulado com 24 h de exposição em 44 mg/L; B) Embrião com má formação com 48 h de exposição em 66 mg/L; C) Larva sem equilíbrio com 72 h de exposição em 66 mg/L; D) Larva normal com 96 h (controle).

Ensaio com adultos

Dois biomarcadores foram mensurados para avaliar a toxicidade do MBS durante 96 h de exposição nos peixes adultos. Assim como observado nos camarões, as atividades da AChE mensurada na cabeça ($F = 1.882$; $p = 0.3001$) (Figura 23) e da GST mensurada no fígado ($F = 0.4941$; $p = 0.7401$) (Figura 24A), brânquia ($F = 0.7878$; $p = 0.0537$) (Figura 24B), músculo ($F = 1.792$; $p = 0.1565$) (Figura 24C) e cabeça ($F = 2.571$; $p = 0.0580$) (Figura 24D), não apresentaram diferenças significativas, com exceção da concentração 44 mg/L no ensaio da GST medida na cabeça.

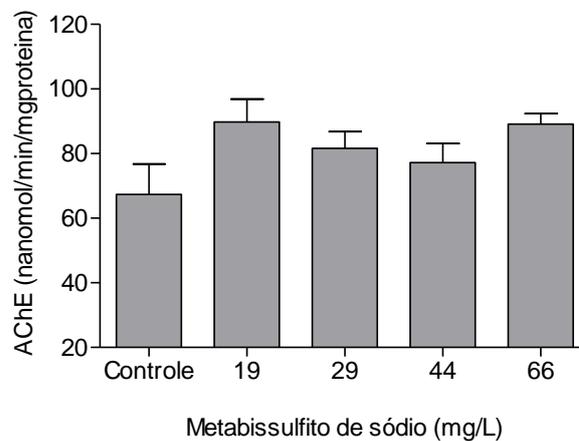


Figura 23 - Atividades da AChE (média \pm EPM) em cabeça de *Danio rerio*, expostos em metabissulfito de sódio por 96 horas. ANOVA unifatorial ($p < 0,05$).

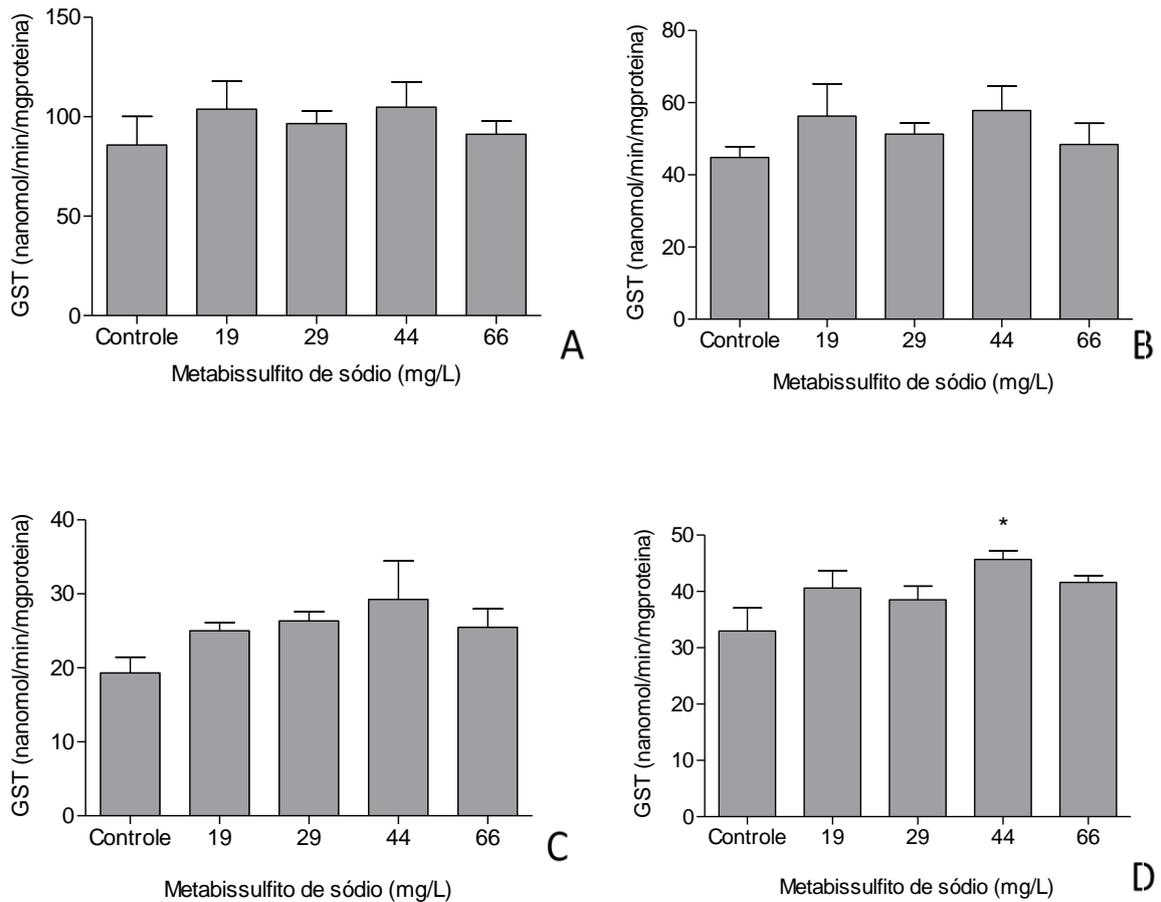


Figura 24 – GST (média \pm EPM) em fígado (A), brânquia (B), músculo (C) e cabeça (D) de *D. rerio*, expostos em metabissulfito de sódio por 96 horas. (* diferem estatisticamente do controle. ANOVA unifatorial, $p < 0,05$).

3.5. Discussão

Aproximadamente 0,1 - 0,2 % do oxigênio consumido por células aeróbicas é convertido em espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a respiração celular normal (FRIDOVICH, 2004), onde é sabido que essas EROs podem causar danos em macromoléculas incluindo proteínas, lipídeos e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Segundo Li; Jackson (2002) situações em que a pressão parcial do oxigênio é reduzida (hipóxia) são potencialmente perigosos para a maioria dos organismos multicelular aeróbio obrigatório. Contudo, quando acontece a reoxigenação dos tecidos é observado a geração de EROs, o que pode estar relacionado à restauração do potencial de energia. Fato esse também corroborado com Barry (1994) o qual afirma que não é a redução do oxigênio *per se* mas o retorno à normóxia que se constitui no fator mais crítico das oscilações de oxigênio dissolvido na água, influenciando diretamente o metabolismo oxidativo. Porém, Guzy *et al.*, (2005) afirmam que a própria condição de hipóxia ambiental também pode levar ao aumento das EROs, produzindo assim estresse oxidativo nos organismos e que segundo, Kuhn *et al.*, (1980) esse dano oxidativo ocorre possivelmente porque a atividade da enzima Triptofano Hidroxilase (TPH) é extremamente sensível ao oxigênio e é particularmente vulnerável a esse tipo de estresse.

É descrito na literatura que o MBS aumenta o influx de Na^+ para o canal de sódio, causando uma sobrecarga de Na^+ intracelular, o qual inibi a atividade de neurônios do hipocampo. Esse desequilíbrio celular pode desencadear uma cascata de eventos prejudiciais, podendo levar a morte celular (CHOI, 1995). Essa sobrecarga intracelular de Na^+ também pode reverter a membrana de Na^+ - Ca_2^+ e causar sobrecarga de Ca_2^+ , a qual também é uma via comum para a morte celular (MENG; NIE, 2005b). Ainda, de acordo com Ricard; Couraud, (1993), o MBS afeta os canais de sódio por mecanismos similares a hipóxia, isquemia e anóxia. Esses canais são responsáveis pelos danos induzidos por esses três eventos, o qual são conhecidos por causar despolarização da membrana, aumento extracelular de K^+ e intracelular de Na^+ e Ca_2^+ , aumentar a excitabilidade neural e, eventualmente, ocasionar lesões do sistema nervoso central.

Como já comentado, o metabissulfito de sódio retira o oxigênio dissolvido da água gerando assim, um ambiente hipóxico ou até mesmo anóxico o que pode ser uma condição temporária, já que no caso da aquicultura esse produto é descartado no corpo receptor, que

normalmente é um ambiente com fluxo de água contínua, o que pode gerar uma nova oxigenação do corpo hídrico.

Durante o ensaio com o camarão no estudo em questão, foi observada uma oscilação dos valores do oxigênio dissolvido nas diferentes concentrações de MBS em todos os ensaios realizados, mesmo naqueles com duração de 48 h, como por exemplo na concentração de 100 mg/L, onde nessa ocorreu um aumento do oxigênio de 0,36 para 3,12 mg/L em 24 h, ao final de 48 h este encontrou-se com 6,0 mg/L. Quando foi renovada a solução (48 h) este ficou com 0,2 mg/L, ao final das 72 h estava com 2,0 mg/L e no final do ensaio (96 h) 3,1 mg/L. Contudo, essas variações, assim como a própria exposição ao MBS, não afetaram as atividades enzimáticas CAT e GST e quanto a AChE mensurada na cabeça dos camarões, esta sofreu uma inibição quando os animais foram expostos por 48 h ao MBS nas maiores concentrações (30 e 50 mg/L). Já em relação aos ensaios com os peixes adultos *D. rerio*, esses foram realizados com aeração constante, contudo mesmo assim foi observado um comportamento de tentativa de fuga dos animais, onde alguns indivíduos morreram devido ao fato de saltarem dos recipientes-testes. Quanto às atividades enzimáticas (AChE e GST), assim como nos camarões, também não foram observadas diferenças significativas, a única exceção foi para a GST mensurada na cabeça dos animais a qual foi induzida na concentração de 44 mg/L de MBS.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que expliquem os efeitos do MBS nas atividades enzimáticas dos organismos estudados, porém há diversos estudos que explicam os efeitos da hipóxia/anóxia (condição a qual como visto, o MBS leva os ambientes aquáticos) nas atividades enzimáticas de diferentes organismos. Alguns desses trabalhos corroboram com um resultado da atual pesquisa sobre o aumento de enzimas envolvidas na defesa antioxidantes (observada pelo aumento da GST nos peixes, na presente pesquisa) quando os organismos estão sujeitos a hipóxia/anóxia/reoxigenação. Punnunzio; Storey (1998) por exemplo, afirmam que os animais que enfrentam flutuações como a disponibilidade de oxigênio, necessitam de estratégias que os permitam lidar com as consequências da reoxigenação, como por exemplo: manutenção das defesas antioxidantes constitutivas; grande tolerância às espécies reativas de oxigênio ou ainda mecanismos eficientes para sua remoção e aumento das defesas antioxidantes sob condições de anóxia.

Contudo, no trabalho de Gorokhova *et al.* (2010) os autores não observaram um aumento da GST quando os anfípodas *Monoporeia affinis* foram expostos à hipóxia (30 - 34% de saturação do oxigênio). Por outro lado, foi observado um aumento nos níveis de SOD, CAT e TBARS. O mesmo foi corroborado por Gorokhova *et al.* (2012), o qual novamente observaram um aumento nos níveis das enzimas antioxidantes, ORAC, SOD e CAT, quando esses mesmos organismos foram expostos à hipóxia de 16 -19% de saturação do oxigênio.

Em relação a AChE, Gorokhova *et al.* (2012) não observaram alteração dessa enzima quando os organismos foram expostos ao ambiente hipóxico, mas esta foi inibida por causa do sedimento contaminado com metais pesados, PCB e HPA. Os autores afirmam que esses resultados sugerem que em *M. affinis*, a atividade da AChE diminuiu com o aumento dos antioxidantes (avaliado por ORAC, SOD e CAT) e também do estresse oxidativo (avaliado por GSH / GSSG e TBAR). Fato esse não comprovado na presente pesquisa, pois foi observado uma diminuição da AChE, sem que houvesse alteração das enzimas CAT e GST nos camarões, e o contrário ocorreu nos peixes, onde houve um aumento da GST, mas a AChE não foi alterada. Outro fato, é que a GST nos peixes sofreu um aumento apenas na concentração de 44 mg/L, enquanto a de 66 mg/L permaneceu inalterada e isso apenas quando o tecido analisado foi a cabeça dos animais.

Já no trabalho realizado por Zenteno-Savín *et al.* (2006) estudando hipóxia ($1,0 \pm 0,05$ mg/L) por 24 horas em camarões *L. vannamei*, observaram que esta não induziu estresse oxidativo (avaliado na concentração de lactato, produção do radical superóxido, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante). No entanto, a reoxigenação súbita induziu estresse oxidativo no hepatopâncreas e músculo dos animais principalmente durante as primeiras horas de reoxigenação. Enquanto que Mariano (2006) estudando as respostas fisiológicas e bioquímicas do peixe *Hoplerythrinus unitaeniatus* à exposição aérea, demonstrou que os ajustes fisiológicos promovidos durante o estresse causado pela exposição aérea, levaram a um aumento no consumo de O₂, o que gerou uma maior produção de radicais livres, bem como de defesas antioxidantes.

Observando os efeitos da anóxia ambiental e da recuperação da anóxia sobre o balanço oxidativo no caranguejo *Chasmagnathus granulata*, Oliveira (2003) concluiu que os tecidos desses animais responderam de maneira diferenciada quando foram expostos a

períodos de anóxia e de reoxigenação. Nas brânquias, as alterações da CAT e GST pareceram responder diretamente às variações na concentração do oxigênio e que a reoxigenação também causaram alterações na capacidade antioxidante total. No hepatopâncreas, por outro lado, a atividade da GST dentre outras, pareceram não responder à concentração do oxigênio, já a reoxigenação causou alterações nas enzimas estudadas.

Como comentado, não há relatos na literatura sobre os efeitos diretos do MBS nas atividades enzimáticas dos organismos estudados (camarão e peixe) na presente pesquisa, contudo quando em contato com a água, o MBS é convertido a bissulfito (HSO_3) e sob a ação do oxigênio, as soluções de MBS são facilmente transformados em compostos sulfurados como, sulfitos (SO_3), sulfatos (SO_4) e tiosulfatos ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) (MADAN *et al.*, 2007). Diferentes compostos dessas classes têm sido definidos como precursores de dióxido de enxofre (SO_2). Este, uma vez dentro da célula, reage rapidamente com água originando compostos como HSO_3 e SO_3 (oxidantes de alta agressividade em nível celular) (RENNENBERG, HERSCHBACH, 1996) ou é oxidado a SO_4 (SEKIYA *et al.*, 1982). Em baixas concentrações de SO_2 , o SO_3 é imediatamente convertido para SO_4 . Altas concentrações de SO_2 por longo período resultam em uma maior conversão de SO_2 para SO_3 do que este último para SO_4 , levando nestes casos por exemplo, a danos foliares nas plantas (RAO; SINGH, 1988). Já nos microorganismos, o mecanismo de ação dos sais de MBS e correlatos relaciona-se com a inativação de sistemas enzimáticos, juntamente com o co-fator tiamina pirofosfato e a co-enzima NAD. Este efeito é capaz de exterminar estas espécies biológicas (YAGANZA *et al.*, 2004).

Sendo assim, estudos tem mostrado os efeitos dos subprodutos do MBS, como por exemplo no trabalho onde os autores avaliaram a influência de íons sulfato no ambiente na toxicidade e bioacumulação de selênio em algas *Chlamydomonas reinhardtii*, no qual Fournier *et al.* (2010) concluíram que a toxicidade do selênio deve ser vinculado a acumulação intracelular a qual é diretamente dependente de íons sulfato no ambiente, onde este pode competir com o selênio para os sítios de transporte. E, no estudo de Brix *et al.* (2010) avaliando a toxicidade de compostos presentes em um efluente de mineração para *Ceriodaphnia dubia*, afirmaram que o sulfato era uma dos três componentes tóxicos presente nesse efluente.

No presente estudo também foi mensurado a taxa do consumo de oxigênio nos camarões *P. serratus* após a exposição de 24 h ao MBS, mas esta também não apresentou alterações significativas em nenhuma das concentrações testadas. Isto pode ser decorrente do curto período de exposição (24 h) ou ainda, da tolerância da espécie a baixos níveis de oxigênio, fato este observado durante as coletas, onde esses organismos suportavam ficar até 40 minutos fora d'água, ou também devido a uma rápida recuperação do estresse após a exposição, como foi observado durante a realização dos ensaios. Segundo Zenteno-Savin *et al.* (2006) muitos crustáceos são conhecidos por serem tolerantes com o estado de hipóxia e Hochachka *et al.* (1993), muitas espécies de crustáceos decápodes são capazes de tolerar a exposição à hipóxia e anóxia com taxas de sobrevivência elevadas, mesmo com um tempo de exposição de horas ou dias nessas condições.

Sabe-se que a necessidade de oxigênio dissolvido na água depende da espécie. Para o camarão *L. vannamei* por exemplo, o ótimo é 5 mg/L (BOYD, 1989), contudo o ponto crítico para camarões peneídeos foi reportado entre 0,9 e 2,0 mg/L (VILLAREAL *et al.*, 1994), para tilápia *Oreochromis niloticus* o ideal para um bom desenvolvimento é acima de 3 mg/L, mas essas podem sobreviver em concentrações de 1,2 mg/L (AYROZA, 2009) e para *Daphnia* o ótimo é de 2 mg/L (CETESB, 1992). Porém, mesmo que alguns organismos consigam sobreviver a baixas concentrações de oxigênio na água, Costa *et al.* (2008) afirmam que essa variável é importante porque atua como regulador em processos metabólicos dos organismos, o que é corroborado por Boyd (1989) e Cyrino; Kubitz (1996) que relatam que os baixos níveis de oxigênio na água normalmente causam uma diminuição do consumo de alimento, do crescimento e da resistência, aumentando assim a incidência de doenças e consequentemente aumentando a taxa de mortalidade.

Outro fato discutido na literatura, são os fatores abióticos que mais afetam o consumo de oxigênio nos organismos aquáticos, os quais são a temperatura e salinidade (BRETT, 1987). Nos sistemas estuarinos essas variáveis podem ser alteradas drasticamente tanto em termos espaciais como temporais (ROWE, 2002). De acordo com Nunes *et al.* (2005) as fazendas de cultivos de camarões marinhos são normalmente construídas dentro desses sistemas, o que aumenta a preocupação com o descarte do MBS nessas áreas, pois além de serem áreas ecologicamente importantes, a região nordeste onde está a maior parte dessa atividade é caracteristicamente quente, podendo potencializar os efeitos deste produto.

De acordo com Cunha (2010) as fazendas do estado do Rio Grande do Norte não utilizam mais MBS, já que o camarão produzido não é mais exportado, sendo todo ele para consumo interno. Contudo, o MBS não é utilizado apenas no Brasil e sim em todo o mundo para a profilaxia da melanose (MAIA, 2004). Com isso a preocupação a cerca desse produto ainda é cabível, também por ser utilizado em outras indústrias.

O MBS é considerado um composto tóxico podendo causar irritação nos olhos, pele e aparelho respiratório, sendo também prejudicial se ingerido ou inalado pelo homem. Segundo Rencüzogullari *et al.* (2001b) pode induzir aberrações cromossômicas e mudanças nas cromátides irmãs em linfócitos humanos, o qual de acordo com Meng; Zhang (1990) é um efeito similar causado *in vivo* por SO₂ e derivados, como bissulfito de sódio e sulfito. Asero (2002) afirma que os conservantes à base de sais de enxofre, como o composto em estudo, já foram causadores de rinite persistente e urticária crônica. Devido a isso, a utilização desse produto deve ser com parcimônia e estar de acordo com o Conselho Nacional de Saúde, o qual recomenda o uso em uma concentração de até 100 ppm para alimentos crus e segundo a Organização Mundial da Saúde, estabelece como aceitável uma ingestão diária de compostos sulfetados na ordem de 0,7 mg/kg expresso como SO₂ (ELMAS *et al.*, 2005).

Sobre a ecotoxicidade desse produto, poucos dados são encontrados na literatura, de forma que não se sabe a quantidade desse produto que pode ser lançado no meio ambiente sem causar impactos negativos, além de que um número limitado de organismos aquáticos tem sido expostos a esse produto para a avaliação ecotoxicológica.

Apesar de no presente trabalho não ter sido encontrado efeitos graves do MBS nos ensaios do consumo de oxigênio dos camarões e das atividades enzimáticas dos peixes e camarões, o mesmo não aconteceu com os ensaios de toxicidade aguda. Estes avaliam em geral os efeitos severos e rápidos, devido à exposição dos organismos a agentes possivelmente tóxicos em um curto espaço de tempo. Para esse ensaio foram utilizados diferentes organismos: microalga, cladóceros, camarão e ovos de peixe, onde *P. subcapitata* apresentou uma EC₅₀ (72 h) de 24,29 mg/L, sendo essas ainda inibidas significativamente a partir da concentração de 44 mg/L, *D. magna* apresentou uma CL₅₀ (48 h) de 34,90 mg/L, *P. serratus* uma CL₅₀ (96 h) de 69,65 mg/L. Já para os ovos de *D. rerio*, a CL₅₀ foi calculada em todos os dias de exposição (24, 48, 72 e 96 h) dos ovos ao MBS, obtendo-se uma CL₅₀ de

90,30; 74,03; 64,50 e 65,84 mg/L, respectivamente, onde se observa uma tendência a um aumento da toxicidade com o passar dos dias até se estabilizar.

Já no ensaio de toxicidade crônica com ovos dos peixes, foi observada uma mortalidade de 100% dos ovos expostos às maiores concentrações (150 e 225 mg/L) no primeiro dia de exposição, e um fato interessante é que os ovos controles que estavam na mesma placa também foram destruídos. Uma das hipóteses para isto é que como as placas ficavam fechadas, a produção do SO₂ devido ao contato do MBS com a água, possa ter contaminado os controles, ou mesmo ocorrido uma produção de microgotículas pela alta concentração e estas terem se depositados nos poços controle. Segundo a ficha de informações de segurança de produto químico da AGA/SA (2004), esta informa que o SO₂ por ser um produto na forma de gás, não oferece riscos aos seres vivos tanto aquáticos quanto terrestres. Porém, Surówka *et al.* (2007) afirmam que o SO₂ é um gás tóxico podendo facilmente penetrar nos cloroplastos das plantas afetando o crescimento e desenvolvimento destas.

Quanto a eclosão dos ovos, esta aconteceu no terceiro dia nas concentrações 29, 44 e 66 mg/L e ainda no controle, enquanto que na concentração de 100 mg/L, esta só ocorreu no quarto dia de exposição. Nas menores concentrações (29 e 44 mg/L) apesar de não ter havido mortalidade das larvas, estas apresentaram alguns defeitos como: ausência do saco vitelínico, má formação da cauda, ausência de otólito, larvas sem equilíbrio, dentre outros.

Os efeitos mais descritos na literatura da toxicidade em larvas de *D. rerio* para diferentes tipos de contaminantes, o qual alguns deles também foram observados no presente estudo são: curvatura da cauda, distúrbios no equilíbrio, edemas cranial, pericardial e abdominal, hemorragias, anormalidades na boca e deformações na espinha e cabeça, pigmentação anormal de olhos e corpo, tendo sido descritos em diferentes tipos de estudos (HENRY *et al.*, 1997; ELONEN *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 2000; GRISOLIA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Alguns estudos tem demonstrado que embriões e larvas de paulistinha podem lidar com baixas concentrações de oxigênio dissolvido e que nos estágios iniciais essa tolerância é mais alta (PADILLA; ROTH, 2001; BRAUNBECK *et al.*, 2005). Contudo, os resultados da presente pesquisa mostraram que mesmo quando o MBS não causou efeitos severos, como a

mortalidade, este foi capaz de causar danos nos quais não vão interferir no desenvolvimento normal dos organismos, pelo menos no organismo testado, o que é corroborado por Elonen *et al.* (1998) que afirmam que os efeitos nocivos aos organismos podem ser percebidos em algumas atividades vitais, como a natação e a alimentação. Como se sabe, uma das causas da toxicidade desse produto está relacionada à oxigenação da água. Todavia, não é possível afirmar que a causa dos danos observados no ensaio crônico com peixes da presente pesquisa, seja simplesmente pela anóxia e/ou hipóxia, já que essa variável não foi mensurada.

Segundo Hollert *et al.* (2003) embriões de *D. rerio* sobrevivem a níveis de oxigênio de 0,5 mg/mL. Contudo, Barrionuevo *et al.* (2010) reportam que embriões de *D. rerio* em estágios muito iniciais não responderam de forma eficaz à hipóxia aguda ambiente, e que só depois da fase correspondente à idade de 30 dias, eles foram capazes de responder à hipóxia aguda através de mecanismos fisiológicos eficazes envolvendo metabolismo aeróbio e anaeróbio e Braunbeck; Lammer (2006) não observaram qualquer tipo de má formação ou até mesmo retardo no crescimento em embriões da mesma espécie expostos à hipóxia.

Assim, com base nestes estudos, pode-se esperar que os efeitos observados no ensaio do desenvolvimento embriolarval do presente trabalho seja pelo próprio mecanismo de ação do MBS quando em contato com os organismos e não pelo baixo nível de oxigênio, o que também é corroborado com Aragão *et al.* (2008) o qual afirmam não excluir a participação do próprio MBS ou outro fator na letalidade observada, e não apenas a baixa concentração do oxigênio dissolvido, uma vez que estes observaram mortalidade nos organismos testes mesmo nas concentrações onde o nível de oxigênio estava no limite aceitável para a espécie estudada.

O ambiente aquático é extremamente dinâmico fazendo com que os animais que ali vivem estejam sujeitos a alterações ambientais diferente dos enfrentados pelos animais terrestres, como as mudanças rápidas na concentração de oxigênio dissolvido, pH, salinidade e etc, o que pode ocasionar estresse e reduzir a habilidade em manter a homeostase (OBA *et al.*, 2009). Junto a isso, existe uma gama de contaminantes sendo despejados nesses ambientes, que afetam de uma forma ou de outra a vida desses organismos, como o MBS, o qual é muitas vezes descartado nos corpos hídricos sem tratamento, afetando em um primeiro momento o meio ambiente pela queda nos níveis de oxigênio dissolvido dessas águas. Esses, podem afetar gravemente os ecossistemas costeiros bentônicos, resultando em mudanças de

longo prazo nas comunidades bentônicas e tais efeitos depende da gravidade, frequência e duração da depleção de oxigênio (RABALAIS *et al.*, 2002), o que pode significar uma perda da função e serviços do ecossistema (LEVIN *et al.*, 2009).

No presente trabalho poucos efeitos foram encontrados quando se utilizou os biomarcadores enzimáticos na avaliação da exposição tanto de camarão como de peixes, assim como, não foram encontrados resultados significativos da taxa do consumo de oxigênio dos camarões expostos ao MBS, resultados esses que podem ter sido decorrente do curto tempo de exposição. Contudo, Halliwell; Gutteridge (1999) afirmam que a reintrodução do oxigênio causa um aumento na produção das EROs, causando efeitos nocivos às células, como oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, provocando dessa maneira alterações no funcionamento normal de células e tecidos. Desta maneira, o descarte do MBS no meio aquático é agravado, pois este produto, além de ser assimilado pelos organismos podendo causar danos, pode impactar o meio ambiente pela retirada do oxigênio dissolvido, matando os organismos por asfixia e depois pela reoxigenação natural do local onde foi descartado, podendo causar impactos negativos mesmo aos organismos mais resistentes, devido aos diversos efeitos do ciclo de anóxia-hipóxia-reoxigenação.

3.6. Conclusões

A avaliação da toxicidade aguda do MBS mostrou que as microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata*) apresentaram uma EC_{50} (72 h) de 24,29 mg/L, os cladóceros (*Daphnia magna*) uma CL_{50} (48 h) de 34,90 mg/L e os camarões (*Palaemon serratus*) uma CL_{50} (96 h) de 69,65 mg/L.

A exposição dos camarões *P. serratus* às concentrações sub-letais do MBS, não causou mudanças significativas na taxa do consumo do oxigênio.

Atividades enzimáticas como Catalase, Glutathione-S-Transferase e Acetilcolinesterase em *P. serratus*, não apresentaram alterações após a exposição ao MBS, a exceção foi a inibição da AChE mensurada na cabeça desses animais no maior tempo de exposição (48 h) e também nas maiores concentrações.

Para os peixes *Danio rerio*, o MBS causou diferentes efeitos no desenvolvimento embriolarval como ausência do saco vitelino, má formação da cauda, larvas sem equilíbrio, dentre outros. Além disso, foi observado mortalidade tanto de embriões como de larvas e ainda um retardo na eclosão dos ovos, nas diferentes concentrações testadas.

Assim como nos camarões, a análise das atividades enzimáticas (Glutathione-S-Transferase e Acetilcolinesterase) nos peixes, não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o controle em nenhuma dos tecidos analisado, a exceção foi a GST mensurada na cabeça dos animais, onde essa foi induzida na concentração de 44 mg/L.

4. Considerações finais

Diante do exposto nos dois capítulos precedentes, fica evidente a importância dos estudos dos possíveis impactos gerados pela atividade da carcinicultura, seja no uso de diversos produtos químicos para melhorar a produção nas suas diferentes etapas, seja na geração de efluentes, contendo tanto os resíduos dos produtos utilizados no manejo dos viveiros como a própria comunidade fitoplanctônica, muitas vezes constituída na sua maioria por cianobactérias.

Caso não haja um manejo adequado por parte dos carcinicultores, as cianobactérias podem proliferar, fato este observado nas análises quantitativas das três fazendas estudadas. Estes organismos podem ocasionar problemas na própria produção, já que não servem de alimento para os camarões e deteriorar a qualidade das águas dos viveiros. Entretanto, a maior preocupação está no fato de algumas espécies produzirem toxinas comprovadamente tóxicas para o homem e para os animais aquáticos. Dessa forma quando as águas desses viveiros forem descartadas, estará entrando nas águas do corpo receptor, sendo essas muitas vezes utilizadas por pescadores artesanais, uma carga elevada de cianobactérias ou até mesmo de toxinas.

Em relação ao aditivo químico metabissulfito de sódio, este é utilizado durante a despesca e descartado normalmente no corpo receptor, sem que haja nenhum tratamento. A primeira consequência disto é a retirada imediata do oxigênio dissolvido da água, que só por este motivo já pode ser considerado nocivo. Contudo, os resultados do presente estudo e de outros relatos da literatura, têm demonstrado que este aditivo é tóxico, seja no nível de toxicidade aguda ou crônica, como no ensaio do desenvolvimento embrionário com peixes e de mutagenicidade descritos na literatura.

A legislação CONAMA 357 de 2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e ainda, as condições e padrões de lançamento de efluentes, não trás valores de cianobactérias para as águas salobras e salinas e apenas para as águas doces. Contudo, dependendo da floração, as cianobactérias podem causar cor, odor e turbidez, o que não é aceito nessa resolução. Já para os valores de oxigênio dissolvido, este são divergem para as diferentes classes de águas, onde o valor mais baixo aceito para esse parâmetro é acima de 2,0 mg/L de OD. Porém, nos ensaios em laboratórios

foram observados que o MBS tem a capacidade de reduzir rapidamente a concentração do OD, deixando praticamente a níveis zero de oxigênio.

Sendo assim, cabe as carcinicultores cumprir a legislação, buscando medidas para evitar os possíveis danos gerados pela atividade, como evitar o proliferamento das cianobactérias através do manejo correto de troca de água dos viveiros e do uso de fertilizantes, e em relação à solução de MBS, através da adição de hidróxido de cálcio mais aeração da solução é possível reduzir sua toxicidade, já que com esse procedimento os níveis de oxigênio dissolvido se elevarão.

Já em relação aos órgãos ambientais competentes, sejam federais, estaduais ou municipais, cabe fiscalizar essas atividades para o cumprimento da legislação, pois essa afirma que “Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedeçam as condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução” (CONAMA 357, 2005). Só assim, com o completo cumprimento da lei, poderemos manter uma atividade economicamente importante principalmente para a região nordeste, assim como a preservação dos ecossistemas que são atingidos por essa atividade.

5. Referências bibliográficas

- ADAMS, D. G.; DUGGAN, P. S. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. **New Phytol.**, Cambridge, v. 144, n. 1, p. 3-33, 1999.
- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods enzymol.**, New York, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGA S/A - FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico) - Dióxido de Enxofre, janeiro, 2004.
- AGAWIN, N. S. R.; DUARTE, C. M.; AGUSTÍ, S. Growth and abundance of *Synechococcus* sp. in a Mediterranean Bay: seasonality and relationship with temperature. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, Amelinghausen, v. 170, n. 45-53, 1998.
- ALEXOVA, R.; FUJII, M.; BIRCH, D.; CHENG, J.; WAITE, T.D.; FERRARI, B. C.; NEILAN, B. A. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. **Environ. Microbiol.**, Inglaterra, v. 13, n. 4, p. 1064-1077, 2011.
- ALONSO-RODRÍGUEZ, R.; PAÉZ-OSUNA, F.; Nutrients phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. **Aquac.**, Amsterdam, v. 219, p. 317-336, 2003.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 3 – Oscillatoriales. **Arch. Hydrobiol. Suppl.**, Stuttgart, v. 80, n. 1-4, p. 327-472, 1988.
- ANCIUTTI, M.; COCHÔA, A. Identificação de cianobactérias tóxicas em um corpo hídrico no interior de Tangará, SC. **ACBS**, Joaçaba, v. 1, n. 1, p. 29-36, 2010.
- ANH, P. T., KROEZE, C., BUSH, S. R.; MOL, A. P. J. Water pollution by intensive brackish shrimp farming in south-east Vietnam: Causes and options for control. **Agric. Wat. Man.**, Amsterdam, v. 97, p. 872-882, 2010.
- AÑÍBARRO, B.; CABALLERO, T.; GARCÍA-ARA, C.; DÍAZ-PENA, J. M.; OJEDA, J. A. Asthma with sulfite intolerance in children: ablocking study with cyanocobalamin. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, Saint Louis, v. 90, n. 1, p. 103-109, 1992.
- APELDOORN, M. E. van, EGMOND, H. P. van, SPEIJERS, G. J. A.; BAKKER, G.J.I. Toxins of cyanobacteria. **Mol. Nutr. Food Res.**, Weinheim, v. 51, p. 7-60, 2007.
- ARAGÃO, J. S.; CASTRO, C. B. ; COSTA-LOTUFO, L. V. Toxicidade do metabissulfito de sódio em *Mysidopsis juniae*. **Arq. Ciên. Mar**, Fortaleza, v. 41, p. 24-29, 2008.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: Bertoletti, E.; Zagatto, P. A. editores. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Rima, São Carlos, cap. 6, p. 117-147, 2006.

ASERO, R. Multiple intolerance to food additives. **J. Allergy clin. immunol.**, Saint Louis, v.110 (3), p. 531-2, 2002.

ASTM. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Report E-790-80. American Society for the Testing and Materials. Philadelphia. 1980.

AVILEZ, I. M.; HORI, T. S. F.; ALMEIDA, L. C.; HACKBARTH, A.; BASTOS, N. J. C.; BASTOS, V. L. F. C.; Moraes, G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comp. Biochem. Physiol., Part C**, Oxford, v. 148, p. 136-142, 2008.

AYROZA, L. M. da S. **Criação de tilápia-do-nylo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na usina hidrelétrica de chavantes, rio paranapanema, SP/PR**. Dissertação (Tese de Doutorado em Aquicultura). Centro de Aquicultura da Unesp, 2009.

AZEVEDO, S. M. F. O. Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública. **Med on line**, v. 1, n. 3, jul/agos/set. 1998. Disponível em: <http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm>. Acesso em 27 de junho de 2011.

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**, Limerick, v. 181–182, p. 441–446, 2002.

BADARÓ-PEDROSO, C.; REYNIER, M. V.; PRÓSPERI, V. A. Testes de toxicidade aguda com misidáceos – ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile* (Crustácea: Mysidacea). In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil**. Artes gráficas e indústria LTDA, São Paulo, cap. XI, p. 123 – 140, 2002.

BAIRD, D. J.; SOARES, A. M. V. M.; GIRLING, A.; BARBER, I.; BRADLEY, M.C.; CALOW, P. The long-term maintenance of *Daphnia magna* for use in ecotoxicity tests: Problems and prospects. In: Lokke, H., Tyle, H., Bro-Rasmussen (Eds). Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology, 17- 19 October 1988, Lyngby, Denmark, p. 144-148, 1989.

- BÁLINT, T.; SZEGLETES, T.; SZEGLETES, ZS.; HALASY, K.; NEMCSÓK, J. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 33, n. 3/4, p. 279-295, 1995.
- BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 400-406, 2006.
- BARBIERE JUNIOR, R. C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarão marinho: engorda.** Aprenda fácil ed., Viçosa-MG, v.2, 372 p., 2002.
- BARRIONUEVO, W. R., FERNANDES, M. N., ROCHA, O. Aerobic and anaerobic metabolism of the zebrafish, *Danio rerio*, reared under normoxic and hypoxic conditions and exposed to acute hypoxia during development. **Braz. J. Biol.**, São Carlos, v.70, p. 425–434, 2010.
- BARRY, H. Free radical and antioxidants: a personal view. **Nutr. Rev.**, New York, v. 52, p. 253-265, 1994.
- BEATTIE, K. A.; RESSLER, J.; WIEGAND, C.; KRAUSE, E.; CODD, G. A.; STEINBERG, C. E. W.; PFLUGMACHER, S. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 62, p. 219-226, 2003.
- BERGHEIM, A., BRINKER, A. Effluent treatment for flow through systems and european environmental regulations. **Aquac. Engin.**, England, v.27, p. 61–77, 2003.
- BERTOLETTI, E. Determinação da Ecotoxicidade Crônica para *Danio rerio*. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, Santa Catarina, v. 4, n. 1-3, 2009.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições.** Rima, São Carlos, 2ª ed., 502 p., 2006.
- BLAISE, C.; FÉRARD, J. F. Eds. (2005). Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Toxicity Test Methods, Springer. *Vol. 1*, 137-179.
- BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture.** Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn. 1ª ed., 482 p., 1990.
- BOYD, C. E. Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming. Fisheries and Allied Aquaculture Department: Series n. 2. Alabama Agricultural Experiment Station, Alabama, 482p., 1989.

- BOYD, C. E.; GAUTIER, D. Effluent composition and water quality standards. **Global aquaculture advocate**, USA, v. 3, n. 5, p. 61-66, 2000.
- BRANDÃO, E. T. P. **Cianobactérias e saúde pública no Brasil**. 76f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) - Departamento de Biologia Animal da Universidade de Lisboa, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAUNBECK, T.; BÖTTCHER, M.; HOLLERT, H., KOSMEHL, T., LAMMER, E., LEIST, E., RUDOLF, M., SEITZ, N. Towards an alternative for the acute fish LC₅₀ test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multispecies an update. **Altex**, Baltimore, v. 22, n. 2, p. 87-102, 2005.
- BRAUNBECK, T., LAMMER, E. Fish embryo toxicity assays. German Federal Environment Agency, pp. 298, 2006.
- BRETT, J. Environmental factors affecting growth. In: Hoare, W. H., Randall, D. J., Brett, S. R. (eds.). **Fish Physiology**, Academic Press, New York, vol. 8, p. 252– 259, 1987.
- BRIX, K. V.; GERDES, R.; GROSELL, M. Thiocyanate, calcium and sulfate as causes of toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in a hard rock mining effluent. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 73, p. 1646–1652, 2010.
- BUTLER, N.; CARLISLE, J. C.; LINVILLE, R.; WASHBURN, B. Microcystins A Brief Overview of their Toxicity and Effects, with special reference to fish, wildlife, and livestock. Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA Ecotoxicology), California, 2009.
- CALIJURI, M.C.; ALVES, M. S. A; SANTOS, A. A. **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**. São Carlos, Ed. Rima, 109p, 2006.
- CALLAGHAN, A.; FISHER, T. C.; GROSSO, A.; HOLLOWAY, G. J.; CRANE, M. Effect of temperature and pirimiphos methyl on biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 52, p. 128-133, 2002.
- CAMPBELL, L.; VAULOT, D. Photosynthetic picoplankton community structure in the subtropical North Pacific Ocean near Hawaii (station ALOHA). **Deep Sea Res Part I. Oceanogr Res Pap.**, Oxford, v. 40, n. 10, p. 2043-2060, 1993.
- CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. **J. Appl.**

Microbiol., Oxford, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W.W.; LI, R. H. Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. **Saline Syst.**, Baltimore v. 19, n. 2, p. 5, 2006.

CARVALHO, E. G.; SOTERO-SANTOS, R. B.; MARTINEZ, C. B. R.; FREITAS, E. C.; FENERICH-VERANI, N.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M. J.; ROCHA, O. Kidney Histology of Mice After Seven Days Oral Intake of Cyanobacterial Extract. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, Santa Catarina, v. 2, n. 1, p. 39-43, 2007.

CARVALHO, I. M. DA C. M. M.; CAVALCANTE, A. A. M.; DANTAS, A. F.; PEREIRA, D. L. A.; ROCHA, F. C. C.; OLIVEIRA, F. M.; DA SILVA, J. Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in Piauí, Brazil. **Chemosphere**, Oxford, v. 82, p. 1056–1061, 2011.

CETESB – **COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL**. Água do mar – Teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* Silva, 1979 (Crustacea-Mysidacea). Norma técnica L5.251. São Paulo, CETESB p.19, 1992.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A. A.; MOHANDASS, S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comp. Biochem. Physiol., Part C**, Oxford, v. 140, p. 422-426, 2005.

CHEN, J.; XIE, P. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. **Toxicol.**, Elmsford, v. 45, p. 615–625, 2005.

CHENG, S.H.; WING, K. W. A.; HUNG, S. C.; SHIU, S. W. U. R. Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. **Environ Toxicol. Chem.**, New York, v. 19, p. 3024–3031, 2000.

CHOI, D. W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. **Trends Neurosci.** Amsterdam, v.18, p. 58–60, 1995.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacterial in water: A guide for their public health consequences, monitoring and management**. E & FN spon, London, 416p., 1999.

CLAIRBORNE, A. Catalase activity. In: Greenwald, R. A. (Ed.), **CRC Handbook of Methods in Oxygen Radical Research**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 283–284, 1985.

CODD, G.; AZEVEDO, S.; BGCHIS; BURCH, M.; CARMICHAEL, W.; HARDING, W.; KAYA, K.; UTLILEN, H. Cyanonet: A global Network for cyanobacterial bloom and toxin

risk management. UNESCO, 76p., 2005.

COELHO, S.; OLIVEIRA, R.; PEREIRA, S.; MUSSO, C.; DOMINGUES, I.; BHUJEL, R. C.; SOARES, A. M. V. M.; NOGUEIRA, A. J. A. Assessing lethal and sub-lethal effects of trichlorfon on different trophic levels. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 103, p. 191–198, 2011.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução nº 001 de 23 de janeiro de 1986.

CONAMA, Brasil. **Conselho Nacional do Meio Ambiente** - Resolução CONAMA n. 312, 10 de outubro de 2002.

CONAMA Brasil. **Conselho Nacional do Meio Ambiente** - Resolução CONAMA n. 357, 17 de março de 2005.

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

COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; SILVA, G. C.; VIEIRA, R. H. S. F.; SAKER-SAMPAIO, S. Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 458-462, 2008.

CRUZ, R. R. M. **O uso do metabissulfito de sódio na criação de camarão marinho em cativeiro e seu perigo para o trabalhador e o meio ambiente**. Dissertação (Monografia de especialização). Universidade de Fortaleza, 2004.

CUNHA, P. E. V. **Aplicação da metodologia para estimativa do fator de emissão-nutrientes e metais-pesados para avaliar a contribuição dos efluentes de carcinicultura no estuário do rio potengi, Natal (RN)**. 232f. Dissertação (Doutorado em Hidraulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos-SP, 2010.

CUPP, E. E. Marine plankton diatoms of the west of North America. **Bul. Scripps Inst. Ocean. Univers.**, California, v. 5, p.1-328,1943.

CYRINO, J. E. P; KUBITZA, F. **Piscicultura**. Coleção agroindústria, n.8, Sebrae ed., Cuiabá-MT, 86 p., 1996.

DAO, T. S.; DO-HONG, L. C.; WIEGAND, C. Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. **Toxicon**, Elmsford, v. 55, p. 1244-1254, 2010.

- DAWSON, R. M. The toxicology of microcystins. **Toxicon.**, Elmsford, v.36, p. 953-962, 1998.
- DEWES, L. J.; SANDRINI, J. Z. MONSERRAT, J. M; YUNES, J.S. Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 65, p. 201–208, 2006.
- DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins - occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. **Mol. Nutr. Food Res.**, Weinheim, v. 50, n. 1 p. 7-17, 2006.
- DREBES, G. **Marines Phytoplankton** – Eine Auswahl der Helgoländer Planktonalgen (Diatomeen, Peridineen), 151 Abbildungen. Georg Thieme Verlag Stuttgart, Stuttgart.186p. 1974.
- DOMINGUES, I.; OLIVEIRA, R.; LOURENÇO, J.; GRISOLIA, C. K.; MENDO, S.; SOARES, A. M. V. M. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comp. Biochem. Physiol., Part C**, Oxford, v.152, p. 338–345, 2010.
- EDLER, L. Recommendations on methods for Marine Biological Studies in the Baltic Sea: Phytoplankton and Chlorophyll. **The Baltic Mar. Biol.**, Uppsala, n.5, p.1-38, 1979.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDREAS, V. J.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, New York, p. 88-95, 1961.
- ELMAS, O.; ASLAN, M.; ÇAGLAR, S.; DERIN, N.; AGAR, A.; ALICIGÜZEL, Y.; YARGIÇOĞLU, P. The prooxidant effect of sodium metabisulfite in rat liver and kidney. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Duluth, v. 42, p. 77–82, 2005.
- ELONEN, G. E.; SPEHAR, R. L.; HOLCOMBE, G. W.; JOHNSON, R. D.; FERNANDEZ, J. D.; ERICKSON, R. J.; TIETGE, J. E.; COOK, P. M. Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to seven freshwater fish species during early life-stage development. **Environ. Toxicol. Chem.**, New York, v.17, n. 3, p. 472-483, 1998.
- EPA - Environmental Protection Agency. Profile of the Textile Industry. Washington, September, 1997.
- ENGSTRÖM-ÖST, J.; LEHTINIEMIA, M.; GREEND, S.; KOZLOWSKY-SUZUKID, B.; VIITASALO, M. Does cyanobacterial toxin accumulate in mysid shrimps and fish via copepods? **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, Amsterdam, v. 276, p. 95– 107, 2002.

FAO, 2007. In: NUNES, A. J. P., SÁ, M. V. C. Na busca por um máximo crescimento e eficiência em rações para o cultivo do camarão *Litopenaeus Vannamei*. **Rev. ABCC**, Natal, ano XII, junho, 2010.

FEITOSA, J. B. **Avaliação da toxicidade de *synechococcus* sp. obtida de viveiro de cultivo de camarão**. 36 f. Monografia (monografia em Engenharia de Pesca) - Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

FERRÃO-FILHO, A. da S.; AZEVEDOS, M. F. O. Effects of unicellular and colonial forms of toxic *Microcystis aeruginosa* from laboratory cultures and natural populations on tropical cladocerans. **Aquat. Ecol.**, Germany, v. 37, p. 23-35, 2003.

FERRÃO-FILHO, A. da S.; KOZLOWSKY-SUZUKI; AZEVEDO, S. M. F. O. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. **Aquat. Toxicol.** Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 201-208, 2002.

FERRÃO-FILHO, A. da S.; SOARES, M. C.; ROCHA, M. I. A.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. A. Florações de Cianobactérias tóxicas no Reservatório do Funil: dinâmica sazonal e consequências para o zooplankton. **Oecol. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 13, v. 2, p. 346-365, 2009.

FERRARIO, M. E.; SAR, E. A.; SALA, S. Diatomeas potencialmente toxigênicas del Cono Sur Americano. In: Sar, E. A.; Ferrario, M. E.; Reguera, B. (eds.). Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano. **Inst. Español Ocean.**, Madrid. p. 169-194, 2002.

FRASCO, M. F.; FOURNIER, D.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Cholinesterase from the common prawn (*Palaemon serratus*) eyes: Catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds. **Aquat. Toxicol.** Amsterdam, v. 77, p. 412-421, 2006.

FRASCO, M. F.; FOURNIER, D.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Does mercury interact with the inhibitory effect of dichlorvos on *Palaemon serratus* (Crustacea: Decapoda) cholinesterase? **Sci. Total. Environ.**, Amsterdam, v. 404, p.88-93, 2008.

FREITAS, U.; NIENCHESKI, L. F. H., ZARZUR, S., MANZOLLI, R. P.; VIEIRA, J. P. P.; ROSA, L. C. Influência de um cultivo de camarão sobre o metabolismo bêntico e a qualidade da água. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.12, n.3, p.293-301, 2008.

FONSECA, R. S. **Dinâmica da Comunidade Fitoplanctônica em um Viveiro de Engorda de Camarão Marinho (*Litopenaeus Vannamei*) no Estado do Ceará**. 106f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, 2006.

FOURNIER, E.; ADAM-GUILLERMINA, C.; POTIN-GAUTIER, M.; PANNIER, F. Selenate bioaccumulation and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*: Influence of ambient sulphate ion concentration. **Aquat.Toxicol.**, Amsterdam, v. 97, p. 51–57, 2010.

FRIDOVICH, I. Mitochondria: are they the seat of senescence? **Aging Cell** v. 3, p. 13–16, 2004.

FUNARI, E.; TESTAI, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. **Crit. Rev. Toxicol.**, Boca Raton, v. 38, n. 2, p. 97 – 125, 2008.

GOROKHOVA, E.; LÖF, M.; HALLDÓRSSON, H. P.; TJÄRNLUND, U.; LINDSTRÖM, M.;ELFWING, T.; SUNDELIN, B. Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 99, p. 263–274, 2010.

GOROKHOVAA, E.; LÖFA, M.; REUTGARDA, M.; LINDSTRÖMB, M.; SUNDELIN, B. Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia. *Aquat. Toxicol.* doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.022 (2012). *In press.*

GRISOLIA, C. K.; OLIVEIRA, R.; DOMINGUES, I.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONERAT, R. G.; SOARES, A. M. V. M. Genotoxic evaluation of different endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. **Mut. Res.**, Amsterdam, v. 672, p.119–123, 2009.

GT-Carcinicultura - Diagnóstico sobre os impactos da carcinicultura (cultura de crustáceos em viveiros) no meio ambiente, nas regiões Norte e Nordeste. Jun 2005. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama/processo> Acesso em 26 de janeiro de 2006.

GUILHERMINO, L. **Modelos e sistemas de avaliação da toxicidade de substâncias químicas**. 197p. Dissertação (Tese de Doutorado em Ecologia) Universidade de Coimbra. 1996.

GUILHERMINO, L.; LOPES, M. C.; CARVALHO, A. P.; SOARES, A. M. V. M. Acetylcholinesterase activity in juvenile *Daphnia magna* Strauss. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 57, p. 979-985, 1996.

GUILLARD, R. R. L. Culture Methods. In: HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CAMBELLA, A. D. (eds.). **Manual on Harmful Marine Microalgae**. IOC Manual and Guides 33, UNESCO, p. 45-62, 1995.

- GUO, L.; LI, Z. Effects of nitrogen and phosphorus from fish cage-culture on the communities of a shallow lake in middle Yangtze River basin of China. **Aquac.**, Amsterdam, v. 226, p. 201–212, 2003.
- HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferase. **Methods in enzymology**. Academic, New York, p. 398-405, 1981.
- HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CAMBELLA, A. D. (eds.). **Manual on Harmful Marine Microalgae**. IOC Manual and Guides 33, UNESCO, 551p., 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. M. **Free radical in biology and medicine**. 3th ed. Oxford University Press Inc, New York, 899p, 1999.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, Iowa City, v. 12, n. 4, p. 471, 1978.
- HANSEN, G.; TURQUET, J.; QUOD, J. P.; HAGE, L. T.; LUGOMELA, C.; KYEWALYANGA, M.; HURBUNGS, M.; WAWIYE, P.; OGONGO, B.; TUNJE, S.; RAKTOARINJANAHARY, H. Potentially harmful microalgae of the western Indian ocean. **IOC Manuals and Guides**, UNESCO, n. 41, 105p., 2001.
- HAZANATO, T.; YASUNO, M.. Evaluation of *Microcystis* as food for zooplankton in an eutrophic lake. **Hydrobiol.**, The Hague, Holanda, v. 144, p. 251-259, 1987.
- HERMES-LIMA, M.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comp. Biochem. Physiol. B**, Oxford, v. 120, p. 437–448, 1998.
- HERMES-LIMA, M., ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comp. Biochem. Physiol. C**, Oxford, v.133, p. 537–556, 2002.
- HERNANDÉZ, J. N.; NUNES, A. J. P. Biossegurança de camarão marinho. In: Qualidade de água e fatores ambientais. **Rev. ABCC**, Natal, p. 53, n. 2, ano 3, set, 2001.
- HENRY, T. R.; SPITSBERGEN, J. M.; HORNUNG, M. W.; ABNET, C. C.; PETERSON, R. E. Early Life Stage Toxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-dioxin in Zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, San Diego, v.142, p. 56-68, 1997.
- HIETALA, J.; REINIKAINEN, M.; WALLS, M. Variation in life history responses of *Daphnia* to toxic *Microcystis aeruginosa*. **J. Plankton. Res.**, London, v.17, p. 2307-2318, 1995.

- HISEM, D.; HROUZEK, P.; TOMEK, P.; TOMSÍCKOVÁ, J.; ZAPOMELOVÁ, E.; SKÁCELOVÁ, K.; LUKESOVÁ, A.; KOPECKÝ, J. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. **Toxicol.**, Elmsford, n. 57, p. 76–83, 2011.
- HOCHACHKA, P. W.; LUTZ, P. L.; SICK, T.; ROSENTHAL, M. Surviving **Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 592, 1993.
- HOEK, C. V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge university press, New York, 623p., 1995.
- HOFFMAM, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JUNIOR, G. A.; CAIRNS JUNIOR, J. **Handbook of Ecotoxicology**, Lewis Publishers, Florida, 2th Edition, 1315p., 2003.
- HOLLERT, H.; KEITER, S.; KONIG, N.; RUDOLF, M.; ULRICH, M.; BRAUNBECK, T. A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **J. Soils Sediment.**, Canada, v.3, p. 197–207, 2003.
- IBAMA, 2005. Estudos sobre os impactos ambientais da carcinicultura, In. MEIRELES, A. J. A. Riscos sócio-ambientais ao longo da zona costeira. Simpósio Riscos Naturais e Antrópicos na zona costeira. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama/processo> Acesso em 26 de janeiro de 2006.
- JOVENTINO, F. K. P.; MAYORGA, M. I, de OLIVEIRA. Diagnóstico socioambiental e tecnológico da carcinicultura no município de Fortim, Ceará, Brasil. **Revista eletrônica do prodema.**, Fortaleza, v. 2, n. 1, p. 80-90, 2008.
- JUHEL, G.; DAVENPORT, J.; O'HALLORAN, J.; CULLOTY, S. C.; O'RIORDAN, R. M.; JAMES, K. F.; FUREY, A.; ALLIS, O. Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*: A bioenergetics approach. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 391-400, 2006.
- KEY, P. B.; CHUNG, K. W.; HOGUET, J.; SHADDRIX, B.; FULTON, M.H. Toxicity and physiological effects of brominated flame retardant PBDE-47 on two life stages of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. **Sci. Total. Environ.**, Amsterdam, v. 399, p. 28–32, 2008.
- KIENLE, C.; KOHLER, H. R.; G. A. Behavioural and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickelchloride to zebra fish (*Danio rerio*) embryos and larvae. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 72, p. 1740–1747, 2009.
- KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev. Dyn.**, New York, v. 203, p. 253-310, 1995.

- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota 1. TEIL: CHROOCOCCALES. In: Ettl, H.; Gärtner, G.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Spec. Akad. Verlag, Berlin. 548p., 2000.
- KUBITZA, F. **Qualidade da Água na Produção de Peixes - Parte III (Final)**. Panorama da AQUICULTURA. Rio de Janeiro, v. 8, n. 47, maio/junho, 1998.
- KURODA, E. K.; MINILLO, A.; ROCHA, O.; RODRIGUES FILHO, E.; Di BERNARDO, L. Avaliação da toxicidade aguda de uma cepa de *Microcystis* spp. por meio de testes com camundongos. **Eng. Sanit. Ambient.**, Rio de Janeiro, v.12, n. 1, p. 24-31, 2007.
- LE, T. X.; MUNEKAGE, Y.; KATO, S. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. **Sci. Total. Environ.**, Amsterdam, v. 349 (1-3), p. 95-105, 2005.
- LECLERCQ, C.; MOLINARO, M. G.; PICCINELLI, R.; BALDINI, M.; ARCELLA, D.; STACCHINI, P. Dietary intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children. **Food Addit. Contam.**, London, v. 17, n. 12, p. 979-989, 2000.
- LEVIN, L. A.; EKAU, W.; GOODAY, A. J.; JORISSEN, F.; MIDDELBURG, J. J.; NAQVI, S. W. A.; NEIRA, C.; RABALAIS, N. N.; ZHANG, J. Effects of natural and human-induced hypoxia on coastal benthos. **Biogeosci Discuss**, Germany, v. 6, p. 3563-3654, 2009.
- LI, C.; JACKSON, R. M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia reoxygenation injury. **Am. J. Physiol.**, Baltimore, v. 282, p. 227–241, 2002.
- LI, W. K. W. Annual average abundance of heterotrophic bacteria and *Synechococcus* in surface ocean waters. **Limnol. Oceanogr.**, Baltimore, v. 43, n. 7, p.1746-1753, 1998.
- LI, Y.; SHENG, J.; SHA, J.; HAN, X. The toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male rats in vivo and in vitro. **Reprod. Toxicol.**, Elmsford, v. 26, p. 239–245, 2008.
- LINARES, J. P.; CADENA, M.; RANGEL, C.; BUSTAMANTE, M. L. U.; OCHOA, J. L. Effect of *Schizothrix calcícola* on White Shrimp *Litopenaeus vannamei* (*Penaeus vannamei*) postlarvae. **Aquac.**, Amsterdam, v. 218, p. 55-65, 2003.
- LINDSAY, J.; METCALF, J. S.; CODD, G. A. Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia* spp. By pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). **Toxicon.**, Elmsford, v.48, p.995–1001, 2006.
- LIO-PO, G. D.; LEAÑO, E. M.; PEÑARANDA, M. M. D.; VILLA-FRANCO, A. U.; SOMBITO, C. D.; GUANZON JR, N. G. Anti-luminous *Vibrio* factors associated with

- the 'green water' grow-out culture of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Aquac.**, Amsterdam, v. 250, p. 1-7, 2005.
- LOPES, V. R.; FERNÁNDEZ, N.; MARTINS, R. F.; VASCONCELOS, V. Primary Screening of the Bioactivity of Brackishwater Cyanobacteria: Toxicity of Crude Extracts to *Artemia salina* Larvae and *Paracentrotus lividus* Embryos. **Mar. Drugs.**, Switzerland, v. 8, p. 471-482, 2010.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações**. RiMa, São Carlos, 606 p., 2006.
- LOVELL, J. M.; FINDLAYA, M. M.; MOATEB, R. M.; YANC, H. Y. The hearing abilities of the prawn *Palaemon serratus*. **Comp. Biochem. Physiol., Part A**, Oxford, v. 140, p. 89-100, 2005.
- LUGOMELA, C.; PRATAP, H. B.; MGAYA, Y. D. Cyanobacteria blooms - A possible cause of mass mortality of Lesser Flamingos in Lake Manyara and Lake Big Momela, Tanzania. **Harmful Algae**, New York, v.5, p. 534-541, 2006.
- LUND, S. A.; FULTON, M. H.; KEY, P. B. The sensitivity of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryos to organophosphate pesticide induced acetylcholinesterase inhibition. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 48, p. 127-134, 2000.
- MACHADO, R. M. D.; TOLEDO, M. C. F. B. J. Sulfitos em Alimentos. **Braz. Jour. Food Technol.** Campinas, v. 9, n. 4, p. 265-275, 2006.
- MACVEY, J. P. (Ed). **Handbook of mariculture: Crustacean aquaculture**. CRC press, New York, 2nd edition, v. 1, 544p., 1993.
- MADAN, V; WALKER, S. L., BECK, M. H. Sodium metabisulfite allergy is common but is it relevant? **Contact Dermatitis.**, Copenhagen; v. 57, n. 3, p. 173-176, 2007.
- MAIA, E. P. Recentes Avanços da Carcinicultura Marinha Brasileira. Disponível em: <http://www.acaq.org.br/artigos/recentes_avancos_carnicultura_brasileira.doc> Acesso em: 23 de março de 2004.
- MANKIEWICZ, J.; TARCZYNSKA, M.; WALTER, Z.; ZALEWSKI, M. Natural toxins from cyanobacteria. **Acta Biol. Crac. Ser. Zool.**, Krakow, v. 45, n. 2, p. 9-20, 2003.
- MANTOVANI, D.; MOSER, A. de S.; FAVERO, D. M. Cianobactérias em reservatórios brasileiros e seus prejuízos à saúde pública. **RAMA**, Maringá, v.4, n.1, p. 145-155, 2011.
- MARCOS, L.; MAQUEDA, N. Guía de Buenas prácticas para la conservación de los crustáceos. Madrid: Ministerio de agricultura, Pesca Y Alimentación, 318 p. 2003.

- MARIANO, W. dos S. **Respostas fisiológicas e bioquímicas do jeju *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) a exposição aérea.** Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal de São Carlos, 2006.
- MARTINS, R., FERNANDEZ, N. BEIRAS, R., VASCONCELOS, V. Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine *Synechocystis* and *Synechococcus* cyanobacterial strains in marine invertebrates. **Toxicol.**, Elmsford, v.50, p. 791–799, 2007.
- MARTINS, R.; PEREIRA, P.; WELKER, M.; FASTNER, J.; VASCONCELOS, V. M.; Toxicity of culturable cyanobacteria strains isolated from the Portuguese coast. **Toxicol.**, Elmsford, v. 46, p. 454-464, 2005.
- MENG, Z.; NIE, A. Effects of sodium metabisulfite on potassium currents in acutely isolated CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, Inglaterra, v. 43, p. 225–232, 2005a.
- MENG, Z.; NIE, A. Enhancement of sodium metabisulfite on sodium currents in acutely isolated rat hippocampal CA1 neurons. **Environ. toxicol. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 20, p. 35–41, 2005b.
- MENG, Z.; ZHANG, L. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in lymphocytes of workers exposed to sulphur dioxide. **Mut. Res.**, Amsterdam, v. 241, p.15–20, 1990.
- METCALF, J. S; LINDSAY, J.; BEATTIE, K. A.; BIRMINGHAM, S.; SAKER, M. L.; TOROKNE, A. K.; CODD, G. A. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. **Toxicol.**, Elmsford, v. 40, p.1115-1120, 2002.
- MISHRA, L. K.; YADAV B. Assessing the Cytotoxic and Genotoxic Effects of Sodium Metabisulphite: A Food Preservative. **Vegetos**, Meerut, v. 24, p. 32-37, 2011.
- MOHAMED, Z. A. Toxic cyanobacteria and cyanotoxins in public hot springs in Saudi Arabia. **Toxicol**, Elmsford, v. 51, p. 17–27, 2008.
- MONTEIRO, M; QUINTANEIRO, C.; PASTORINHO, M.; PEREIRA, M. L.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A. M. V. M. Acute effects of 3, 4- dichloroaniline on biomarkers and spleen histology of the common goby *Pomatoschistus microps*. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, p. 1333-1339, 2006.
- MOORE, L. R.; GOERICKE, R.; CHISHOLM, S. W. Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: Influence of light and temperature on growth,

pigments, fluorescence and absorptive properties. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, Amelinghausen, v. 116, p. 259–275, 1995.

MOREIRA, C. Q. **Toxicidade em camundongos devido à exposição prolongada a uma floração de cianobactéria contendo microcistinas: avaliações comportamental, hematológica, bioquímica e anatomopatológica**. 156f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada). Universidade de São Paulo, 2007.

MSAGATI, T. A. M.; SIAME, B. A.; SHUSHU, D. D.; Evaluation of methods for isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v.78, p. 382-397, 2006.

NING, X.; CLOERN, J. E.; COLE, B. E. Spatial and temporal variability of picocyanobacteria *Synechococcus* sp. in San Francisco Bay. **Limnol. oceanogr.**, Baltimore, v. 45, p. 695-702, 2000.

NOBRE, A.C.L.; MARTINS, A.M.C.; HAVT, A.; BENEVIDES, C.; LIMA, A.A.M.; M.C. FONTELES, MONTEIRO, H.S.A. 2003. Renal effects of supernatant from rat peritoneal macrophages activated by microcystin-LR: role of protein mediators. **Toxicol.**, Elmsford, v. 41, p. 377-381, 2003.

NUNES, A. J. P. Fundamentos da engorda em cativeiro. **Rev. Pan. Aquic.**, Rio de Janeiro, v. 06, p. 41-49, 2001.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura ameaçada. **Rev. Pan. Aquic.**, Rio de Janeiro, v.14(83), p. 37-51, 2004.

NUNES, A. J. P.; GESTEIRA, T. C. V.; OLIVEIRA, G. G.; LIMA, R. C.; MIRANDA, R. M. **Princípios para boas práticas de manejo (BPM) na engorda de camarão marinho do Estado do Ceará**. Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC). Programa de Zoneamento Ecológico Econômico (ZEE) do Estado do Ceará, Fortaleza, Ceará. 109p., 2005.

NYAKAIRU, G. W. A.; NAGAWA, C. B.; MBABAZI, J. Assessment of cyanobacteria toxins in freshwater fish: A case study of Murchison Bay (Lake Victoria) and Lake Mburo, Uganda. **Toxicol.**, Elmsford, n. 55, p. 939–946, 2010.

OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L.R.B. 2009. **Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável**. In: Tavares Dias, M. (Org.) Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Embrapa Amapá, Macapá, p.226-247.

OECD - Organization for Economic Co-Operation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test, 2004.

- OECD - Organization for Economic Co-Operation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 2006a.
- OECD - Organization for Economic Co-Operation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. Fish Embryo Toxicity Test, 2006b.
- OECD - Organization for Economic Co-Operation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. Fish Acute Toxicity Test, 1992.
- OKUMURA, D.T; TAKENAKA, R. A; BARBOSA, R. M; ROCHA, O. Toxicidade da Cianobactéria *Microcystis aeruginosa* aos Cladóceros Planctônicos *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*. **Anais do I Simpósio da Engenharia Ambiental**, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2004.
- OLIVEIRA, R; DOMINGUES, I.; GRISOLIA, C. K; SOARES, A. M. V. M. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, Berlin, v. 16, p. 679–688, 2009.
- OLIVERIA, U. O. **Efeitos da anoxia ambiental e da recuperação da anoxia sobre o balance oxidativo no caranguejo *Chasmagnathus granulata***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- PACHECO, J. W. F. Série P + L – Curtumes. CETESB, São Paulo, 76 p., 2005.
- PADILLA, P. A.; ROTH, M. B. Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 13, p. 7331-7335, 2001.
- PÁEZ-OSUNA, F. The environmental impact of shrimp aquaculture: Causes, effects, and mitigating alternatives. **Environ. Manage.**, New York, v. 28, n. 1, p. 131-140, 2001.
- PANNUNZIO, T. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defences and peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina litorrea*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, Amsterdam, v. 221, p. 277-292, 1998.
- PARTENSKY, F.; BLANCHOT, J.; VAULOT, D. Differential distribution and ecology of Prochlorococcus and Synechococcus in oceanic waters: a review. **Bull. Inst. Oceanogr.**, Cairo, v. 19, p. 457–475, 1999.
- PEARSON, L. A.; NEILAN, B. A. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. **Curr. Opin. Biotechnol.**, London, v. 19, n. 3, p. 281-288, 2008.
- PEREIRA NETO, J. B.; DANTAS, D. M. M; GALVÉZ, A. O; BRITO, L. O. Avaliação das comunidades planctônicas e bentônicas em viveiros de camarão (*Litopenaeus vannamei*). **Bol. Inst. Pesca.**, Sao Paulo, v .34, n.4, p. 543 - 551, 2008.

- PEREIRA, J. L.; HILL, C. J.; SIBLY, R. M.; BOLSHAKOV, V. N.; GONÇALVES, F.; HECKMANN, L. H.; CALLAGHAN, A. Gene transcription in *Daphnia magna*: Effects of acute exposure to a carbamate insecticide and an acetanilide herbicide. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 97, p. 268–276, 2010.
- PÉREZ, J. R.; LOUREIRO, S.; MENEZES, S.; PALMA, P.; FERNANDES, R. M.; BARBOSA, I. R.; SOARES, A. M. V. M. Assessment of water quality in the Alqueva Reservoir (Portugal) using bioassays. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, Germany, v. 17, p. 688–702, 2010.
- PEREZ, M. C.; CARRILLO, A. Picocyanobacteria distribution in the Ebro Estuary (Spain) **Acta Bot. Croat.**, Zagreb, v. 64, p. 237–246, 2005.
- PERRODIN, Y.; BABUT, M.; BEDELL, J. P.; BRAY, M.; CLEMENT, B.; DELOLME, C.; DEVAUX, A.; DURRIEU, C.; GARRIC, J.; MONTUELLE, B. Assessment of ecotoxicological risks related to depositing dredged materials from canals in northern France on soil. **Environ. Int.**, New York, v. 32, n. 6, p. 804-814, 2006.
- PHLIPS, E. J.; BADYLAK, S.; LYNCH, T. C. Blooms of the picoplanktonic cyanobacterium *Synechococcus* in Florida Bay, a subtropical inner-shelf lagoon. **Limnol. Oceanogr.**, Baltimore, v. 14, p. 1166-1175, 1999.
- PIMENTEL, M. A. da S. Controle da dosagem de metabissulfito de sódio em efluentes contendo cromo hexavalente. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA, Rio de Janeiro, março/2003.
- PLATAFORMA TECNOLÓGICA DO CAMARÃO MARINHO CULTIVADO. Seguimento de mercado/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Pesca e Aquicultura. Brasília: MAPA/SARC/DPA, CNPq, ABCC, 276p., 2001.
- QGN - Química Geral do Nordeste SA – Ficha de Segurança de Informação de Produtos Químicos. Camaçari, Bahia, 2004.
- QUINTANEIRO, C.; QUERIDO, D.; MONTEIRO, M.; GUILHERMINO, L.; MORGADO, F.; SOARES, A. M. V. M. Transport and acclimation conditions for the use of an estuarine fish (*Pomatoschistus microps*) in ecotoxicity bioassays: effects on enzymatic biomarkers. **Chemosphere**, Oxford, v. 71, p. 1803–1808, 2008.
- RABALAIS, N. N.; TURNER, R. E.; SCAVIA, D. Beyond science into policy: Gulf of Mexico hypoxia and the Mississippi River. **BioScience**, Washington, v. 52, p. 129–142, 2002.

- RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**, Second Edition, Taylor & Francis ed., London, 1083p., 1995.
- RAO, D. N.; SINGH, N. Effects of sulphur dioxide on injury and foliar concentrations of pigments, ascorbic and sulphur in *Vigna radiata* (L). **Jour. Environm. Biol.**, India, v. 9, p. 107-118, 1988.
- RENCZOÚULLARI, E.P.; KAYRALDIZ, A.; ÜLA, H. B.; AKMAK, T.; TOPAKTAŞ, M. The Cytogenetic Effects of Sodium Metabisulfite, a Food Preservative in Root Tip Cells of *Allium cepa* L. **Turk. J. Biol.**, Turkey, v. 25, p. 361-370, 2001a.
- RENCZOÚULLARI, E. P.; İLA, H. B.; KAYRALDIZ, A.; TOP, A. M. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. **Mut. Res.**, Amsterdam, v. 490, p. 107–112, 2001.
- RENNENBERG, H.; HERSCHBACH, C. Responses of plants to atmospheric sulphur . *In*: YUNUS, M.; IQBAL, M. (ed.) **Plant response to air pollution**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., pp. 285-293, 1996.
- RIBEIRO, F.; FERREIRA, N. C. G.; FERREIRA, A.; SOARES, A. M. V. M.; LOUREIRO, S. Is ultraviolet radiation a synergistic stressor in combined exposures? The case study of *Daphnia magna* exposure to UV and carbendazim. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v.102, p. 114–122, 2011.
- RICARD, M. Atlas Du Phytoplankton Marin: Diatomophycées. **Cent. Natl. Rech. Sci.**, Paris, v. 2. 297 p. 1987.
- RICARD, M. B.; COURAUD, F. Role of voltage-dependent ion channels in epileptogenesis. **Neurophysiol. Clin.**, New York, 23, 395–421, 1993.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 111, p. 1–61, 1979.
- ROCHA, I. P.; ROCHA, D. M. Análise da produção e do mercado interno e externo do camarão cultivado. **Rev. ABCC**, Natal, ano XII, n. 1, junho, 2010a.
- ROSA, C. E.; SOUZA, M. S. S.; YUNES, J. S.; PROENÇA, L. A. O.; NERY, L. E. M.; MONSERRAT, J. M.; Cyanobacterial blooms in estuarine ecosystems: Characteristics and effects on *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.50, p. 956-964, 2005.
- ROUND, F. E.; CRAWFORD, R. M.; MANN, D. G. **The Diatoms. Biology and Morphology of the genera**. Cambridge University Press. Cambridge, 747p., 1990.

ROWE, C. L. Differences in maintenance energy expenditure by two estuarine shrimp (*Palaemonetes pugio* and *P. vulgaris*) that may permit partitioning of habitats by salinity. **Comp. Biochem. Physiol. Part A**, Oxford, v. 132, p. 341–351, 2002.

SAMOCHA, T. M.; LOPEZ I. M.; JONES, E. R.; JACKSON, S.; LAWRENCE, A. L. Characterization of intake and effluent waters from intensive and semi-intensive shrimp farms in Texas. **Aquac. Res.**, Oxford, Inglaterra, v. 35, p. 321-339, 2004.

SANTOS, P. V. **Interação entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*: implicações no crescimento de culturas de microscistinas**. 94f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, 2009.

SAQRANE, S.; GHAZALI, I. E.; OUAHID, Y.; EL HASSNI, M.; EL HADRAMI, I. I.; BOUARAB, L.; DEL CAMPO, F. F.; OUDRA, B.; VASCONCELOS, V. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, n. 83, p. 284–294, 2007.

SCHOBERT, G., APPEL, E., HOFMANN, H., NEGELE, D., PARAVICINI, R., REITER, R., SANZIN, W. D., SCHADL, G., WEIßBRODT, L., WONDRAK, P. – 2001 - Empfehlungen für Bau und Betrieb von Fischteichen. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft. In: SINDILARIU, P. D. **Effluent treatment in trout aquaculture, state of the art and further developments**. Schriftenreihe, 2009.

SEKIYA, J.; WILSON, L. G.; FILNER, P. Resistance to injury by sulfur dioxide: correlation with its reduction to, and emission of, hydrogen sulfide in *Cucurbitaceae*. **Plant Physiology**. Washington, v. 70, p. 437-441, 1982.

SIEROSŁAWSKA, A.; RYMUSZKA, A.; KALINOWSKA, R.; SKOWROŃSKI, T.; BOWNIK, A.; PAWLIK-SKOWROŃSKA, B. Toxicity of cyanobacterial bloom in the eutrophic dam reservoir (Southeast Poland). **Environ. Toxicol. Chem.**, New York, v.29, p. 556–560, 2010.

SILVA, R.C. **Acúmulo e depuração de *Cylindrospermopsis* (cianotoxina) e seu efeito no crescimento em tilápias juvenis (*Oreochromis niloticus*)**. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas -Biofísica) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

SILVA, B. C.; ANDRE, R. C.; BELETTINI, F.; BUGLIONE, C. C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; ANDREATTA, E. R.; DERNER, R. B. UTILIZAÇÃO DE *Thalassiosira weissflogii*

EM LARVICULTURA DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931). **Atlântica**, Rio Grande, v. 31, n.1, p. 39-50, 2009.

SILVA JÚNIOR, I. F.; OLIVEIRA, V. C. Aplicação do controle estatístico de processo numa indústria de beneficiamento de camarão marinho no Estado do rio grande do norte. **Revista Gestão Industrial**, Paraná, v. 01, n. 03, p. 59-69, 2005.

SINDILARIU, P. D. Reduction in effluent nutrient loads from flow through facilities for trout production: a review. **Aquac. Res.**, Oxford, Inglaterra, v. 38, p. 1005–1036, 2007.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Influência da luz, manejo e tempo de residência sobre algumas variáveis limnológicas em um viveiro de piscicultura. **Biotemas**, Santa Catarina, v.8, n.1, p.61-71, 1995.

SIPATUBA - TAVARES, L.H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. Rima, São Carlos, 106 p., 2001.

SIVONEN, K.; BÖRNER, T. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In: Herrero A, Flores E, editors. **The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution**. Caister Academic press, Norfolk, p. 159–197, 2008.

SOTERO-SANTOS, R. B.; CARVALHO, E. G.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M. J.; ROCHA, O. Occurrence and toxicity of an *Anabaena* bloom in a tropical reservoir (Southeast Brazil). **Harmful Algae**, New York, v.7, p.590–598, 2008.

SOURNIA, A. **Atlas du Phytoplankton Marin**. Cent. Natl. Rech. Sci., Paris, vol. I, 219p., 1986.

SOURNIA, A. **Phytoplankton Manual**. UNESCO, Paris. 337p. 1978.

SOUZA, M. S.; BALSEIRO, E.; LASPOUMADERES, C.; MODENUTTI, B. Effect of ultraviolet radiation on acetylcholinesterase activity in freshwater copepods. **Photochem. Photobiol.**, Germany, v. 86, p. 367–373, 2010.

SOUSA, R. C. R. Introdução. In: Sant´Anna, C. L.; Azevedo, M. T. de P.; Agujaro, L. F.; Carvalho, M. do C.; de Carvalho, L. R.; de Sousa, R. C. R. Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras. Interciência, Rio de Janeiro e SBFic, São Paulo, cap. 1, p. 1-4, 2006.

STEIN. J. R. **Handbook of phycological methods. Culture methods e growth measurements**. Cambridge university press, Cambridge, 1978.

SURÓWKA, E.; KAROLEWSKI, P.; NIEWIADOMSKA, E.; LIBIK, M.; MISZALSKI, Z. Antioxidative response of *Mesembryanthemum crystallinum* plants to exogenous SO₂ application. **Plant. Sci.**, Limerick, v. 172, p. 76–84, 2007.

TAKENAKA, R. A.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M. J.; ROCHA, O. Toxicidade de Extratos de Florações de Cianobactérias de Reservatórios do Rio Tietê, SP, aos Dafinídeos *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, Santa Catarina, v. 2, n. 2, p. 147-156, 2007.

TOIBER, D.; SOREQ, H. Cellular stress reactions as putative cholinergic links in Alzheimer's disease. **Neurochem. Res.**, Denmark, v. 30, p. 909-919, 2005.

TOMAS, C. R. (ed). **Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates**. Academic Press, Inc., San Diego, California, 598 p., 1995.

TU, H. T.; SILVESTRE, F.; BERNARD, A.; DOUNY, C.; PHUONG, N. T.; TAO, C. T.; MAGHUIN-ROGISTER, G.; KESTEMONT, P. Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system. **Aquac.**, Amsterdam, v. 285, p. 244-248, 2008.

TUCKER, C. S. Quality of potential effluents from channel catfish culture ponds. In: J. Blake; J. Donald; W. Magette. editors. **National livestock, poultry, and aquaculture waste management**. American Society of Agricultural Engineers, St. Joseph, Michigan, p. 177-184, 1992.

USEPA. Economic and environmental impact analysis of the proposed effluent limitations guidelines and standards for the concentrated aquatic animal production industry. chapter 9, set., 2002.

UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte. Limnologie. **Mitteilung**, Braunschweig, v. 9, p. 1-38, 1958.

VALLY, H.; THOMPSON, P. J. Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. **Addiction Biology**, New York, v. 8, p. 3-11, 2003.

VASCONCELOS, V. M. Cyanobacteria toxins: Diversity and ecological effects. **Limnetica**, Valência, v. 20, n. 1, p. 45- 58, 2001.

VASCONCELOS, V. M. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. **Limnetica**, Valência, v. 25, n. 1-2, p. 425-432, 2006.

VASCONCELOS, V. M.; WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. **Toxicon.**, Elmsford, v. 50, p 740-745, 2007.

VERNOUILLET, G.; EULLAFFROY, P.; LAJEUNESSE, A.; BLAISE, C.; GAGNÉ, F.; JUNEAU, P. Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers

measured in organisms of different trophic levels. **Chemosphere**, Oxford, Inglaterra, v. 80, p. 1062–1068, 2010.

VIEIRA, J. M. S.; AZEVEDO, M. T. P.; AZEVEDO, S. M. F. O.; HONDA, R. Y.; CORRÊA, B.; Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonian Region. **Toxicon**, Elmsford, v.42, p. 709-713, 2003.

VIEIRA, J. M. S.; AZEVEDO, M. T. P.; AZEVEDO, S. M. F. O.; HONDA, R. Y.; CORRÊA, B.; Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, Elmsford, v. 45, p. 901-909, 2005.

VIGAN, L. Reproductive strategy of *Daphnia magna* and Toxicity of organic compounds. **Water res.**, New York, v. 27, n. 5, p. 903-909, 1993.

VILLAREAL, H., HINOJOSA, P., NARANJO, J. Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus vannamei* postlarvae. **Comp. Biochem. Physiol. A**, Oxford, v.108, p. 331–336, 1994.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. - 1997 - Principles of ecotoxicology. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Rima, São Carlos, 478p., 2006.

WALKER, C. H.; LIVINGSTONE, D. R. SETAC Special Publication Series, Pergamon Press. p. 3-33, 1992.

WATERBURY, J. B.; WEBB, E. A. 2011. Disponível em: <<http://www.whoi.edu/science/B/people/ewebb/Syne.html>> Acesso em 1 de set. 2011

WHO. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. In: Chorus, I.; Bartram, J. editors. **World Health Organization**. London and New York, 1999.

XUEREB, B.; LEFÈVRE, E.; GARRIC, J.; GEFFARD, O. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 94, p. 114–122, 2009.

YAGANZA, E. S.; D. RIOUX; SIMARD, M.; ARUL, J.; TWEDDELL, R. J. Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.70, p. 6800-6808, 2004.

YUNES. J. S.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, M. C. B. Cianobactérias tóxicas. **Biotec. Ciên.Tecn.**, Brasília, n. 23, novembro/dezembro, 2001.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** Rima, São Carlos, 464p., 2006.

ZENTENO-SAVÍN, T.; SALDIERNA, R.; AHUEJOTE-SANDOVAL, M. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. **Comp. Biochem. Physiol. C**, Oxford, v. 142, p.301–308. 2006.

ZIMBA, P. V.; CAMUS, A.; ALLEN, E. H.; BURKHOLDER, J. M. Co-occurrence of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, mortalities and microcystin toxin in a southeastern USA shrimp facility. **Aquac.**, Amsterdam, v. 261, p. 1048–1055, 2006.

Anexos

Anexo 1. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica (cel.mL⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda A, coletados no período seco.

Táxons	Viveiro 1					Viveiro 2				
	Ciclo - Dias									
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
Cyanophyta										
<i>Anabaena</i> sp.	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
<i>Cylindrospermopsis</i>	0	0	0	164	0	0	0	0	0	0
<i>Oscillatoria</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Planktothrix agardii</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudanabaena</i> cf.	12	124	56	0	764	16	0	32	240	504
Sub-total	16	124	56	164	764	16	4	32	240	508
Euglenophyta										
<i>Euglena</i> sp.	8	0	120	0	56	0	12	132	12	8
Sub-total	8	0	120	0	56	0	12	132	12	8
Dinophyta										
<i>Peridinium</i> sp.	0	0	112	20	0	0	0	0	48	8
<i>Prorocentrum</i> sp.	0	0	0	12	0	0	0	0	4	4
<i>Scrippsiella trochoi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0
Dinoflagelados não	40	0	0	16	68	4	4	84	84	0
Sub-total	40	0	112	48	68	4	4	84	148	12
Bacillariophyta										
<i>Amphora</i> sp.	0	8	0	0	0	0	8	16	4	0
<i>Aulacoseira granulata</i>	0	0	0	0	432	0	0	0	0	0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	20	0	4	32	580	0	0	0	0	4
Diatomáceas Centrales	0	0	96	16	0	4	0	16	0	0
Diatomáceas Pennales	36	68	0	192	176	12	176	172	204	64
<i>Diploneis</i> sp.	0	0	0	36	0	0	48	136	272	292
<i>Gyrosigma</i> sp.	0	0	16	100	0	0	0	0	0	0
<i>Navicula</i> sp.	0	0	0	0	0	0	16	12	4	0
<i>Nitzschia punctata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Nitzschia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
<i>Pleurosigma</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Sub-total	56	76	116	376	1188	16	248	352	488	368
Fitoflagelados	24	72	28	104	204	12	64	76	92	36
Sub-total	24	72	28	104	204	12	64	76	92	36
TOTAL (cel.mL⁻¹)	144	272	432	692	2280	48	332	676	980	932

Anexo 2. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica fitoplanctônica (cel.mL⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda B, coletados no período seco.

Táxons	Viveiro 01					Viveiro 02				
	Ciclo – Dias									
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
Cyanophyta										
<i>Anabaena</i> sp.	16	0	0	4	0	108	0	0	20	0
Cyanobacterias	0	52800	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lyngbya</i> sp.	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Oscillatoria</i> sp.	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudanabaena cf limnetica</i>	312	0	776	2108	16160	4160	38240	49600	9796	964
<i>Spirulina</i> sp.	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0
Sub-total	328	52840	784	2112	16160	4284	38240	49600	9816	964
Euglenophyta										
<i>Euglena</i> sp.	12	0	16	24	44	0	12	0	544	4
Sub-total	12	0	16	24	44	0	12	0	544	4
Dinophyta										
<i>Peridinium</i> sp.	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prorocentrum minimum</i>	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>Prorocentrum</i> sp.	12	0	16	0	0	616	244	8	0	0
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	36	0	8	32	16	4	344	92	176	60
Dinoflagelados não identif.	324	0	364	320	220	152	0	108	484	60
Sub-total	372	16	388	356	236	772	588	208	660	120
Cryptophyta										
<i>Cryptomonas subovales</i>	196	0	24	0	44	20	800	0	64	0
Sub-total	196	0	24	0	44	20	800	0	64	0
Bacillariophyta										
<i>Amphiprora alata</i>	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0
<i>Amphora</i> sp.	4	0	8	12	0	0	0	0	0	0
<i>Cyclotella</i> sp.	2992	0	0	32	0	296	0	0	0	104
<i>Cylindrotheca closterium</i>	1328	4160	8	0	24	1760	0	0	0	0
Diatomáceas Centrales	12	0	4	24	16	36	20	84	0	0
Diatomáceas Pennales	32	0	52	156	36	272	120	116	20	24
<i>Gyrosigma</i> sp.	28	0	12	0	0	44	36	24	24	0
<i>Nitzschia sigma</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Thalassiosira</i> sp.	0	0	0	0	0	656	0	0	0	0
Sub-total	4400	4160	84	224	76	3072	176	224	44	128
Fitoflagelados	196	28	248	200	244	0	176	144	284	80
Sub-total	196	28	248	200	244	0	176	144	284	80
TOTAL (céls. mL⁻¹)	5504	57044	1544	2916	16804	8148	39992	50176	11412	1296

Anexo 3. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica fitoplanctônica (cel.mL⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda C, coletados no período seco.

Táxons	Viveiro 01					Viveiro 02				
	Ciclo – Dias									
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
Cyanophyta										
<i>Anabaena</i> sp.	20	0	0	0	0	32	0	0	0	0
<i>Cylindrospermopsis</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudanabaena cf limnetica</i>	5120	132	736	504	8480	1920	3200	444	6056	1100
Sub-total	5140	132	736	504	8480	1952	3200	444	6056	1100
Euglenophyta										
<i>Euglena</i> sp.	12	8	12	0	0	0	8	0	0	0
Sub-total	12	8	12	0	0	0	8	0	0	0
Dinophyta										
<i>Prorocentrum minimum</i>	8	0	0	0	8	32	0	0	0	0
<i>Prorocentrum</i> sp.	0	20	20	0	44	0	4	28	0	0
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	0	0	260	140	132	0	68	148	484	128
Dinoflagelados não identif.	24	76	340	0	244	128	80	308	424	212
Sub-total	32	96	620	140	428	160	152	484	908	340
Cryptophyta										
<i>Cryptomonas subovales</i>	0	0	0	100	24	0	0	64	580	36
Sub-total	0	0	0	100	24	0	0	64	580	36
Bacillariophyta										
<i>Amphiprora alata</i>	4	0	0	0	0	8	0	0	0	0
<i>Amphora</i> sp.	0	0	0	0	0	0	12	0	4	4
<i>Coscinodiscus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Cyclotella</i> sp.	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	184	0	0	0	0	580	0	0	0	0
Diatomaceas Centrales	24	8	24	0	24	24	20	0	12	12
Diatomaceas Pennales	328	44	124	44	28	320	268	292	36	76
<i>Gyrosigma</i> sp.	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Navícula</i> spp.	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0
<i>Pleurosigma</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0
Sub-total	556	52	148	48	52	932	312	316	52	96
Fitoflagelados	44	20	132	76	144	56	304	144	144	204
Sub-total	44	20	132	76	144	56	304	144	144	204
TOTAL (céls.mL⁻¹)	5784	308	1648	868	9128	3100	3976	1452	7740	1776

Anexo 4. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica fitoplanctônica (cel.mL⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda A, coletados no período chuvoso.

Ciclo – Dias	Viveiro 10					Viveiro 11				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
Cyanophyta										
<i>Anabaena constricta</i>	4	280	3160	80	0	28	150	80	240	0
<i>Anabaena spiroides</i>	0	0	40	0	0	0	0	0	40	0
<i>Chroococcus minutus</i>	0	240	0	160	0	0	0	0	0	0
<i>Chroococcus turgidus</i>	0	120	0	0	0	8	0	40	80	0
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	12	1840	1656	4720	1274	356	242	720	1920	10948
<i>Geitlerinema amphibium</i>	16	0	120	0	34040	184	0	560	0	20240
<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	0	0	0	79920	0	328	0	3920	103920	0
<i>Merismopedia punctata</i>	0	920	0	0	0	32	0	120	0	0
<i>Merismopedia tenuissima</i>	0	0	0	280	0	0	0	0	160	0
<i>Microcystis aeruginosa</i>	8	1840	960	0	0	0	0	0	200	0
<i>Microcystis protocystis</i>	0	440	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microcystis wesenbergii</i>	0	21560	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Oscillatoria princeps</i>	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Oscillatoria terebriformis</i>	16	560	0	0	0	36	0	0	40	0
<i>Planktothrix agardhii</i>	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0
<i>Pseudanabaena limnetica</i>	0	720	0	0	0	72	50	120	0	0
<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	0	0	0	0	0	0	17	200	40	0
<i>Spirulina</i> sp.	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal	76	28520	20840	85160	161440	1044	475	5760	106640	129720
Euglenophyta										
<i>Euglena acus</i>	0	0	0	0	1	0	17	0	120	0
<i>Phacus curvicauda</i>	0	0	0	0	0	0	17	0	0	40
<i>Lepocynilis</i> sp.	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Subtotal	0	0	0	0	1	4	34	0	120	40

Cryptophyta										
<i>Cryptomonas ovata</i>	0	0	0	0	0	12	0	0	0	40
<i>Cryptomonas</i> sp.	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Subtotal	0	0	0	0	0	16	0	0	0	40
Bacillariophyta										
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	0	0	0	2840	560	88	8	0	0	40
<i>Cylindrotheca closterium</i>	16	0	0	3840	200	0	25	40	40	0
<i>Nitzschia sigma</i>	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0
<i>Synedra cf ulna</i>	0	0	0	0	0	0	42	0	80	0
<i>Synedra rupens</i>	0	560	80	0	0	0	33	0	0	0
<i>Aulacoseira</i> sp.	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
<i>Amphora</i> sp.	0	40	80	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cyclotella</i> sp.	0	0	200	0	0	0	0	40	0	0
<i>Gomphonema</i> sp.	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0
<i>Navicula</i> sp.	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0
<i>Nitzschia</i> sp.	4	0	0	0	0	0	0	40	0	0
<i>Surirella</i> sp.	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pennales	36	0	0	1200	240	316	200	1280	2640	600
Subtotal	60	600	360	7880	1000	408	350	12920	2760	640
Chlorophyta										
<i>Ankistrodesmus densus</i>	0	0	0	0	0	236	0	0	0	0
<i>Closterium ehrenbergianum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Coelastrum reticulatum</i>	8	0	0	0	0	856	1017	0	0	0
<i>Kirchneriella obesa</i>	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0
<i>Monoraphidium contortum</i>	4	0	0	0	0	0	125	120	200	0
<i>Monoraphidium griffithii</i>	8	0	0	0	0	12	0	0	0	0
<i>Oocystis lacustris</i>	0	0	0	0	0	68	25	0	0	0
<i>Oocystis prilsilla</i>	0	120	0	0	0	0	0	0	40	0
<i>Pediastrum duplex</i>	0	0	0	0	0	148	4633	0	0	0
<i>Pediastrum simplex</i>	4	0	0	0	0	248	125	80	0	0
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	4	0	40	0	0	0	0	0	0	0
<i>Scenedesmus arcuatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0
<i>Scenedesmus bijugus</i>	0	0	0	0	0	52	125	0	0	0
<i>Scenedesmus eornis</i>	0	0	0	40	0	104	0	200	0	0
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0	0	0	40	0	56	0	120	0	0
<i>Schroederia jadavi</i>	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0
<i>Sphaerocystis schroeteri</i>	0	0	0	0	0	248	8	0	0	0
<i>Staurastum leptocladium</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tetraedron denisal</i>	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
<i>Coelastrum</i> sp.	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0
<i>Nephrocitium</i> sp.	0	0	0	0	0	112	0	0	0	0
<i>Scenedesmus</i> sp.	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0
Subtotal	32	120	40	80	0	2180	6083	920	280	0
TOTAL (célis.mL-1)	168	29240	21240	93120	163440	3652	6942	1960	10980	130440

Anexo 5. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica fitoplanctônica (cel.mL⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda B, coletados no período chuvoso.

Ciclo - Dias	Viveiro 3					Viveiro 4			
	0	30	60	90	120	0	30	60	90
Cyanophyta									
<i>Anabaena constricta</i>	0	0	0	40	4	4	0	0	0
<i>Anabaena spiroides</i>	40	92	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chroococcus minutus</i>	40	0	0	0	0	0	25	0	160
<i>Chroococcus turgidus</i>	0	25	0	0	0	0	8	80	0
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	360	200	0	3120	712	0	58	600	840
<i>Geitlerinema amphibium</i>	520	75	12	17640	88	0	1042	0	15320
<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	1760	31592	184	760	5780	36	0	2120	0
<i>Merismopedia punctata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	40
<i>Oscillatoria cf princeps</i>	0	8	0	0	0	0	0	0	0
<i>Planktothrix agardhii</i>	0	0	0	0	0	0	0	40	0
<i>Pseudanabaena limnética</i>	0	0	0	120	0	0	0	0	40
<i>Oscillatoria sp.</i>	0	0	0	0	0	4	0	0	0
<i>Spirulina sp.</i>	0	8	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal	2720	32	196	21680	6584	44	1133	2840	1640
Euglenophyta									
<i>Euglena acus</i>	0	8	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phacus curvicauda</i>	0	0	0	0	0	0	0	200	0
<i>Euglena sp.</i>	0	0	0	0	0	0	58	0	0
Subtotal	0	8	0	0	0	0	58	200	0
Cryptophyta									
<i>Cryptomonas ovata</i>	0	0	0	120	0	0	0	0	0
<i>Cryptomonas sp.</i>	40	0	0	160	0	0	17	0	400
<i>mallomonas sp.</i>	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Subtotal	40	0	0	280	4	0	17	0	400
Dinophyta									
<i>Peridinium sp.</i>	0	8	64	120	0	32	42	40	80
Subtotal	0	8	64	120	0	32	42	40	80

Bacillariophyta									
<i>Aulacoseira varians</i>	0	0	0	1520	0	0	0	0	0
<i>Coscinodiscus centralis</i>	0	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>Coscinodiscus oculus eridis</i>	0	0	0	0	0	0	0	120	0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	80	0	0	0	0	0	33	0	40
<i>melosira varians – alacoseira</i>	0	0	0	0	8	0	0	0	0
<i>Nitzschia cf palea</i>	40	0	0	40	4	0	0	0	0
<i>Synedra rupens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Amphora</i> sp.	40	0	0	0	0	4	17	240	40
<i>Cymbella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	17	0	0
<i>Cyclotella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	80	0
<i>Gyrosigma</i> sp.	0	8	4	0	0	4	0	0	0
Pennales	760	242	36	0	0	36	183	720	40
Subtotal	920	250	44	1560	12	44	250	1160	120
Chlorophyta									
<i>Closterium ehrenbergianum</i>	0	0	0	0	0	16	0	0	0
<i>Kirchneriella obesa</i>	0	25	0	0	0	32	0	0	0
<i>Tetrallantos lagerheimii</i>	0	0	0	0	0	0	0	120	0
Subtotal	0	25	0	0	0	48	0	120	0
TOTAL (céls.mL-1)	3680	32920	304	23640	6600	168	1500	4360	17000

Anexo 6. Variação qualitativa e quantitativa da assembléia fitoplanctônica fitoplanctônica (cel.mL⁻¹) da água dos viveiros de camarão marinho da Fazenda C, coletados no período chuvoso.

Ciclo - Dias	Viveiro 27				Viveiro 53			
	0	30	60	90	0	30	60	90
Cyanophyta								
<i>Chroococcus minutus</i>	1040	0	0	0	0	0	2480	360
<i>Chroococcus turgidus</i>	80	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	800	40720	38440	80	0	3280	2840	1160
<i>Geitlerinema amphibium</i>	3080	0	2560	6960	0	560	11920	13280
<i>Geitlerinema unigranu</i>								
<i>Latum</i>	0	66360	5460	0	0	46040	0	0
<i>Merismopedia elegans</i>	0	0	0	0	0	0	0	120
<i>Merismopedia punctata</i>	0	0	0	0	0	0	120	40
<i>Merismopedia tenuissima</i>	280	0	0	0	0	0	0	0
<i>Oscillatoria cf princeps</i>	0	0	0	0	40	0	0	0
<i>Planktothrix agardhii</i>	40	0	0	0	0	0	0	120
<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	0	160	0	0	0	0	80	1840
<i>Pseudanabaena sp.</i>	0	0	0	0	0	0	160	0
<i>Merismopedia sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	80
Cocoides	0	0	0	0	0	0	0	2.84
Subtotal	5320	107240	9506	7040	40	49880	1760	30280
Euglenophyta								
<i>Euglena acus</i>	0	0	0	120	0	0	0	40
<i>Euglena sp.</i>	0	0	920	0	0	440	0	0
<i>Trachelomonas sp.</i>	0	0	0	0	0	40	0	0
Subtotal	0	0	920	120	0	480	0	40
Cryptophyta								
<i>Cryptomonas sp.</i>	0	0	1440	1080	0	0	0	0
Subtotal	0	0	1440	1080	0	0	0	0
Dinophyta								
<i>Peridinium sp.</i>	0	40	40	0	0	40	0	0
Subtotal	0	40	40	0	0	40	0	0

Bacillariophyta								
<i>Coscinodiscus centralis</i>	0	960	0	0	0	0	0	0
<i>Coscinodiscus oculus eridis</i>	0	0	0	0	520	0	0	0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0	160	240	0	0	680	3920	80
<i>Nitzschia cf palea</i>	0	0	0	0	0	0	1160	0
<i>Nitzschia sigma</i>	0	0	0	0	200	0	0	0
<i>Synedra rupens</i>	0	0	0	0	0	0	480	0
<i>Thalassiosira eccentrica</i>	0	0	40	0	0	0	0	0
<i>Diploneis sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	600
<i>Navicula sp.</i>	320	0	0	0	40	0	80	0
<i>Nitzschia sp.</i>	0	0	0	0	160	0	0	0
Centrales	0	0	0	0	0	0	0	200
Pennales	6.4	0	320	0	160	760	600	80
Subtotal	6720	1120	600	0	1080	1440	6240	960
Chlorophyta								
<i>Monoraphidium braunii</i>	0	0	0	0	0	0	0	40
<i>Monoraphidium contortum</i>	80	0	0	0	0	0	40	80
<i>Scenedesmus bijugus</i>	80	0	0	0	0	80	120	40
<i>Schroederia jadavi</i>	0	0	0	0	0	0	0	160
<i>Tetralantus lagerheimii</i>	0	0	1.92	0	0	240	1.24	600
Subtotal	160	0	1920	0	0	320	1400	920
Fitoflagelados	0	0	1240	0	5640	0	0	0
Subtotal	0	0	1240	0	5640	0	0	0
TOTAL (céls.mL-1)	1220	10840	101760	8240	6760	52160	25240	3220

Anexo 7. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda A (período seco) em camundongos *Mus musculus* (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média \pm EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).

Dias de cultivo	Viveiro	Dose	Fígado	Rins	Sobrevida
	Controle (H₂O Mar)	-	4,29 \pm 0,26	1,67 \pm 0,14	100%
0	10	50 mg/kg	4,25 \pm 0,33	1,63 \pm 0,07	100%
	11	50 mg/kg	4,28 \pm 0,19	1,53 \pm 0,06	100%
30	10	50 mg/kg	3,88 \pm 0,13	1,44 \pm 0,06	100%
	11	50 mg/kg	4,42 \pm 0,32	1,71 \pm 0,16	100%
60	10	50 mg/kg	3,87 \pm 0,22	1,44 \pm 0,11	100%
	11	50 mg/kg	4,46 \pm 0,12	1,55 \pm 0,10	100%
90	10	50 mg/kg	3,67 \pm 0,26	1,34 \pm 0,05	100%
	11	50 mg/kg	4,14 \pm 0,29	1,73 \pm 0,21	100%
120	10	50 mg/kg	3,69 \pm 0,09	1,44 \pm 0,15	100%
	11	50 mg/kg	4,25 \pm 0,26	1,60 \pm 0,09	100%

Anexo 8. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda B (período seco) em camundongos *Mus musculus* (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média \pm EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).

Dias de cultivo	Viveiro	Dose	Fígado	Rins	Sobrevida
	Controle (H₂O Mar)	-	4,29 \pm 0,26	1,67 \pm 0,14	100%
0	03	50 mg/kg	5,07 \pm 0,28	1,56 \pm 0,13	100%
	21	50 mg/kg	4,89 \pm 0,45	1,70 \pm 0,04	100%
30	03	50 mg/kg	4,84 \pm 0,34	1,59 \pm 0,05	100%
	21	50 mg/kg	4,66 \pm 0,21	1,80 \pm 0,04	100%
60	03	50 mg/kg	4,74 \pm 0,31	1,80 \pm 0,06	100%
	21	50 mg/kg	4,28 \pm 0,17	1,59 \pm 0,09	100%
90	03	50 mg/kg	5,09 \pm 0,04	1,61 \pm 0,02	100%
	21	50 mg/kg	4,69 \pm 0,09	1,76 \pm 0,05	100%
120	03	50 mg/kg	5,25 \pm 0,16	1,46 \pm 0,19	100%
	21	50 mg/kg	5,26 \pm 0,23	1,51 \pm 0,08	100%

Anexo 9. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda C (período seco) em camundongos *Mus musculus* (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média \pm EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).

Dias de cultivo	Viveiro	Dose	Fígado	Rins	Sobrevida
	Controle (H₂O Mar)	-	4,29 \pm 0,26	1,67 \pm 0,14	100%
0	16	50 mg/kg	4,45 \pm 0,48	1,59 \pm 0,08	100%
	53	50 mg/kg	3,92 \pm 0,15	1,53 \pm 0,03	100%
30*	53	50 mg/kg	3,86 \pm 0,28	1,49 \pm 0,08	100%
60	16	50 mg/kg	4,30 \pm 0,21	1,72 \pm 0,05	100%
	53	50 mg/kg	4,23 \pm 0,07	1,61 \pm 0,07	100%
90	16	50 mg/kg	3,90 \pm 0,15	1,52 \pm 0,04	100%
	53	50 mg/kg	4,47 \pm 0,26	1,69 \pm 0,06	100%
120	16	50 mg/kg	5,35 \pm 0,37	1,59 \pm 0,25	100%
	53	50 mg/kg	5,37 \pm 0,07	1,43 \pm 0,12	100%

* o extrato do viveiro 16 foi perdido no ciclo 30

Anexo 10. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda A (período chuvoso) em camundongos *Mus musculus* (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média \pm EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).

Dias de cultivo	Viveiro	Dose	Fígado	Rins	Sobrevida
	Controle (H₂O Mar)	-	4,51 \pm 0,31	1,55 \pm 0,05	100%
0	10	50 mg/kg	4,70 \pm 0,45	1,38 \pm 0,09	100%
	11	50 mg/kg	3,82 \pm 0,23	1,19 \pm 0,02	100%
30	10	50 mg/kg	3,79 \pm 0,20	1,56 \pm 0,06	100%
	11	50 mg/kg	3,87 \pm 0,24	1,20 \pm 0,06	100%
60	10	50 mg/kg	3,25 \pm 0,24	1,09 \pm 0,04	100%
	11	50 mg/kg	4,20 \pm 0,46	1,25 \pm 0,10	100%
90	10	50 mg/kg	3,36 \pm 0,08	1,24 \pm 0,05	100%
	11	50 mg/kg	3,65 \pm 0,24	1,50 \pm 0,06	100%
120	10	50 mg/kg	4,32 \pm 0,49	1,57 \pm 0,21	100%
	11	50 mg/kg	5,24 \pm 0,51	1,22 \pm 0,06	100%

Anexo 11. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda B (período chuvoso) em camundongos *Mus musculus* (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média \pm EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).

Dias de cultivo	Viveiro	Dose	Fígado	Rins	Sobrevida
	Controle (H₂O Mar)	-	4,51 \pm 0,31	1,55 \pm 0,05	100%
0	03	50 mg/kg	4,79 \pm 0,20	1,44 \pm 0,03	100%
	04	50 mg/kg	4,55 \pm 0,19	1,54 \pm 0,10	100%
30	03	50 mg/kg	3,82 \pm 0,05	1,57 \pm 0,17	100%
	04	50 mg/kg	3,40 \pm 0,19	1,20 \pm 0,03	100%
60	03	50 mg/kg	3,88 \pm 0,14	1,40 \pm 0,03	100%
	04	50 mg/kg	4,85 \pm 0,23	1,42 \pm 0,01	100%
90	03	50 mg/kg	3,57 \pm 0,23	1,50 \pm 0,03	100%
	04	50 mg/kg	3,21 \pm 0,13	1,19 \pm 0,06	100%
120	03	50 mg/kg	2,83 \pm 0,52	1,38 \pm 0,20	100%
	04	Não houve coleta			

Anexo 12. Avaliação da toxicidade aguda dos extratos da Fazenda C (período chuvoso) em camundongos *Mus musculus* (machos). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos animais retirados 24 horas após a administração. Os valores correspondem à média \pm EPM (g/100g de massa corpórea) de três animais (n = 3).

Dias de cultivo	Viveiro	Dose	Fígado	Rins	Sobrevida
	Controle (H₂O Mar)	-	4,51 \pm 0,31	1,55 \pm 0,05	100%
0	27	50 mg/kg	5,83 \pm 0,70	1,56 \pm 0,06	100%
	53	50 mg/kg	4,60 \pm 0,17	1,51 \pm 0,12	100%
30	27	50 mg/kg	5,29 \pm 0,22	1,37 \pm 0,09	100%
	53	50 mg/kg	4,62 \pm 0,12	1,50 \pm 0,05	100%
60	27	50 mg/kg	5,29 \pm 0,22	1,37 \pm 0,09	100%
	53	50 mg/kg	4,89 \pm 0,28	1,34 \pm 0,16	100%
90	27	50 mg/kg	3,51 \pm 0,18	1,13 \pm 0,02	100%
	53	50 mg/kg	4,25 \pm 0,17	1,38 \pm 0,07	100%
120	Não houve coleta				

Anexo 13. Variáveis físico-químicas mensuradas no início e término dos ensaios com *Mysidopsis juniae* expostos ao extrato metanólico de *Synechococcus* sp.

Concentrações mg/L	Início			Fim		
	Oxigênio	pH	Salinidade	Oxigênio	pH	Salinidade
Controle	3,9	7,75	35	5,9	7,68	35
10	4,4	7,73	35	5,7	7,65	35
30	4,6	7,71	35	5,4	7,63	36
100	5,0	7,70	35	1,7	7,22	35
300	5,5	7,66	35	0,7	7,10	35

Anexo 14. Variáveis físico-químicas mensuradas no início e término dos ensaios com *Daphnia magna* expostos ao metabissulfito de sódio.

Concentrações mg/L	Início		Fim	
	Oxigênio	pH	Oxigênio	pH
Controle	9,2	7,93	8,2	8,38
29	5,1	6,67	8,0	7,75
44	4,0	6,64	7,8	7,04
66	0,4	6,37	2,8	3,27
100	0,3	6,25	2,9	3,46
150	0,3	6,04	2,8	3,75
225	0,2	5,82	2,2	3,74

Anexo 15. Variáveis físico-químicas mensuradas durante a exposição de *Palaemon serratus* ao metabissulfito de sódio.

Conc. mg/L	Início do ensaio		24 h		48 h		Solução nova (48 h)		72 h		96 h	
	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH
Controle	7,2	8,16	3,9	8,08	3,0	7,88	7,0	8,18	2,8	7,91	1,5	7,79
15	7,4	7,72	3,8	7,70	4,5	7,58	5,6	7,95	3,1	7,82	1,8	7,73
30	4,9	7,42	4,1	7,61	4,9	7,71	3,9	7,65	1,8	7,69	1,6	7,70
50	2,3	7,12	3,7	7,59	4,8	7,78	1,5	7,35	1,6	7,51	2,1	7,68
100	0,4	6,82	3,1	7,21	6,0	7,61	0,2	6,69	2,0	7,39	3,1	7,60