



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

JANAINA BERNARDO FETOSA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Synechococcus* sp. OBTIDA DE VIVEIRO DE
CULTIVO DE CAMARÃO

FORTALEZA
2010

JANAINA BERNARDO FEITOSA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Synechococcus* sp. OBTIDA DE VIVEIRO DE CULTIVO DE CAMARÃO

**Trabalho supervisionado (modalidade A).
Monografia submetida à Coordenação do
Curso de Graduação em Engenharia de
Pesca, da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Engenheira de Pesca.
Área de concentração: Biologia aquática.
Orientadora: Prof^ª. Dra. Leticia Veras
Costa-Lotufo.**

**FORTALEZA
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F336a Feitosa, Janaina Bernardo.
Avaliação da toxidade de *Synechococcus* sp. obtida de viveiro de cultivo de camarão / Janaina Bernardo Feitosa. – 2010.
55 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.
Orientação: Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo.
1. Carcinicultura. 2. Cianobactérias. 3. *Synechococcus* sp. 4. Ecotoxicidade. 5. Citotoxicidade. I. Título.
CDD 639.2
-



JANAINA BERNARDO FEITOSA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Synechococcus* sp. OBTIDA DE VIVEIRO DE
CULTIVO DE CAMARÃO

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de
Engenheira de Pesca.

Aprovado em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo (Orientadora)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dra. Paula Christine Jimenez (Presidente da Banca)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias
Departamento de Engenharia de Pesca
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. José Renato de Oliveira César
Departamento de Engenharia de Pesca
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

Aos meus pais, Valdenor de Araújo Feitosa e Maria Luiza Bernardo Feitosa por todo cuidado, pelo amor incondicional, estímulo e força.

À jovem membro da Academia Brasileira de Ciências, Prof^a. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo, minha orientadora, que nos encher de orgulho, agradeço pela oportunidade no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, pelos ensinamentos e por todos os olhares de ternura

Agradeço aos Professores Wladimir Farias e Renato César por aceitarem participar da banca examinadora e pelas contribuições a este trabalho.

À M.Sc. Jeamyllie Nillin, por ter me falado a 1^a vez sobre ecotoxicologia num momento da graduação que a única certeza que eu tinha era que trabalharia a favor da natureza e não contra.

Ao meu amado Fellipe Macedo, pelo amor, paciência e incentivo de sempre. Por ter passado muitas tardes de sábado lavando pilhas de vidraria comigo e pelo cuidado em não me deixar sair tarde do laboratório de ônibus.

À Carol Castro algumas vezes citada nesse trabalho. Por ter permitido que eu montasse minha primeira placa de artemia usando seu extrato e por ter me confiado algumas das suas coletas, também por toda a amizade e por ser assim tão fofa, educada e de bem com a vida.

À M.Sc Janisi Aragão, por todo material de cianofíceas cedido pra iniciar meus estudos e por ter sido tão franca no momento que pensei em desistir de tudo. Agradeço também, por ter cuidado da minha cultura nos dias que eu estava em aula no Campus do Pici. Valeu mesmo!

Ao M.Sc. Lucas Buruaem, pelas horas corridas de ska e por me mostrar as infinitas possibilidades de estudar minha cianobactéria, e mais, por fazer parecer que tudo era tão simples.

À bióloga e bailarina M.Sc. Marcionília Pimentel que eu amo tanto, por toda amizade, carinho, pelos muitos toques, e momentos de pura alegria, pelas comidinhas naturebas e por me escutar todas as vezes que precisei conversar. Por todas as respostas sobre ecotoxicologia sem mais delongas e por ser assim: *infinita, sensível e linda*.

À M.Sc. Marcela Davanso, pela inteligência, simplicidade e disposição inspiradora.

À mais chique de todas nós, M.Sc. Isabelle Arthaud, por todas as dúvidas tiradas, pela amizade, força e positividade.

À jovem Dra Paula Jimenez, por aceitar presidir essa banca e pelo comprometimento sem igual comigo na reta final desse trabalho. Por todas as dicas, correções

e ensinamentos. Por viabilizar os testes de citotoxicidade e por me fazer sentir tão segura. Admiro muito você! Obrigada por tudo mesmo!

Ao amigo M.Sc. Elthon Góis, por ter feito comigo os testes de citotoxicidade e por todas as conversas boas entre os tempos de incubação.

Ao Laboratório de Oncologia Experimental-LOE, pelo apoio com os testes com células de mamíferos.

Enfim a todos os pós-graduandos que me acompanharam. Agradeço todas as dúvidas esclarecidas e por nunca terem deixado o clima chato de hierarquia estar entre nós.

A garotada voluntária e de iniciação científica que estão e os que só passaram pelo nosso laboratório. Em especial, a bióloga Lívia Pitombeira, valeu por tudo mesmo, até os pequenos estresses nos momentos em que trabalhamos juntas, por botar moral em mim! Ao Allyson e a Évila, por todos os golpes que dei em vocês, pra agitar minha cultura, contar uma placa ou outra. Agradeço muito à Larissa, por me ajudar tanto no cultivo das cianobactérias, agradeço muito por todas as vezes que preparou a câmara de sedimentação enquanto eu chegava esbaforida do Campus do Pici, agradeço também por esse seu humorzinho peculiar que eu adoro! Não tenho dúvida do seu futuro brilhante, minha querida!

Agradeço aos amigos dos laboratórios Equal e LECA, pela família feliz que nós formados. À parte, a Dra Socorro do Vale, por conferir meus cálculos de concentração e conversão de unidades e a Secretária Rosa Lucena, pela agilidade que nos facilita a vida. Agradeço ao amigo M.Sc. José Luiz Beserra (Buda), por estar sempre dispostos a ajudar e por todos os mimos feitos.

Agradeço ao professor Dr. Wladimir Farias por ter cedido gentilmente as estruturas do laboratório de planctologia para realização de parte do cultivo.

Aos meus amigos muito queridos da graduação: Janaina Sales e Juarez Coelho fundamentais em muitos momentos da minha graduação e pela ajuda na parte escrita desse trabalho (Amo vocês e vou morrer de saudades) ao Bruno Batista, Alberto George, Lorena Colares e Frederico Magalhães.

E nesse último semestre principalmente à Clara Coe, José de Sousa Junior e Roberta Freire, por terem sido o remédio da minha tristeza muitas vezes, pelas gargalhas, pelo amor e pela harmonia inexplicável que acontece quando estamos juntos.

Aos Professores do Departamento de Engenharia de Pesca, Dra Silvana Saker, que muito respeito e admiro, ao Dr. Alexandre Sampaio, Dr. Wladimir Farias e Dr. Tito Lutofo pela seriedade. Agradeço ao Prof. Calíope (lamento nunca ter sido sua aluna), pelo zelo com nosso departamento. Ao Mestrando amigo, agora na categoria de professor, Bruno Batista.

Por fim, deixo os meus profundos e sinceros agradecimentos às pessoas que contribuíram para esse trabalho e para minha vida acadêmica que não foram mencionados aqui.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Louvado sejas, meu Senhor,
Pelo irmão Vento,
Pelo ar, ou nublado
Ou sereno, e todo o tempo,
Pelo qual às tuas criaturas dás sustento.
Louvado sejas, meu Senhor
Pela irmã Água,
Que é muito útil e humilde
E preciosa e casta.
Louvado sejas, meu Senhor,
Pelo irmão Fogo
Pelo qual iluminas a noite,
E ele é belo e jucundo
E vigoroso e forte.
Louvado sejas, meu Senhor,
Por nossa irmã a mãe Terra,
Que nos sustenta e governa
E produz frutos diversos
E coloridas flores e ervas.”

(O Cântico das Criaturas - São Francisco de Assis -
Padroeiro da Ecologia.)

RESUMO

A prática da carcinicultura, além de gerar emprego e renda para comunidades costeiras e ribeirinhas, pode causar impactos ambientais sérios. Em viveiros de criação de camarão, o fornecimento de alimento é a principal causa da deterioração da qualidade da água e do acúmulo de matéria orgânica. Outro fator que agrava a problemática da qualidade da água de viveiro de criação de camarões é a superprodução de algas. O principal interesse sobre as superflorações de cianobactérias se deve aos seus produtos metabólicos serem toxinas potentes que podem causar riscos tanto para humanos quanto para a saúde do ecossistema. O presente estudo, por sua vez, propõe avaliar a toxicidade de uma cepa de cianobactéria *Synechococcus* sp. proveniente de amostras de fitoplâncton coletadas em viveiros de cultivo de camarão, já isolada e mantida em cultivo com sucesso. O ensaio para a avaliação da toxicidade da célula viva em *Mysidopsis juniae* foi realizada em 6 concentrações variando entre 4×10^4 e 6×10^6 , tendo os misidáceos se mostrado sensíveis aos efeitos do co-cultivo com células desta cianobactéria. Já o microcrustáceo *Artemia* sp. não se mostrou sensível à co-incubação com esta cepa de *Synechococcus* sp., nem mesmo em altas concentrações da célula viva. Quando expostas ao extrato orgânico bruto obtido de *Synechococcus* sp., houve mortalidade entre 20 e 50% das artêmias para as concentrações mais altas testadas, de 3,33 e 10mg/ml, mas não foi possível obter a CL_{50} do extrato. Foi realizado também o ensaio para avaliação de dano à membrana plasmática utilizando eritrócitos de camundongos *Mus musculus* com concentrações do extrato entre 8 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Na maior concentração, o extrato induziu 100% de efeito hemolítico para incubação por 1, 2 ou 4h, contudo, as respectivas CE_{50} apresentaram pouca variação, ainda que mostrando um ligeiro incremento na toxicidade do extrato com o aumento do tempo de exposição. O tratamento de células de mama normais humanas da linhagem HB4a mostrou a indução significativa de morte celular para o tratamento com 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato durante 24h, como avaliado pelo ensaio de exclusão por azul de tripan. Análises morfológicas das células fixadas e coradas mostraram que o extrato induziu vacuolização do citoplasma a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ que é intensificada com o aumento da concentração. Para a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, as células apresentam rareamento do citoplasma assim como considerável redução do volume nuclear, alterações compatíveis com necrose celular. A partir de tais evidências, pode-se indicar que a cepa aqui estudada de *Synechococcus* sp. induziu toxicidade em alguns dos bioensaios de avaliação ecotoxicológica, como também nos modelos celulares ensaiados.

Palavras-chave: Carcinicultura. Cianobactérias. *Synechococcus* sp.. Ecotoxicidade. Citotoxicidade.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Cultura de <i>Synechococcus</i> | 23 |
| Figura 2 | Microscopia da <i>Synechococcus</i> em aumento de 400x | 23 |
| Figura 3 | Representação esquemática do ensaio de toxicidade aguda com náuplios de <i>Artemia</i> sp. | 28 |
| Figura 4 | Representação esquemática do ensaio de toxicidade aguda com <i>Mysidopsis juniae</i> . | 31 |
| Figura 5 | Representação esquemática do ensaio de hemólise utilizando eritrócito de <i>Mus Musculus</i> Swiss. | 33 |
| Figura 6 | Representação esquemática do ensaio de exclusão por azul de tripan em células HB4. | 35 |
| Figura 7 | Efeito do extrato bruto de <i>Synechococcus</i> sp. sobre a morfologia de células HB4a | 36 |
| Figura 8 | Resposta da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss. | 40 |
| Figura 9 | Efeito do extrato bruto de <i>Synechococcus</i> sp. sobre as células da linhagem HB4a em cultura | 41 |
| Figura 10 | Representação gráfica da contagem de células HB4a não viáveis no ensaio de exclusão por azul de tripan utilizando extrato bruto de <i>Synechococcus</i> sp. | 42 |
| Figura 11 | Efeito do extrato bruto de <i>Synechococcus</i> sp. sobre a morfologia de células HB4a | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Faixas de concentrações utilizadas para avaliar a toxicidade de células vivas de <i>Synechococcus</i> para <i>Artemia</i> sp | 27 |
| Tabela 2 | Faixa de concentração utilizadas para avaliar a toxicidade do extrato de <i>Synechococcus</i> para <i>Artemia</i> sp. | 28 |
| Tabela 3 | Faixa de concentração utilizada para avaliar a toxicidade de célula viva de <i>Synechococcus</i> para juvenis de <i>Mysidopsis juniae</i> | 30 |
| Tabela 4 | Faixa de concentração utilizadas para avaliar a toxicidade do extrato de <i>Synechococcus</i> para membrana plasmática de eritrócitos de <i>Mus musculus</i> Swiss | 33 |
| Tabela 5 | Faixas de concentrações utilizadas para avaliar a toxicidade do extrato de <i>Synechococcus</i> para células HB4. | 34 |
| Tabela 6 | Estimativa do rendimento do extrato bruto de <i>Synechococcus</i> sp | 38 |
| Tabela 7 | Resultados do bioensaio de <i>Artemia</i> sp. com célula viva. | 39 |
| Tabela 8 | Resultados do bioensaio de artemia com célula extrato. | 39 |
| Tabela 9 | Resultado do bioensaio de <i>Mysidopsis juniae</i> em célula viva | 40 |

LISTA DE ANEXOS

| | | |
|---------|---|----|
| Anexo 1 | Meio de cultura ASN III utilizado para o cultivo da cianobactéria <i>Synechococcus</i> sp. | 58 |
| Anexo 2 | Composição da solução de elementos traços utilizados para suplementar o meio de cultura ANS III, para 1L de água destilada. | 58 |
| Anexo 3 | Valores e variação dos parâmetros físico-químicos no início e no final de cada teste com <i>Mysidopsis juniae</i> . | 59 |
| Anexo 4 | Número de <i>Mysidopsis juniae</i> mortos por réplicas nos experimentos com célula viva de <i>Synechococcus</i> . | 61 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 22 |
| 2.1 Cultivo da cianobactéria <i>Synechococcus</i> sp. | 22 |
| 2.2. Contagem de células | 22 |
| 2.3. Obtenção do extrato bruto de <i>Synechococcus</i> sp. | 24 |
| 2.4. Bioensaio com <i>Artemia</i> sp. | 25 |
| 2.4.1. Modelo biológico | 25 |
| 2.4.2. Obtenção dos náuplios | 25 |
| 2.4.3. Exposição dos náuplios de <i>Artemia</i> sp. a células vivas de <i>Synechococcus</i> sp. | 26 |
| 2.4.4. Exposição dos náuplios de <i>Artemia</i> sp. ao extrato obtido de <i>Synechococcus</i> sp. | 28 |
| 2.5. Bioensaio com <i>Mysidopsis juniae</i> | 27 |
| 2.5.1. Modelo biológico | 29 |
| 2.5.2. Cultivo de <i>Mysidopsis juniae</i> | 29 |
| 2.5.3. Exposição dos misidáceos a células vivas de <i>Synechococcus</i> sp. | 29 |
| 2.6. Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos | 31 |
| 2.6.1. Modelo biológico | 31 |
| 2.6.2. Obtenção da solução de eritrócitos | 31 |
| 2.6.3. Montagem do experimento | 32 |
| 2.7. Avaliação da citotoxicidade em células HB4a | 33 |
| 2.7.1. Manutenção da linhagem celular HB4a | 33 |
| 2.7.2. Montagem do experimento | 34 |
| 2.7.2.1. Exclusão por azul de tripan | 35 |
| 2.7.2.2. Coloração diferencial das células HB4a | 35 |
| 2.8. Análise dos dados | 37 |
| 3. RESULTADOS | 38 |
| 3.1. Rendimento do extrato bruto | 38 |
| 3.2. Bioensaio com <i>Artemia</i> sp. | 38 |
| 3.2.1. Bioensaio com célula viva | 38 |
| 3.2.2. Bioensaio com extrato | 39 |
| 3.3 Bioensaio com <i>Mysidopsis juniae</i> | 39 |
| 3.4. Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos | 40 |
| 3.5. Avaliação da citotoxicidade a células HB4a | |
| 3.5.1. Observação das células em cultura | 40 |
| 3.5.2. Exclusão por azul de tripan | 42 |
| 3.5.3. Análise morfológica | 42 |
| 4. DISCUSSÃO | 44 |
| 5. CONCLUSÃO | 51 |

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Synechococcus* sp. OBTIDA DE VIVEIRO DE CULTIVO DE CAMARÃO

JANAINA BERNARDO FEITOSA

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da procura pelo camarão brasileiro teve início em torno de 1998 mediante ao surto causado pelo vírus da Mancha Branca que ocasionou a crise que dizimou a produção dos países da América Central. Os incentivos fiscais e a qualidade do camarão brasileiro contribuiu para emplacar valores de volume de exportação de até 58.455 toneladas em 2003 no momento em que a produção chegava a 90.190 toneladas (ABCC, 2003).

O rápido crescimento da carcinicultura nas últimas décadas no nordeste se deu pelo clima favorável e temperaturas constantes praticamente o ano todo, fato que permite a produção de quase 3 ciclos de 90 dias por ano. Isso implica nas principais vantagens do nordeste em relação às regiões de clima temperado, bem como a disponibilidade de terras próximas ao estuário e fácil adaptação da espécie *Litopenaeus vannamei* (POERSCH *et al.* 2006). Outros fatores que impulsionaram o crescimento da carcinicultura no nordeste foram a falta de ordenamento e regulamentação e ainda um forte incentivo governamental (IBAMA 2005), seguindo a mesma linha do desenvolvimento da carcinicultura em outros países onde a atividade se mostrou desastrosa em aspectos econômicos e ambientais.

Sinais de crise do setor iniciaram com a ação antidumping imposta pelos Estados Unidos, enchentes de 2004 e 2008, viroses e a desvalorização do dólar americano (Rocha, 2007), isso refletiu diretamente na diminuição volume de exportação e direcionou a produção de camarão no nordeste principalmente para o mercado interno. Até setembro de 2009 o nordeste exportou 3.580t (ABCC, 2010), o que representa apenas 6% do pico de exportação em 2003.

Os principais benefícios sócio-econômicos da prática de carcinicultura estão na geração de receita e renda para as comunidades costeiras e ribeirinhas além de ser uma

alternativa à estagnação do suprimento do camarão oriundo da pesca em ambiente natural. Além do mais, o camarão é uma fonte de alimento de alto valor nutricional.

Apesar desses benefícios, a atividade implica em diversas alterações ao meio ambiente, onde os principais impactos gerados dizem respeito ao desmatamento da vegetação ciliar, essencial no controle do assoreamento e das inundações. O desmatamento de áreas de mangue, que servem de área de alimentação e abrigo nos estágios iniciais da vida de muitas espécies marinhas, é também uma questão a ser considerada. Figueiredo, Freitas e Gondim (2003) comprovaram a morte da vegetação de carnaubais, caatinga e mata ciliar, esta última, devido à infiltração de água salobra. Existe ainda uma relação entre destruição das florestas de mangue e produção de peixe comprovada por Mackinnon e Mackinnon(1986) citado em FAO(2006) onde foi evidenciado que para cada hectare desmatado de floresta de mangue, há perda de cerca de 480 kg de peixe, no período de um ano.

Outra preocupação é a introdução de espécies exóticas no ambiente natural. Segundo Munday, Kentouri e Eleftheriou (2002), uma vez acontecido o escape para o ambiente natural, as espécies não-nativa podem interferir na organização original da cadeia alimentar, inibir a reprodução e favorecer a hibridação ou, ainda, veicular novos parasitas e doenças.

Em 2005, a Comissão de defesa do consumidor, meio ambiente e minorias da Câmara dos Deputados confeccionou um relatório de avaliação dos danos da carcinicultura ao meio ambiente. O grupo de trabalho (GT-Carcinicultura) composto por técnicos e pesquisadores verificou que a atividade modifica o fluxo de marés, o que compromete a biodiversidade, e promove alterações no regime hídrico, o que influencia também na disponibilidade de água. A atividade também pode vir a causar risco de contaminação do lençol freático. Dados da pesquisa realizada pela EMBRAPA (2005) mostram que há aumento de depósito nos solos dos viveiros de elementos com potencial poluidor de águas subterrâneas, como o Ca, Mg, P, S, Ce, Mn, Fe e Zn.

Um fator também muito preocupante é a descarga de efluentes da carcinicultura que são lançados nos corpos d'água, muitas vezes sem nenhum tratamento prévio. Esses efluentes são ricos em nutrientes e matéria orgânica procedente dos dejetos, restos de ração não consumida e até mesmo de fertilização artificial e chegam aos corpos receptores por meio das despescas ou da renovação parcial das águas dos viveiros, prática adotada para manter a qualidade da água no cultivo. O lançamento desses efluentes pode exceder a capacidade assimilativa dos corpos receptores que, além de gerar prejuízos ao meio ambiente, pode

acarretar a autopoluição e contribuir para perdas na produtividade do próprio empreendimento (WAINBERG e CÂMARA,1998). Eler, Espíndola e Espíndola (2006) indicam o risco de esses despejos culminarem, também, na superfloração de microalgas tóxicas, sendo este mais um indício de comprometimento da qualidade da água. As superflorações são identificadas pelo crescimento de uma ou poucas espécies de microalgas, fator que causa sério desequilíbrio na dinâmica da biota dos ecossistemas aquáticos.

A eutrofização é uma resposta biológica à entrada adicional de nutrientes em um corpo d'água (ESTEVEZ,1998) sendo esse também é um fator que favorece o surgimento das superflorações. Esse fenômeno pode acontecer, ainda que raramente, em circunstâncias naturais, como decorrência de lixiviação, entretanto, o que é o mais comum, ultimamente, é que aconteça sob influência de ações antrópicas (MOSS, 1988)

As superflorações inviabilizam o uso da água já que o fenômeno altera as suas características organolépticas, afetando a cor, odor e sabor e ainda há o risco de contaminação por produção de metabólitos tóxicos ou carcinogênicos (DI BERNARDO, 1995).

Fatores como as mudanças climáticas devido ao aquecimento global que aumenta a temperatura dos corpos d'água também favorece a floração exagerada de microalgas, principalmente de cianofíceas, em qualquer época do ano (NICKLISCH, A. SHATWELL, T. e KÖLLER 2008). Este fato é confirmado por Jöhnk *et al.* (2008), que comparou taxas de crescimento entre a cianofícea *Microcystis*, algas verdes e diatomáceas e evidenciou a relação direta entre temperatura e crescimento maior da cianofícea em relação ao das outras algas.

Fernandes *et al.* (2009) ainda apontaram, como fatores que favorecem as florações de cianobactérias, a disponibilidade de luz, tolerância a altas temperaturas, estabilidade da coluna d'água, maior tempo de residência das águas, herbivoria dificultada pela presença de toxinas e a própria morfologia das cianobactérias. Devido às suas estratégias adaptativas, geralmente, as superflorações ocorrem em ambientes ricos em nitrogênio.

De acordo com a FUNASA (2004), registros de aproximadamente 10mg.m^{-3} de clorofila *a* e cerca de 20 000 células/ml de cianobactérias são consideradas uma elevada densidade de células no ambiente, fazendo-se indicado o monitoramento semanal de cianobactérias e cianotoxinas, devido à possibilidade de risco de intoxicações.

Autores evidenciam, ainda, o risco de impacto ao ambiente, como a diminuição da diversidade fitoplactônica e bioacumulação de toxinas em animais aquáticos (TERCALLA, DIETRICH e SCHLATTER, 1994; VASCONCELOS, 1995; WILLIAMS *et al.* 1997;

THOSTRUP e CHRISTOFFERSEN, 1999), bem como a diminuição do oxigênio dissolvido nos corpos d'água em decorrência das altas taxas de respiração e decomposição.

O efeito causado de intoxicação por cianobacterias tem sido descrito para diferentes organismos como artemia e daphnia (LINDSAY, METCALF e CODD, 2006) caranguejo (DEWES *et al.* 2006) moluscos (VASCONCELOS, 1995) e peixes (SILVA, 2008)

Dentre os organismos fotoautotróficos, as cianobacterias são singulares por apresentarem organização celular procariótica. Apesar de fotossintetizantes, são facilmente diferenciadas microscopicamente de outros grupos de microalgas pela ausência de plastos. São também cosmopolitas, inclusive podendo ser encontradas em ambientes extremos, sejam terrestres ou aquáticos. São adaptáveis a condições ambientais adversas, característica conferida pela sua longa história evolutiva, havendo registros fósseis de cianobactérias datados de 3.600 bilhões de anos (SHOPF *et al.*, 2007).

Provavelmente, estes foram os primeiros organismos produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva, por isso é atribuído a esse grupo a importância na transformação da atmosfera primitiva, formando a camada de ozônio o que tornou possível a evolução dos organismos sensíveis à radiação UV (LOURENÇO, 2006).

As cianobactérias possuem várias eco-estratégias que lhes conferem características vantajosas de sobrevivência, entre elas, a capacidade de produzir potentes toxinas, provavelmente para se proteger contra herbivoria (CODD, 2000). Também são capazes de fixar nitrogênio atmosférico, o que é desempenhado por estruturas conhecidas como heterocisto, e possuem estruturas para reserva de fosfato, na forma de polifosfatos, e de N, na forma de cianoficina. Apresentam também aerótopos, que são vesículas de gás utilizadas na flutuação em busca de melhores condições de luminosidade e de nutrientes, apesar de serem capazes de realizar fotossíntese em baixas luminosidades, já que apresentam pigmentos acessórios que lhes permite a utilização de várias faixas de absorção de luz. Em condições adversas, são capazes de produzir esporos de resistências, os acinetos, que são capazes de resistir por anos na espera de condições favoráveis para a floração.

As cianobactérias têm sido reconhecidas por muito tempo como prejudiciais a um grande número de organismos devido a potencial produção de metabólitos tóxicos. Hepatotoxina, neurotoxina, citotoxinas, dermatotoxinas e as toxinas irritantes foram

caracterizadas de diversos gêneros e espécies de cianobactéria (WIEGAND e PFLUGMACHER, 2005).

Todas essas características fazem com que o grupo das cianofíceas seja possível de formação de superflorações de uma única ou mesmo de poucas espécies, o que compromete a biodiversidade fitoplanctônica causando desequilíbrio do ecossistema, sem contar com o risco de produção ou bioacumulação de potentes toxinas. Estas toxinas têm sido responsáveis por casos de intoxicação de animais, tanto da fauna silvestre quanto domésticos em todo o mundo (FREEMAN, 2000; BRIAND *et al.*, 2003), e também do homem (JOCHIMSEM *et al.* 1998, CARMICHAEL *et al.*,2001). As cianotoxinas são facilmente bioacumuláveis, tornando o zooplâncton herbívoro vetores de toxinas para níveis tróficos superiores, representando risco ainda maior para o ecossistema e o homem (FERRÃO-FILHO,2009).

As cianotoxinas podem ser incluídas em três grandes grupos de acordo com suas estruturas químicas: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos; ou podem ser classificadas pelos sintomas que causam: neurotoxina, hepatotoxina, citotoxinas e dermatotoxina (SINVONEN e JONES, 1999).

As microcistinas são produzidas por muitos gêneros incluindo, *Microcystis* sp. *Anabaena* sp., *Planktothrix* sp. e *Nostoc* sp. Essas toxinas são peptídeos cíclicos que causam danos hepáticos como hemorragias intra-hepáticas e choque hipovolêmico (AZEVEDO *et al.*, 2002). Essas toxinas chegam aos hepatócitos por meio dos receptores de sais biliares e promovem uma desorganização dos filamentos de actina, aumentando assim os espaços intracelulares. Outro dado é que as microcistinas também podem atuar na promoção de tumores hepáticos.

As nodularinas são hepatotoxinas produzida apenas pelo gênero *Nodularia* sp., apresentam a mesma atividade biológica tóxica das microcistinas, mas por essas substâncias apresentarem estrutura menor, agem de forma mais danosa. Outra hepatotoxina importante são as cilindrospermopsinas, essas toxinas são produzida pelos gêneros *Cylindrospermopsis* sp., *Aphanizomenon* sp. e *Umezakia* sp. que agem como inibidores da síntese protéica, causando desnaturação das proteínas e necrose no fígado. O efeito tóxico também foi observado contra células renais, cardíacas e pulmonares e a mucosas gástricas de camundongos (FALCONER *et al.*,1999).

Também existe as neurotoxinas, que são alcalóides do tipo carbamato. A anatoxina-a foi a primeira toxina de cianobactéria a ser quimicamente e funcionalmente definida (DEVLIN *et al.*, 1977). Essa toxina age na transmissão de impulsos nervosos



provocando a superestimulação muscular, seguida de fadiga e paralisia, o que em, músculos respiratórios, pode ser fatal (MOLICA, 1996). Isso acontece porque essas toxinas não são degradadas pela acetilcolinesterase e se ligam aos receptores de acetilcolina atuando como bloqueador neuromuscular (CARMICHAEL, 1994).

Outra classe de toxinas importante são as saxitoxinas, que foram primeiramente isoladas de dinoflagelados marinhos da espécie *Gymnodinium breve*, responsáveis pelas ‘marés vermelhas’ e depois isoladas de algumas espécies de cianobactérias, como, por exemplo, *Anabaena* sp., *Cylindrospermopsis* sp., *Aphanizomenon* sp. e *Lyngbya* sp. (CARMICHAEL, 1994). Essas toxinas são também conhecidas como PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) e agem como bloqueadores dos canais de sódio das células nervosas, afetando a permeabilidade ao potássio e a resistência das membranas, provocando paralisia muscular e falência respiratória. Ainda existem as dermatotoxinas que são produzidas por todas as cianobactérias, são lipopolissacarídeos encontrados na parede celular e causam dermatites severas.

Castro (2007) em pesquisa realizada no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha - Labomar/UFC, demonstrou a toxicidade do extrato da comunidade fitoplanctônica de viveiros de camarão do Estado do Ceará em camundongos, onde foi observado danos nas células hepáticas. A toxicidade evidenciada nesse trabalho foi atribuída à predominância de cianobactérias nas análises quantitativas da comunidade fitoplanctônica do referido viveiro e à produção de hepatoxinas. A cianofícea *Synechococcus* sp. foi uma das espécies isoladas com sucesso desde o referido trabalho e se trata de uma cianobactéria picoplanctônica (0,2 à 2,0µm) normalmente encontrada em associações simbióticas em raízes de plantas de mangue (SZE, 1998). Essas cianobactérias são muitas vezes negligenciadas nos levantamentos das comunidades fitoplanctônicas pela difícil identificação e, por isso, tem seu potencial tóxico pouco estudado (FERRÃO-FILHO; MOLICA e AZEVEDO, 2009).

Para se obter uma resposta aos possíveis danos causados ao meio ambiente por contaminantes, já se é bem difundido o uso de bioensaios com modelos biológicos utilizando organismos representativos do local estudado, bem como de outros níveis tróficos que possam ser atingidos com a acumulação do metabólito tóxico em questão. A ecotoxicologia é uma ciência jovem que agrega conceitos da toxicologia clássica e ecologia para avaliar o efeito de substâncias químicas tóxicas e outros agentes perturbadores sobre os organismos. Entende-se por efeito tóxico respostas adversas dos organismos em exposição. Esses efeitos podem ser

expressos por letalidade, bem como por alterações fisiológicas, metabólicas e genéticas. (AZEVEDO e CHASIN, 2003)

Os testes ecotoxicológicos são hoje bastante comum como método de avaliação e monitoramento de agentes potencialmente tóxicos, fazendo parte de exigências legais de órgãos ambientais em vários países. A resolução nº 357 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece padrões de lançamentos de efluentes e utiliza para avaliação da qualidade de água os testes de ecotoxicidade.

Os bioensaios, juntos com as análises químicas, permitem avaliação e monitoramento ainda mais seguros de agentes potencialmente tóxicos. As análises químicas identificam e quantificam os contaminantes, ao passo que as análises ecotoxicológicas mostram nos organismos os efeitos das interações e misturas desses agentes contaminantes (COSTA, *et. al.*, 2008).

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade induzida pela cianobactéria *Synechococcus* sp. isolada de viveiro de cultivo de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*), seja da exposição às suas células vivas ou ao extrato orgânico bruto derivado desta espécie em bioensaios com *Artemia* sp., *Mysidopsis juniae* e ensaios de citotoxicidade *in vitro* com eritrócitos de camundongos e células humanas normais de mama.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo da cianobactéria *Synechococcus* sp.

A cianobactéria foi cultivada em Erlenmeyers de 1000ml com volume útil de 750 a 800ml de meio de cultura ASN III (anexo 1) suplementado com 0,1% de solução de elementos traços (ver anexo 2) em incubadora do tipo BOD CIENTEC CT708 , com condições de temperatura (26 ± 2 °C), luminosidade e fotoperíodo (12h claro e 12h escuro) controlada. O meio de cultura utilizado foi o ANS III, específico para o requerimento nutricional das cianobactérias em geral. A cultura foi mantida sem aeração, apenas com agitação manual de uma a duas vezes ao dia. A cada 15 dias foi realizada a repicagem da cultura acrescentando 200ml de meio ANSIII à cultura pré-existente e dividindo o volume para novos frascos afim de manter o volume útil.

2.2. Contagem de células

A contagem de células foi realizada pelo método de Utermöl (1958) por ser o mais indicado e o mais utilizado e por apresentar maior reprodutibilidade (CALJURI, ALVES e SANTOS, 2006). A contagem foi realizada com o auxílio de microscópio invertido (LabMed®) usando o aumento de 400x. As culturas escolhidas pra a realização dos bioensaios possuíam cor verde escuro e poucas células sedimentadas.

As cepas escolhidas para a contagem foram diluídas 100x em água do mar e colocadas para sedimentar na câmara de volume de 2ml por 2 horas. Foram contados cinco campos da câmara e as contagens realizadas levaram em consideração cada célula do tricoma.



Figura 1. Cultura de Synechococcus

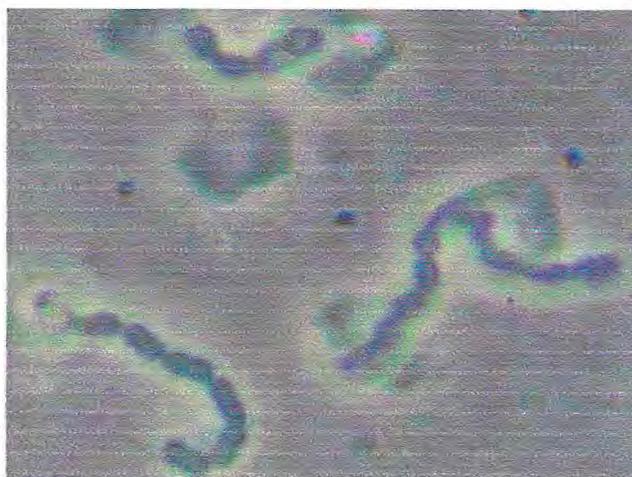


Figura 2. Microscopia da Synechococcus aumento de 400x

O primeiro passo para a utilização da câmara de Utermöhl consiste em fazer a relação entre o diâmetro do campo e o aumento da objetiva. Com auxílio de uma régua calibrada, foi mensurado que o campo visto no aumento de 400x equivalia a 0,5mm de diâmetro.

O cálculo da área foi realizado do seguinte modo:

$$A = \pi \times R^2$$

$$A = 3,14 \times (0,5)^2$$

$$A = 0,785$$

A estimativa do número de células foi realizada pela seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de cel/ml} = \frac{n}{sxc} \times \frac{1}{h} \times F \times 100^*$$

Onde:

n = somatório das células contadas nos 5 campos escolhidos

S = A = área do campo em mm² no aumento de 400X

C = número de campos contados

h = altura da câmara

F = fator de correção para mililitros: $\frac{10^3 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}}$

Em seguida, o valor obtido foi multiplicado pela diluição* realizada para sedimentação.

2.3. Obtenção do extrato bruto de *Synechococcus* sp.

A cultura foi centrifugada (Hettich®) a 3000rpm por 5 minutos em tubos de fundo cônico de 50 ml. O sobrenadante, que permanecia ainda com algumas células, foi devolvido ao cultivo e novamente enriquecido com o meio de cultura até atingir novamente a concentração adequada de células. O material precipitado foi reservado e congelado para posterior processo de liofilização, a fim de desidratar as amostras buscando preservar ao máximo as suas propriedades. Em seguida, o material liofilizado foi ressuscitado em metanol e sonicado (Unique ®) a fim de romper a membrana celular para promover a liberação do conteúdo. Em seguida o solvente foi removido por evaporação em uma estufa com recirculação de ar com temperatura em torno de 60 °C.

Quando necessário, a suspensão com metanol foi centrifugada para a remoção da maior parte do sal proveniente do meio de cultura e, mesmo assim, quando ainda havia quantidades visíveis de sal, o extrato seco foi novamente ressuscitado em metanol e o sobrenadante retirado com pipeta Pauster montada com tufo de algodão na extremidade a fim de evitar a passagem de sal e novamente colocado para evaporar em estufa.

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 determinada a concentração e, conseqüentemente, o número de células contido em 1L de cultura;

2º passo: foi determinada a concentração e, conseqüentemente, o número de células contido no sobrenadante remanescente da centrifugação deste 1L de cultura e subtraído do valor encontrado na contagem pré-centrifugação da cultura;

3º passo: o precipitado celular resultante da centrifugação deste 1L foi liofilizado, extraído com metanol e removido o sal antes de ser pesado para a determinação da massa de extrato bruto resultante deste processo e, assim, determinado o seu rendimento em relação ao volume da cultura e o número de células.

2.4. Bioensaio com *Artemia* sp.

2.4.1. Modelo biológico

A *Artemia* sp. é um microcrustáceo que pertence ao filo Artropoda, classe Crustacea, subclasse Branquiopoda, ordem Anostraca, família Artemiidae e gênero *Artemia* (LEACH, 1819). O modo de reprodução de algumas espécies por partenogênese e formação de cistos resistente facilita a dispersão e favorece a sua vasta distribuição entre os continentes. São bem adaptadas às variações de salinidade e oxigênio dissolvido e se alimentam por filtração, o que permite maior interação com meio. São de fácil cultivo e manutenção em laboratório e ainda são sensíveis a várias classes de contaminantes. Esses fatores fazem da artemia um organismo muito utilizado e bem difundido em ensaios de toxicidade (VEIGA e VITAL, 2002).

2.4.2. Obtenção dos náuplios

Os cistos foram adquiridos em lojas de material para aquário e foram preparados e eclodidos no laboratório.

A princípio, os cistos foram colocados para aerar em 300ml de água destilada por uma hora. Esse procedimento permite que o cisto, de formato bicôncavo, passe a apresentar

uma forma mais arredondado e assim, permitir que o agente descapsulante tenha ação de forma igual em toda superfície do cisto. Depois dessa hidratação os cistos recebem um tratamento de descapsulação com hipoclorito de sódio diluído em água destilada na proporção de 1:3, promovendo tanto a assepsia como a diminuição da resistência da camada do córion o que facilitará a eclosão. Nesse procedimento o cisto passa de marrom escuro a alaranjado.

Atingindo esse ponto, os cistos foram imediatamente bem lavados com água corrente para que não atinja o embrião e também para não deixar resíduos do agente. Depois desse preparo os cistos são levados para um funil de separação com aeração constante até que se complete a eclosão e em 48 horas atinja a fase de Náuplio II, fase utilizada nos testes pois os Náuplios na fase I ainda não se alimentam do meio, pois ainda possuem reserva de vitelo.

2.4.3. Exposição dos náupilos de *Artemia* sp. a células vivas de *Synechococcus* sp.

O experimento seguiu a metodologia descrita por Veiga & Vital (2002). Os testes foram realizados em placas de 24 com volume de 2,5 ml em 7 concentrações-teste em triplicata, onde cada réplica recebeu dez náuplios II. O tempo de duração dos testes foi de 48h sendo que a cada 24h foram contados os números de náuplios mortos com o auxílio de lupa. As condições de teste estão resumidas no Quadro 1.

Quadro 1. Resumo das condições de experimento de toxicidade aguda para *Artemia* sp.

| | |
|---|--|
| Tipo de teste | Estático sem renovação de água |
| Recipiente teste | Placa estéril de 24 poços |
| Volume da solução-estoque | 750 ml (testes com célula viva) 20 ml (com extrato) |
| Volume da solução-teste | 2,5ml |
| Água de diluição | Água do mar natural filtrada em membrana com poro de 0,45µm |
| Idade dos organismos | 48 horas |
| Número de organismo/poço | 10 |
| Número de réplica por concentração | 3 |
| Temperatura de incubação | 25±1 °C |
| Fotoperíodo | 12h claro; 12h escuro |
| Duração do experimento | 48h |
| Resposta | Mortalidade |
| Valor medido | Concentração letal a 50% dos indivíduos expostos (CL ₅₀) |
| Aceitabilidade do experimento | Percentual de mortes do controle menor que 10% |

Foram utilizadas três diferentes faixas de concentrações, em células/ml, da cianobactéria de *Synechococcus* para a avaliação da toxicidade em *Artemia* sp. e ainda o tratamento controle (C₀) apenas com água do mar. As concentrações estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Faixas de concentrações-teste utilizadas para avaliar a toxicidade de células vivas de *Synechococcus* para *Artemia* sp.

| Teste | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ | C ₇ |
|----------------|----------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| Teste 1 | - | 4x10 ⁵ | 2x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 6x10 ⁶ | 8x10 ⁶ | 10x10 ⁶ | 12x10 ⁶ |
| Teste 2 | - | 2x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 6x10 ⁶ | 8x10 ⁶ | 10x10 ⁶ | 12x10 ⁶ | 14x10 ⁶ |
| Teste 3 | - | 8x10 ⁶ | 10x10 ⁶ | 12x10 ⁶ | 14x10 ⁶ | 16x10 ⁶ | 18x10 ⁶ | >73x10 ⁶ * |

*Para C₇ foi utilizada 80% da cultura e 20% de água do mar com artêmias

2.4.4. Exposição dos náuplios de *Artemia* sp. ao extrato obtido de *Synechococcus* sp.

O teste com extrato segue a mesma metodologia do teste realizado com célula viva.

Para o preparo da solução estoque foi ressuspendido 290mg de extrato utilizando 20ml de água do mar filtrada contendo concentração de 14,5mg/ml. A partir dessa solução foi preparada as concentrações utilizadas no teste, mostrada na tabela 2.

Tabela2. Faixa de concentração-teste utilizadas para avaliar a toxicidade do extrato de *Synechococcus* para *Artemia* sp.

| C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| - | 0,04mg/mL | 0,12mg/mL | 0,37mg/mL | 1,11mg/mL | 3,33mg/mL | 10mg/mL |

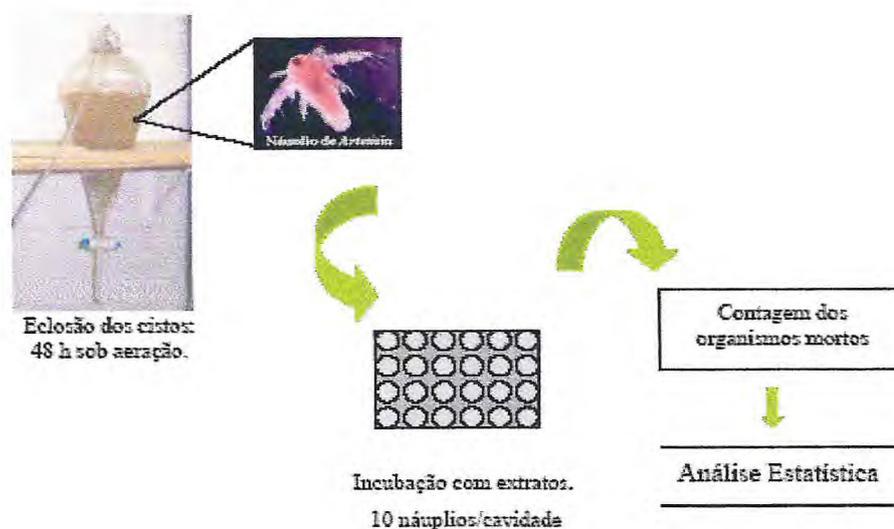


Figura 3. Representação esquemática do ensaio de toxicidade aguda com náuplios de *Artemia* sp.

2.5. Bioensaio com *Mysidopsis juniae*

2.5.1. Modelo biológico

Os misidáceos são pertencentes ao filo Artropoda, classe Crustácea superordem Pecarida e ordem Mysidacea. São encontrados principalmente em ambiente marinho e estuarino e constituem um grande elo na cadeia alimentar. Esse microcrustáceo possui ciclo de vida curto, hábito alimentar onívoro, na sua grande maioria, desenvolvimento direto e de fácil manuseio e é sensível a vários agentes tóxico. Por isso são organismos muito utilizados em programas de monitoramento ecotoxicológico e avaliação de toxicidade.

2.5.2. Cultivo de *Mysidopsis juniae*

Os misidáceos utilizados nos experimentos são provenientes do cultivo mantido no próprio laboratório com água do mar natural e filtrada em membrana de 0,4µm. Os organismos são cultivados em aquários de 10 litros sob aeração constante e mantido condições controladas de temperatura ($27\text{ °C} \pm 1$), salinidade (36 ± 1) e fotoperíodo (12 claro:12 escuro). Os misidáceos são alimentados uma vez ao dia com artemia enriquecida com óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau e uma vez por semana é realizada a retirada dos juvenis para controle da idade dos aquários bem como pra dispor organismos para a realização dos bioensaios. Uma vez por mês é realizado o censo nos aquários para o controle de taxa de estocagem e eventuais correções de proporção entre machos e fêmeas.

2.5.3. Exposição dos misidáceos a células vivas de *Synechococcus* sp.

O bioensaio com misidáceos segue a norma técnica L5. 251 da CETESB, 1992 que descreve o teste de toxicidade aguda.

Os testes foram realizados em béqueres de 400 ml enumerados e randomizados com 7 concentrações-teste em triplicata onde cada réplica recebeu dez juvenis com idade entre 1 e 8 dias. O tempo de duração dos testes foi de 96h sendo que a cada 24h foram contados e retirados os juvenis mortos e os remanescentes eram alimentados com artemia na fase de náuplio I. Durante o teste as condições ambiente não mantidas iguais as condições do cultivo. A figura 2 mostra a representação gráfica do teste.

Os parâmetro físico-químicos foram medidos no início e final de cada testes. Para a determinação do pH foi utilizado um potenciômetro Quimis®, para o Oxigênio Dissolvido um oxímetro YSI modelo 550A® e para a salinidade, um refratômetro Biobrix modelo 211®. O quadro 2 mostra o resumo das condições de teste.

Quadro 2. Resumo das condições de experimento de toxicidade aguda para *Mysidopsis juniae*.

| | |
|---|--|
| Tipo de teste | Estático sem renovação de água |
| Recipiente teste | Béquer de 400 ml |
| Volume da solução-estoque | 1000 ml |
| Volume da solução-teste | 300 ml |
| Água de diluição | Água do mar natural filtrada em membrana com poro de 0,45µm |
| Idade dos organismos | 1 à 8 dias |
| Número de organismo/béquer | 10 |
| Número de réplica por concentração | 3 |
| Temperatura de incubação | 25±1 °C |
| Fotoperíodo | 12h claro; 12h escuro |
| Duração do experimento | 96 h |
| Resposta | Mortalidade |
| Valor medido | Concentração letal a 50% dos indivíduos expostos (CL ₅₀) |
| Aceitabilidade do experimento | Percentual de mortes do controle menor que 10% |

Para o presente estudo, foram realizados sete testes utilizando um tratamento controle apenas com água do mar (C₀) e as seguintes concentrações de células vivas de *Synechococcus* sp. mostradas na tabela 3.

Tabela 3. Faixa de concentração utilizada para avaliar a toxicidade de célula viva de *Synechococcus* para juvenis de *Mysidopsis juniae*.

| C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| - | 4x10 ⁴ | 2x10 ⁵ | 4x10 ⁵ | 2x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 6 x10 ⁶ |

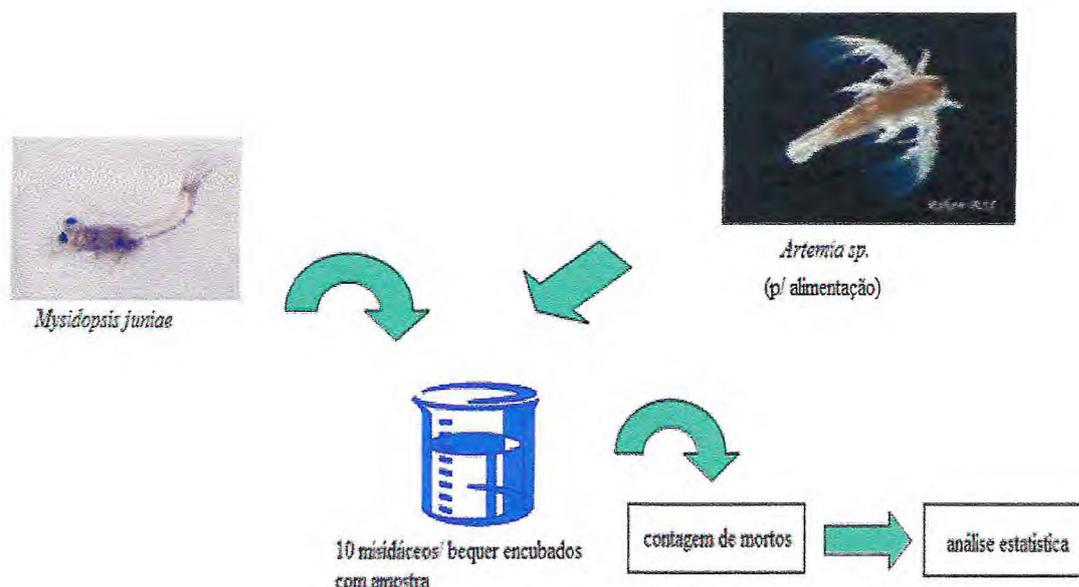


Figura 4. Representação esquemática do ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae*.

2.6. Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos

2.6.1. Modelo biológico

Esta metodologia foi utilizada para avaliar o potencial do extrato de *Synechococcus* sp. em causar danos à membrana celular de eritrócitos, seja pela formação de poros ou pela sua ruptura total. A quantificação do efeito, ou seja, a extensão do dano, é realizada de modo indireto, e é proporcional à quantidade de hemoglobina liberada do meio.

2.6.2. Obtenção da solução de eritrócitos

O sangue utilizado nesse experimento foi retirado de camundongos (*Mus musculus* Swiss) saudáveis. Os animais foram previamente anestesiados com éter etílico e, com o auxílio de um capilar de vidro foi retirado cerca de 1 ml de sangue do plexo orbital e

imediatamente transferido para solução salina (NaCl 0,15M + CaCl₂ 10mM), mantida sob agitação constante para evitar que a coagulação do sangue.

Em seguida, o sangue foi lavado 3 vezes com solução salina por centrifugação (FANEN Modelo 206®) a 1500rpm por 5 minutos utilizando solução salina afim de eliminar contaminações do plasma. O precipitado de eritrócitos foi ressuspenso em solução salina na proporção de 2% (v/v).

2.6.3. Montagem do experimento

O experimento foi realizado em placas de 96 poços utilizando 8 diluições seriadas (8 – 1000 µg/mL) do extrato de *Synechococcus* sp. (Tabela 4), em triplicata. Na ocasião, foi avaliado o efeito após 1, 2 ou 4h de exposição dos eritrócitos às diferentes concentrações do extrato. A concentração estoque utilizada no teste foi de 2mg/ml em DMSO a 20%.

O procedimento de montagem das placas foi realizado em fluxo laminar. A primeira coluna de cada placa foi utilizada para o plaqueamento do branco, no caso, solução de DMSO a 10% em solução salina. A segunda coluna foi utilizada para o controle negativo, onde foi plaqueada apenas solução salina. Finalmente, a terceira coluna foi utilizada para o controle positivo, onde foi plaqueada salina com Triton –X - 100 a 40%. Nos poços restantes das placas foram montadas as diferentes diluições seriadas do extrato (tabela 4) em triplicata, diluídas, sempre, em solução salina, de modo a completar o volume de 100µL. Em seguida, 100 µL da solução de eritrócitos a 2% foram adicionados a todos os poços. As placas foram mantidas sob agitação leve e constante por 1, 2 ou 4h e, ao final de cada período, foram centrifugadas (Eppendorf Modelo Centrifuge 5403®) (1500 rpm por 10 minutos). O sobrenadante foi transferido para outra placa que, por sua vez, foi lida em espectrofotômetro (DTX-880, Beckman Coulter®) a 450nm. A representação esquemática do experimento está representada na figura 3.

Tabela 4. Faixa de concentração utilizadas para avaliar a toxicidade do extrato de *Synechococcus* para membrana plasmática de eritrócitos de *Mus musculus* Swiss

| Branco | C- | C+ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₄ | C ₅ | C ₆ |
|--------|-----------------------|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Salina | Salina com DMSO (10%) | Salina com Triton-X-100 (0,5%) | 8 µg/mL | 15,6 µg/mL | 31,25 µg/mL | 62,5 µg/mL | 125 µg/mL | 250 µg/mL | 500 µg/mL | 1000 µg/mL |

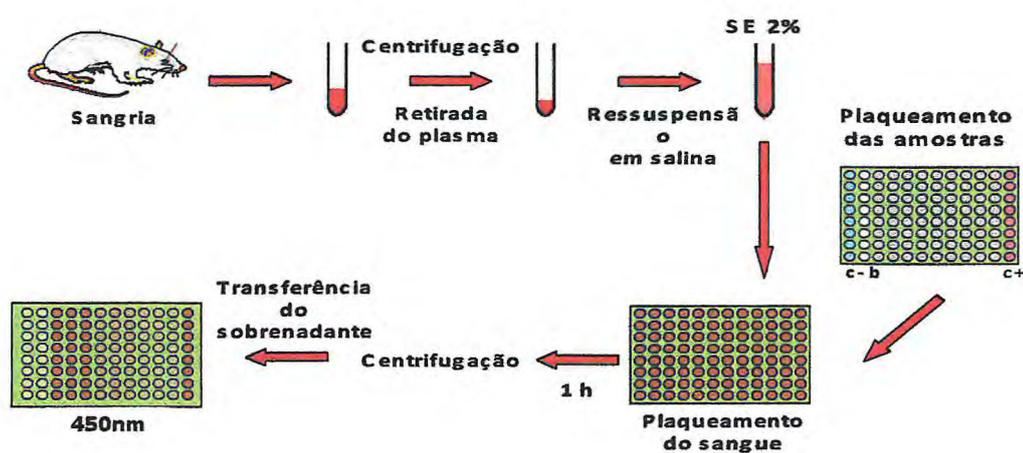


Figura 5. . Representação esquemática do ensaio de hemólise utilizando eritrócitos de *Mus musculus* Swiss

2.7. Avaliação da citotoxicidade em células HB4a

2.7.1. Manutenção da linhagem celular HB4a

A linhagem HB4a derivou de uma célula normal de epitélio luminal de mama humana, tendo sido imortalizada para a sua manutenção em cultura. As células foram

manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II) e mantidas em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (NUAIRE, modelo TS Autoflow).

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (75cm², volume de 250mL, TPP), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicillina e 100 µg/mL estreptomicina) e 5µg/ml de hidrocortisona e de insulina. O pH do meio foi ajustado para 7,2 e o meio foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poro de 0,22µm de diâmetro (Millipore) para esterilização.

As culturas tiveram seu crescimento acompanhado sob microscópio óptico de inversão (Nikon, modelo Diaphot) a cada 24 h. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo ou plaqueadas para a realização dos experimentos. Como as células crescem aderidas ao frasco de cultura, foi utilizada solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) para o seu desprendimento.

2.7.2. Montagem do experimento

As células HB4a foram diluídas para a concentração de 2×10^5 células/mL e transferidas para uma placa de 12 cavidades, tendo cada cavidade sido previamente montada com uma lamínula de vidro. Cada cavidade recebeu 1 mL da suspensão de células e a placa foi mantida por 24h em incubadora com atmosfera de CO₂ 5% e temperatura de 37°C, a fim de permitir a adesão das células à lamínula. Após esse tempo, o meio de cultura foi trocado por meio novo e as células foram tratadas, em duplicata, nas concentrações do extrato de *Synechococcus* sp. mostrada na tabela 5.

Tabela 5. Faixas de concentrações utilizadas para avaliar a toxicidade do extrato de *Synechococcus* para células HB4.

| C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| - | 10 µg/mL | 30 µg/mL | 100 µg/mL | 300 µg/mL | 1000 µg/mL |

As células foram expostas ao extrato por 24h, sendo mantidas em incubadora com atmosfera de CO₂ 5% e temperatura de 37 °C. Ao final deste período, as células controle e submetidas a cada um dos tratamentos foram observadas ainda em cultura, sob microscópio óptico de inversão.

2.7.2.1. Exclusão por azul de tripan

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível observar uma coloração azulada nas células mortas.

O presente estudo valeu-se deste ensaio para determinar a quantidade de células não-viáveis decorrentes da exposição ao extrato obtido de *Synechococcus* sp., visto que apenas estas ficam em suspensão no meio de cultura, enquanto que as células viáveis permanecem aderidas ao frasco de cultura. Assim, após homogeneização, a 90 µL do meio de cultura remanescente de cada tratamento foi adicionado a 10 µL do azul de tripan. As células não-viáveis foram reconhecidas e contadas nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer. A esquematização desse ensaio está representada na figura 4.

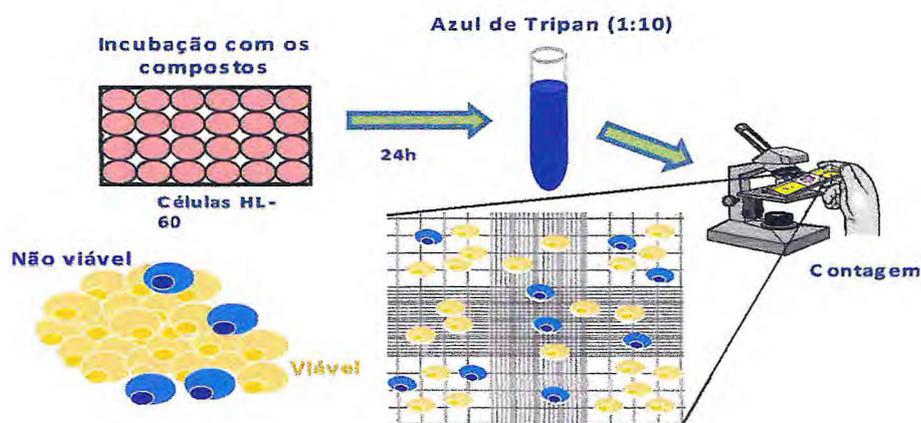


Figura 6. Representação esquemática do ensaio de exclusão por azul de tripan em células HB4a.

2.7.2.2. Coloração diferencial das células HB4a

A técnica de coloração diferencial de células permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a visualização de algumas estruturas celulares. A análise morfológica das células tratadas permite identificar alterações celulares que possam estar ocorrendo em decorrência de estresse metabólico, gerado, por exemplo, por exposição a substâncias tóxicas, dano ao material nuclear ou morte.

O presente estudo utilizou-se do kit Panótico Rápido (LaborClin), que consiste de três soluções, sendo a primeira uma solução fixadora e as duas seguintes, soluções corantes. Esse método baseia-se, essencialmente, na coloração hematológica estabelecida por Romanowsky (MARSHALL, BENTLEY & LEWIS, 1978). Para tanto, as lamínulas foram retiradas de cada uma das cavidades da placa e, segurando-se com um pinça, foram imersas por 5 segundos em cada um das soluções(figura 5), respeitando-se a ordem numérica crescente. Ao final deste processo, as lamínulas foram montadas sobre uma lâmina de vidro e analisadas em microscópio óptico de inversão (Axiovert 40C, Zeiss).

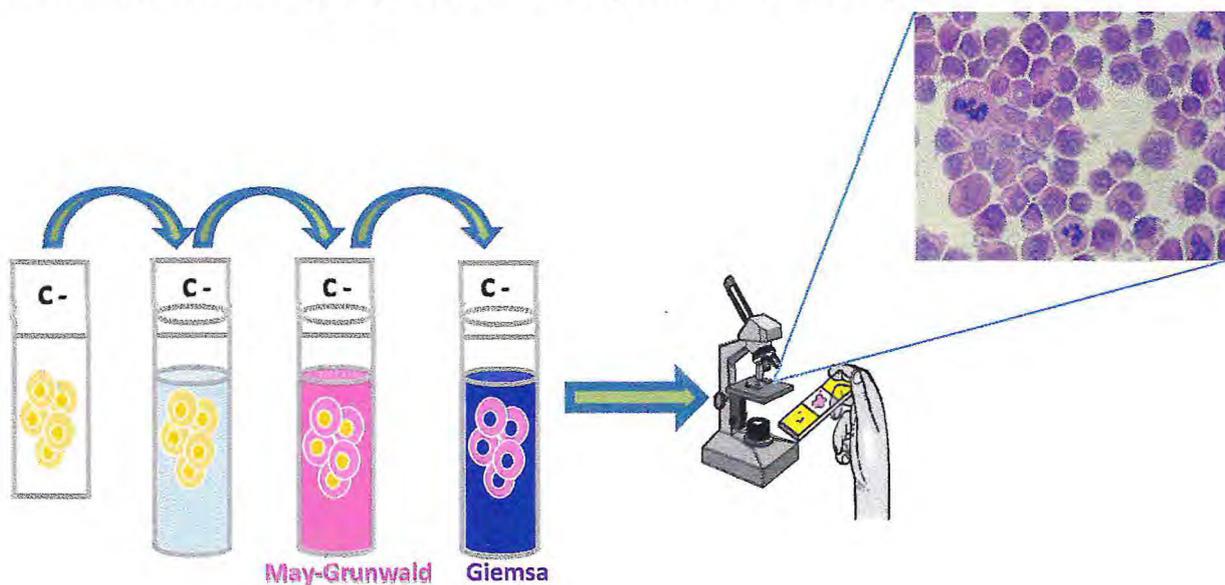


Figura 7. Efeito do extrato bruto de *Synechococcus* sp. sobre a morfologia de células HB4a

2.8. Análise dos dados

2.8. Análise dos dados

Para os testes agudos de artemia e misidáceo foram efetuados os cálculos das concentrações que causam mortes de 50% dos organismos testados (CL_{50}) por meio do método *Trimmed Spearman-Kärber* (HAMILTON *et al.*, 1977), assim como os respectivos intervalo de confiança (IC 95%).

Para o teste de hemólise, onde se avalia dano na membrana celular, foi efetuado o cálculo a concentração que causa dano efetivo a 50% do volume de eritrócitos (CE_{50}) por meio de regressão não-linear realizada no programa GraphPad Prism 5.0, tendo como parâmetros de 0% de efeito e 100% de efeito, respectivamente, o controle negativo e o controle positivo.

Para o ensaio de exclusão por azul de tripan, foi calculada a média aritmética obtida da contagem das células não-viáveis da cada quadrante da câmara de Neubauer. Para verificação de diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) unimodal seguida por teste de Dunnett (comparação de cada tratamento com o controle), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), usando o programa GraphPad Prism 5.0.

Para avaliação de alterações morfológicas celulares, as lâminas controle e tratadas foram levadas ao microscópico óptico invertido (Axiovert 40C, Zeiss) para análise de suas características e, então, fotografadas (câmera AxioCam ICc 3, Zeiss) para apresentação. As células foram julgadas quanto ao tamanho, contorno das membranas celulares, presença de vacúolos e condensação e fragmentação da cromatina nuclear.

3. RESULTADOS

3.1. Rendimento do extrato bruto

A tabela 6, a seguir, mostra os resultados das contagens de células para estimar o rendimento do extrato bruto de *Synechococcus* sp. em número de células/g de extrato. Desse modo, foi possível prever que 10mg de extrato pode ser obtido a partir de um número médio de células de 2.537.094 células, correspondente à, aproximadamente, 1 L de cultura.

Tabela 6. Estimativa do rendimento do extrato bruto de *Synechococcus* sp.

| | Cultivo A (1L) | | Cultivo B (1L) | |
|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| | Antes da centrifugação | Depois da centrifugação | Antes da centrifugação | Depois da centrifugação |
| Nº de cel/mL | 399.763.507 | 433.230 | 528.929.664 | 45.035.678 |
| Nº de células extraídas (porcentagem) | 399.330.277.000 (99.89%) | | 483.893.986.000 (91.49%) | |
| Massa final do extrato | 1.969,5mg | | 1.588,3mg | |
| Rendimento do extrato | 202.758 cel./mg de extrato | | 304.662 cel./mg de extrato | |

3.2. Bioensaio com *Artemia* sp.

3.2.1. Bioensaio com célula viva

As artêmias não se mostraram sensíveis à co-incubação com células vivas da cianobactéria *Synechococcus* sp. em nenhum dos três testes realizados, nem mesmo nas maiores concentrações de exposição. No último teste, 80% do volume de incubação consistiram de células da cianobactéria em seu meio de cultura, superando, deste modo, as 73×10^6 células, e, ainda assim, as artêmias continuaram vivas após 48h de incubação, como mostrado na tabela 7.

Tabela 7. Resultados do bioensaio de *Artemia* sp. à células vivas.

| Teste com <i>Artemia</i> sp. (célula viva) | | | |
|--|------------------|--|-------------|
| Teste | CL ₅₀ | Faixa de concentração (cel./mL) | Observações |
| 1 | Não calculou | 4x10 ⁵ ; 2x10 ⁶ ; 4x10 ⁶ ; 6x10 ⁶ ; 8x10 ⁶ ; 1x10 ⁷ ; 1,2x10 ⁷ | 100% vivos |
| 2 | Não calculou | 2x10 ⁶ ; 4x10 ⁶ ; 6x10 ⁶ ; 8x10 ⁶ ; 1x10 ⁷ ; 1,2x10 ⁷ ; 1,4x10 ⁷ | 100% vivos |
| 3 | Não calculou | 8x10 ⁶ ; 1x10 ⁷ ; 1,2x10 ⁷ ; 1,4x10 ⁷ ; 1,6x10 ⁷ ; 1,8x10 ⁷ e > 73x10 ⁶ | 100% vivos |

3.2.2. Bioensaio com extrato

Foram realizados dois testes com o extrato bruto de *Synechococcus* sp. em náuplios II de artêmia nas concentrações indicadas na tabela 4. Nesse caso, a concentração letal para 50% dos indivíduos expostos é superior a maior concentração testada. De toda forma, foi possível evidenciar algumas mortes nas concentrações superiores. No primeiro teste houve morte nas duas concentrações mais altas (3,33mg/ml e 10mg/ml), 20% de mortes na somatória das três réplicas da concentração de 3,33 mg/ml, e 40 % na somatória das três réplicas da concentração de 10mg/ml . Já para o segundo teste, também na mesma faixa de concentração, houve morte apenas na concentração mais forte (10mg/ml) onde a somatória das 3 réplicas apresentou 50% de mortes.

Tabela 8. Resultados do bioensaio de artêmia com extrato.

| Teste com <i>Artemia</i> sp. (extrato) | | | |
|--|------------------|----------------------------------|--|
| Teste | CL ₅₀ | Faixa de concentração (mg/mL) | Observações |
| 1 | Não calculou | 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,04 | 20% de mortes em 3,33mg/mL 40% em 10mg/mL |
| 2 | Não calculou | 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,04 | 50% de morte em 10mg/mL |

3.3 Bioensaio com *Mysidopsis juniae*

Os misidáceos mostraram-se sensíveis ao teste utilizando células vivas de *Synechococcus* sp. A tabela 9 mostra a concentração letal pra 50% dos indivíduos expostos

(CL₅₀) seus respectivos intervalos de confiança a 95% em cada um dos 7 testes realizados. A CL₅₀ para a co-incubação dos misidáceos com células vivas de *Synechococcus* sp. variou entre 113.739 e 5.624.081 células/mL.

Tabela 9. Resultado do bioensaio de *Mysidopsis juniae* em célula viva

| Teste com <i>Mysidopsis juniae</i> (célula viva) | | | |
|--|----------------------------|-----------------------|----------|
| Teste | CL ₅₀ (cel./mL) | I.C 95% | TRIM (%) |
| 1 | 2.713.158 | 1.890.827 - 3.893.125 | 20,00 |
| 2 | 304.420 | 265.661 - 348.831 | 27,59 |
| 3 | 502.974 | 407.623 - 620.630 | 0,00 |
| 4 | 506.136 | 309.792 - 826.919 | 14,29 |
| 5 | 5.624.081 | 4.635.380 - 6.823.666 | 44,83 |
| 6 | 113.739 | 83.713 - 154.536 | 0,00 |
| 7 | 1.782.790 | 1.145.570 - 2.776.886 | 24,56 |

3.4. Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos

Quanto ao dano à membrana plasmática de eritrócitos de camundongos *Mus musculus* Swiss, os resultados mostraram que o extrato apresenta propriedade hemolítica já que houve rompimento da célula na última concentração testada, de 1000 µg/mL. O cálculo aproximado da EC₅₀ sugere que o aumento do efeito lítico sobre as hemácias seja proporcional ao seu tempo de exposição ao extrato de *Synechococcus* sp. A figura 6 mostra as curvas que representam a concentração vs efeito do extrato sobre a membrana das hemácias.

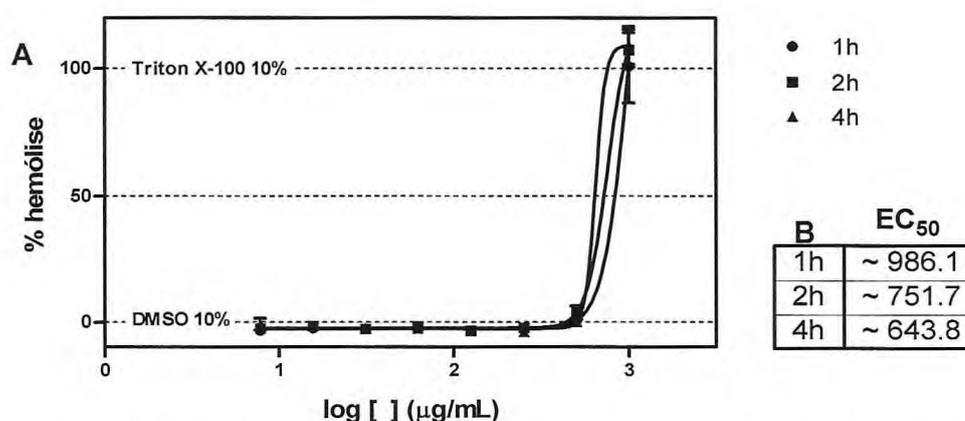


Figura 8. Resposta da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos *Mus musculus* Swiss. As curvas representam a concentração vs efeito, em A, e valor de EC₅₀, em B, para cada um dos períodos de incubação. As curvas e valores foram obtidos por meio de regressão não-linear realizada no programa GraphPad Prism 5.0, tendo como parâmetros de 0% de efeito e 100% de efeito, DMSO 10% e Triton X-100 10%, respectivamente.

3.5. Avaliação da citotoxicidade a células HB4a

3.5.1. Observação das células em cultura

A observação das células em cultura mostra o controle dentro do perfil de normalidade, com praticamente todas as células aderidas e proliferando. O tratamento com concentrações menores não chegou a alterar muito este aspecto, enquanto que o tratamento com 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e, mais evidentemente com 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, revelou o desprendimento de muitas células, sugerindo morte celular.

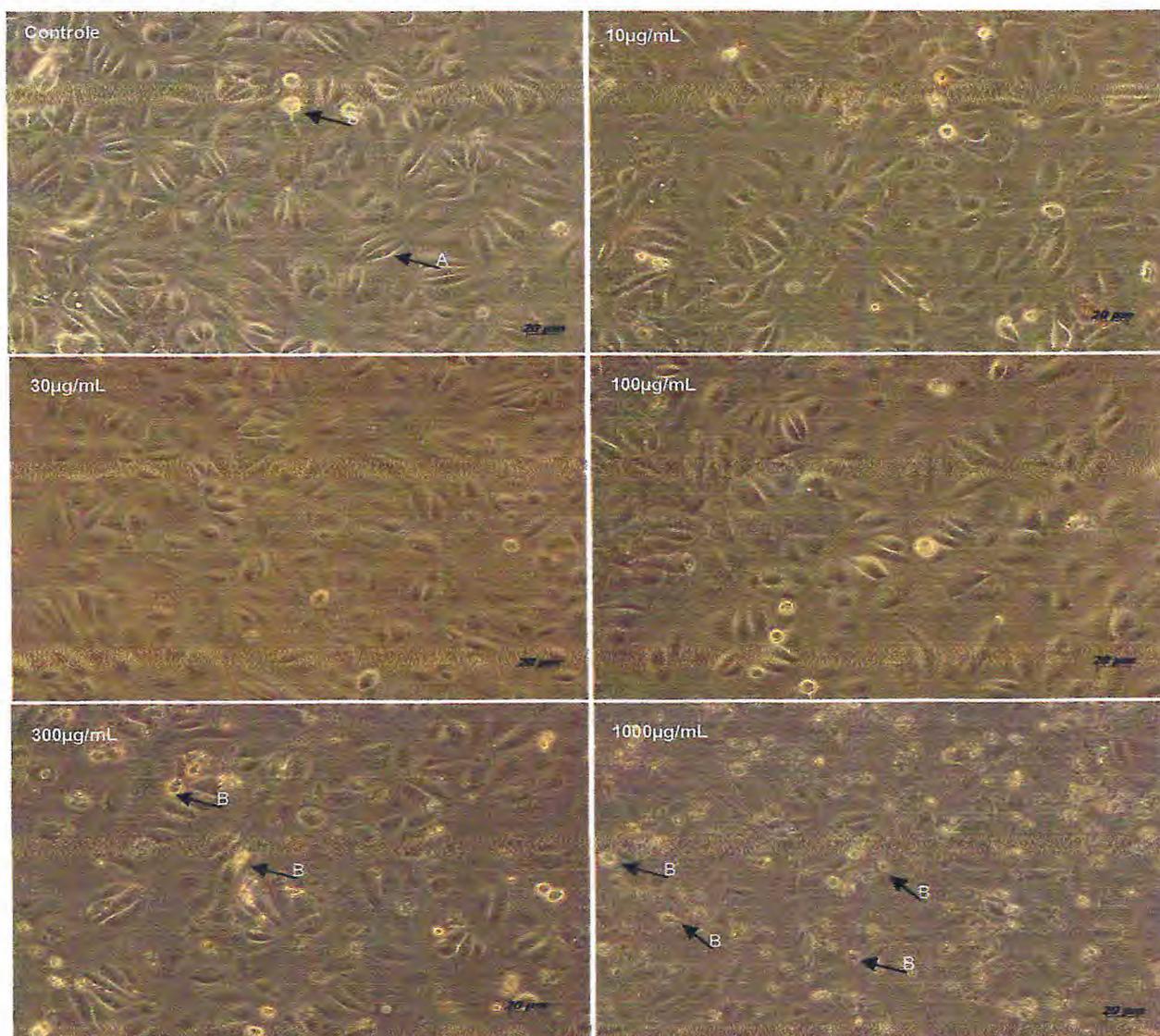


Figura 9. Efeito do extrato bruto de *Synechococcus* sp. sobre as células da linhagem HB4a em cultura. As microfotografias foram obtidas sob aumento de 200X. A- células aderidas. B células desprendida

3.5.2. Exclusão por azul de tripan

A exposição por 24h de células HB4a a diferentes concentrações do extrato (10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) induziu aumento significativo do número de células não-viáveis na cultura, sobremaneira em se comparando o controle às duas concentrações mais altas do teste (300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$). O gráfico da figura 8, a seguir, mostra que o extrato bruto de *Synechococcus* sp. é citotóxico às células de mama humana em questão.

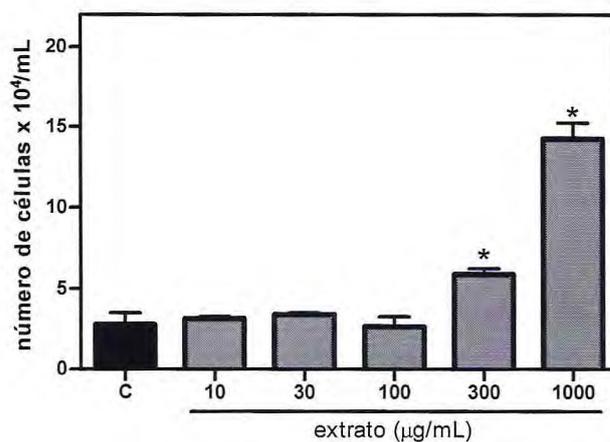


Figura 10. Representação gráfica da contagem de células HB4a não viáveis no ensaio de exclusão por azul de tripan utilizando extrato bruto de *Synechococcus* sp. As médias correspondentes a cada tratamento foram comparadas pó ANOVA seguida por teste de Dunnett * $p < 0,05$.

3.5.3. Análise morfológica

As células foram expostas durante 24h às concentrações de 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de extrato. O controle negativo representa as células não tratadas. As células foram fixadas e coradas e as microfotografias foram obtidas sob aumento de 400x. As células controle apresentavam núcleos volumosos, citoplasma denso e homogêneo e membrana celular contínua, morfologia lhe considerada normal. O tratamento das células com extrato de *Synechococcus* sp. induziu vacuolização do citoplasma a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$, que se

fragmentos de células permeando a lâmina, características morfológicas típicas de células em necrose.

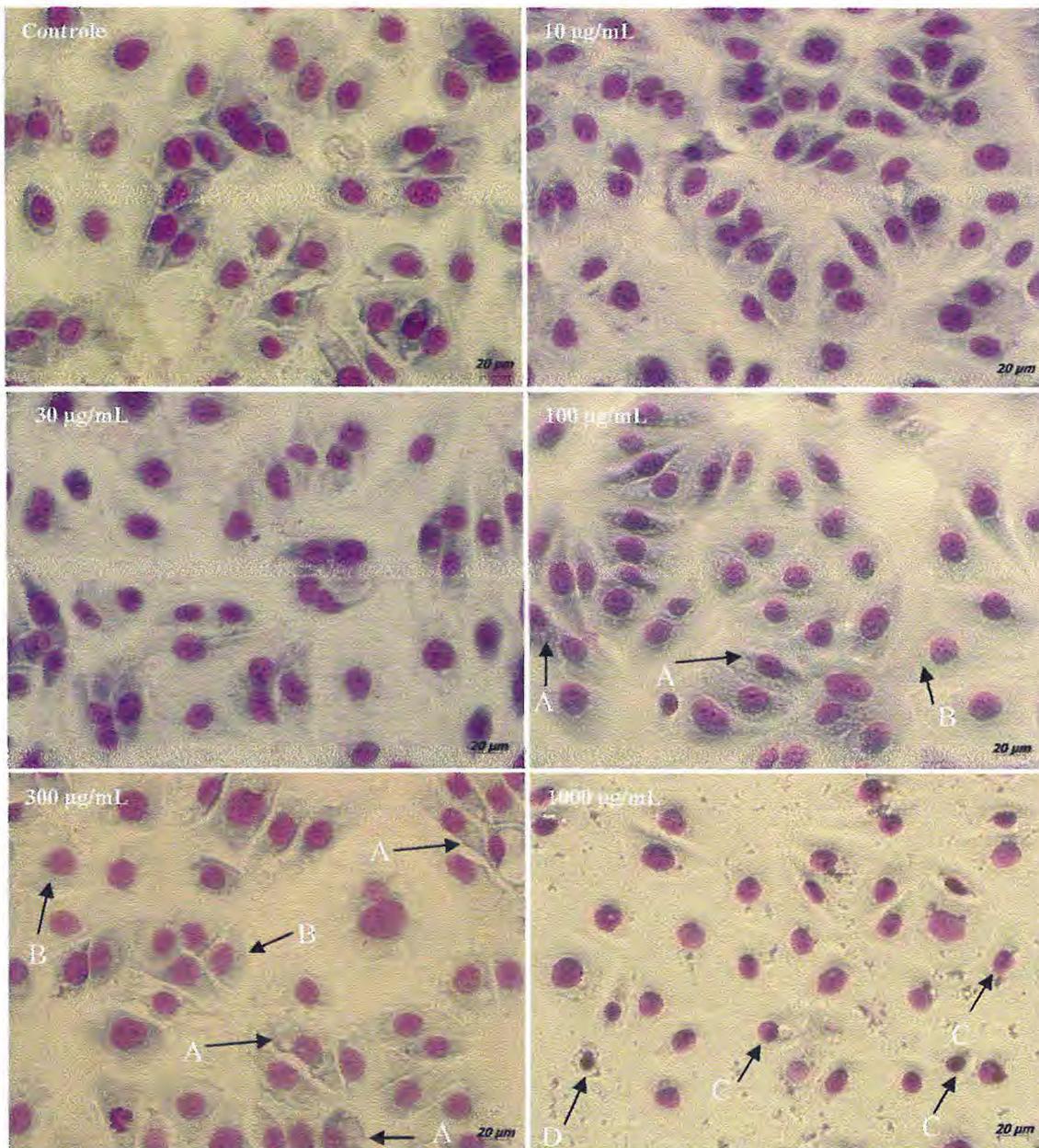


Figura 11. Efeito do extrato bruto de *Synechococcus* sp. sobre a morfologia de células HB4a, observa no aumento de 400x. A- Vacuolização do citoplasma; B- Rareamento do citoplasma; C- Diminuição do volume nuclear; D- Célula necrótica.

4. DISCUSSÃO

Vários autores mostraram que o grupo mais representativo da comunidade fitoplanctônica de viveiros de camarão são as cianobactérias. As cianobactérias foram dominantes em relação aos outros grupos também em viveiros de camarão estudados por Pereira Neto (2006). O autor evidenciou que essa dominância ocorria tanto na escala temporal quanto na escala espacial. Estudos realizados em fazendas de carcinicultura do Ceará e Piauí mostraram altas concentrações dos gêneros *Pseudanabaena*, *Limnotrix* e *Sclippsiella*, que são, inclusive, potenciais produtoras de toxinas .

Castro (2007) em estudos de caracterização do fitoplâncton de fazendas de camarão no Ceará, mostrou que a maior densidade da biomassa ali existente se dava à presença de cianobactérias. Esse estudo também comprovou a toxicidade do extrato orgânico obtido desta comunidade fitoplanctônica em camundongos por via intraperitoneal e ressaltou a indução de danos ao fígado dos animais. Este dado sugere a presença de hepatotoxinas no extrato que podem estar sendo produzidas pelo grande número de cianobactérias presentes nos viveiros analisados.

Campos, *et. al.* (2007) demonstrou que ocorre incremento da quantidade de algas no ecossistema costeiro receptor dos efluentes da carcinicultura. Enquanto isso, Aragão (2006) mostrou, usando o microcrustáceo *Mysidopsis juniae* como modelo experimental, que a toxicidade das comportas de drenagem dos viveiros de camarão eram mais elevadas em relação à água do canal de abastecimento dos mesmos viveiros, evidenciando a toxicidade do efluente gerado pela carcinicultura. Estes estudos reconhecem, pois, que, ainda que se façam necessários estudos complementares sobre esse objeto, tais efluentes podem, em longo prazo, vir a impactar ecologicamente as respectivas regiões circunjacentes.

Além do risco para o meio ambiente, existe também o risco pra própria carcinicultura: Allan, Moriarty e Marguipe (2005) evidenciaram um melhor ganho de peso, biomassa e conversão alimentar em viveiros de cultivo de *Penaeus monodon* que não apresentavam quantidades significativas de cianobactérias. Nunes, *et. al.* (2004), em avaliações realizadas na ocasião dos primeiros relatos do vírus da mionecrose idiopática (IMNV), observou correlação entre o número de cianobactérias e a intensidade de mortalidade nos viveiros, e mostrou que a presença de cianobactérias deprime a resistência dos camarões, deixando-os mais vulneráveis às patologias.

O presente estudo avaliou a toxicidade de uma cepa de *Synechococcus* sp. obtida de um viveiro de camarão em dois modelos e amplamente utilizados e padronizados para análises de ecotoxicologia. Comparando-se a sensibilidade dos dois organismos, *Artemia* sp. e *Mysisdopsis juniae*, à co-incubação com células vivas de *Synechococcus* sp., pode ser visto que os misidáceos se mostraram consideravelmente mais sensíveis, considerando que o parâmetro ponderado em ambos os modelos é a morte.

Os resultados obtidos no modelo em misidáceos, contudo, não mostram absoluta uniformidade quanto ao valor das CL_{50} , tendo sido observado uma variação de 113.739 céls/mL a 5.624.081 céls/mL entre os 7 testes realizados. Vale ressaltar que o valor de maior discrepância de CL_{50} encontrado (5.624.081 céls/mL, no teste 5) foi também acompanhado do maior valor de TRIM, o que pode refletir no alto valor de CL_{50} .

De todo modo, os fatores que influenciam a produção de cianotoxinas são complexos e pouco compreendidos. Sabe-se que entre os fatores que influenciam a produção de toxina são os estímulos ambientais como pH do meio, radiação solar e saturação de oxigênio (DUY *et al.*, 2000).

Entre os parâmetros físico-químicos aqui avaliados (pH, salinidade e oxigênio dissolvido) apenas o OD apresentou níveis de variação consideráveis, em algumas ocasiões (anexo 3). Enquanto que, pelos dados coletados nos diferentes testes, é possível perceber que o número de organismos mortos (anexo 4) é elevado quando o OD é baixo, mas nem sempre o alto número de mortes está acompanhado de baixo OD, como por exemplo nos testes 2 e 4. Ambos os testes apresentaram elevado número de indivíduos mortos enquanto que os valores de OD tiveram pouca variação.

Por outro lado, os testes 3 e 6, que também tiveram CL_{50} baixas e nesta mesma faixa, de 502.974 céls/mL e 113.739 céls/mL, respectivamente, apresentaram expressivas variações de OD, chegando a cair abaixo do limite mínimo requerido para o teste. Entre os testes que apresentaram CL_{50} mais altas, houve pouca variação nos valores de OD para os testes 1 e 5, e, para o teste 7, a variação de OD foi considerável apenas para as duas concentrações mais altas de células de *Synechococcus* sp. De fato, pode ser constatado ainda, que, nas ocasiões em que há largas variações de OD, ou seja, uma diminuição drástica deste parâmetro ao final do teste, isto ocorre quanto mais alta for a concentração de células no meio. Entretanto, todos os testes foram realizados com a mesma faixa de concentração de células, e tiveram testes em que não houve queda de OD.

Deste modo, não é possível desconsiderar a participação que baixos índices de OD possam contribuir para a mortalidade dos misidáceos, mas é essencial ressaltar a toxicidade do extrato de *Synechococcus* sp. para os organismos-teste. A flutuação dos valores de CL_{50} entre os 7 testes pode ser melhor atribuída a fase de crescimento da cultura (WATANABE E OISHI, 1985) ou a competição por nutrientes (SIQUEIRA E OLIVEIRA-FILHO, 2008), fatores que estão intrinsecamente relacionados à produção de cianotoxinas .

Com relação aos testes realizados com *Artemia* sp., estas não se mostraram sensíveis à concentrações de células vivas de *Synechococcus* sp., nem mesmo em concentrações até 3 vezes maiores que a maior concentração usada no ensaio com misidáceos. As artêmias são usadas com frequência e com sucesso para avaliar a toxicidade de diversos tipos de substâncias químicas ou monitorar a atividade biológica em extratos orgânicos. No entanto, para avaliações de natureza ecotoxicológica, as artêmias são, até certo ponto, consideradas como um modelo pouco sensível, e podem omitir a toxicidade de algumas amostras. Guerra (2001) mostrou que artemia foi mais resistente na avaliação de efluente industrial rico em fenóis em relação a experimentos realizados com *Daphnia magna*, *Brachionus plicatilis*, *Vibrio fisheri*. Por outro lado, é importante mencionar que as artêmias mostram-se sensíveis, e, assim, um modelo válido para o estudo de diversos compostos e efluentes industriais, devido às altas quantidades de compostos fenólicos ali contidos. Pimentel (2006) comprovou a toxicidade do efluente da indústria de castanha de caju para artêmias e julgou adequada a sua utilização para avaliação desse efluente. Arthaud (2005) mostrou eficiência do modelo para o monitoramento do tratamento de águas residuárias de uma refinaria de petróleo, efluente esse também rico em compostos fenólicos.

Os indivíduos de *Artemia* sp. também foram pouco sensíveis à exposição ao extrato metanólico bruto obtido a partir de células de *Synechococcus* sp., quando foi observado morte apenas nas duas concentrações mais altas, no teste 1, e na concentração mais alta no teste 2. Assim, na faixa de concentrações testadas, não foi possível determinar a concentração letal para 50% de indivíduos. De acordo com os cálculos do rendimento do extrato (tabela 6) pode se concluir que a maior concentração do extrato testado com artemia (10mg/ml) corresponderia a uma concentração celular média de 2.6×10^6 , mostrando a eficiência da liberação de toxina pelo procedimento utilizado para obtenção do extrato, já que foi utilizado uma concentração superior a $7,3 \times 10^7$ células/mL nos experimentos com células vivas.

Experimentos realizados por Martins *et al.* (2007) com várias cepas pertencentes aos gêneros *Synechococcus* e *Synechocystis* isoladas da costa de Portugal, mostraram que o extrato orgânico de algumas dessas cepas apresentaram-se tóxicas em alguns modelos de invertebrados marinhos usados para análises ecotoxicológicas, como ouriço do mar, bivalve e artêmia. Nos ensaios com artêmia, os autores verificaram que 100% dos indivíduos morriam após exposição de 24h a 100mg/mL do extrato bruto derivado de 4 entre as 6 cepas de *Synechococcus* sp. testadas. Os extratos metanólicos de cada cepa também foram avaliados nestes mesmo parâmetros e também induziram 100% de mortalidade após 24h de exposição à 100mg/mL. É relevante ressaltar que, apesar do menor tempo de exposição considerado nesse trabalho, a concentração (única) testada foi dez vezes maior do que a maior concentração de extrato usada no presente estudo.

Amorim (1994) verificou a sensibilidade de artemia a diversas cepas de cianobactérias. Campbell *et al.* (1994) também verificaram a relação entre mortalidade de artêmia e a quantidade de microcistina em frações de extratos de *Microcystis*.

É importante ressaltar que por mais que o extrato da cepa de *Synechococcus* sp. aqui estudado não tenha mostrado letalidade expressiva para a artêmia, não se pode descartar um possível efeito crônico que possa vir a interferir em alguma fase no seu ciclo de vida. A toxicidade crônica é causada sob condições de exposições prolongadas a concentrações subletais e que podem causar dano em alguma das funções biológicas do organismos (COSTA *et al.*, 2008).

Pelos dados do presente estudo, vale sugerir que os misidáceos são um modelo mais adequado para monitoramento de corpos d'água com riscos de superfloração de cianobactérias onde se busca resposta de letalidade em bioensaios de curta duração. Além dos resultados aqui apresentados, Aragão (2006) recorreu a este modelo e teve sucesso em diferenciar a toxicidade entre água de drenagem e a de abastecimento de viveiros de camarão, onde também foi detectada um grande número de cianobactérias nestas amostras.

Os autores Engström-Öst *et al.*, (2002) verificaram a bioacumulação e transferência de cianotoxina produzida por cianobactérias do gênero *Nodularia* em misidáceo, evidenciando o risco de as cianotoxinas alcançarem outros níveis tróficos. Ferrão-Filho; Azevedo e Molica (2009) afirmou que o zooplâncton é a principal rota de bioacumulação de cianotoxina, enquanto que o estudo realizado por Chorus e Bartram (1999) mostrou a bioacumulação de cianotoxina em salmão e em larvas de caranguejo. A

transferência de cianotoxinas entre os níveis tróficos pode atingir níveis superiores, chegando até aos humanos e tornando-se num risco também de saúde pública.

Em relação aos testes de citotoxicidade, o extrato mostrou-se tóxico para a membrana de eritrócitos de camundongos *Mus musculus* Swiss, o que nos permite evidenciar a presença de propriedade hemolítica do extrato bruto de *Synechococcus* sp. Na maior concentração, o extrato induziu 100% de efeito hemolítico para incubação por 1, 2 ou 4h. As respectivas curvas e CE_{50} apresentaram pouca variação entre si, mas mostraram um ligeiro incremento na toxicidade do extrato com o aumento do tempo de exposição. O tratamento de células HB4a (mama humana normal) por 24h com 300 ou 1000 μ g/ml do extrato de *Synechococcus* sp. aumentou significativamente o número de células não-viáveis em suspensão na cultura, já que as células vivas permanecem aderidas. A contagem das células mortas foi realizada pelo método da exclusão por azul de tripan, que vai marcar as células baseado justamente na integridade das suas membranas, e o resultado deste ensaio corrobora os achados daquele onde foi avaliada a atividade hemolítica do extrato.

Como a contagem foi realizada apenas entre as células em suspensão que, nesse caso, não mais estão viáveis, não é possível estimar quanto ao efeito citostático do extrato sobre a cultura de células, ou seja, o de simplesmente protelar o crescimento celular, sem, necessariamente, considerar, a indução de morte celular. Entretanto, o efeito citotóxico, aquele que induz, efetivamente, a morte das células, está claramente evidenciado nas concentrações maiores, o que é mostrado qualitativamente pela observação da cultura *in vitro*, e quantitativamente, pela contagem das células em suspensão.

A observação das células HB4a tratadas, fixadas e coradas permite a identificação de diversas alterações, quando comparadas às células não-tratadas. A vacuolização do citoplasma das células submetidas à exposição ao extrato de *Synechococcus* sp. foi observado a partir da concentração 100 μ g/ml. Essa característica é intensificada com o aumento da concentração até, enfim, rarear consideravelmente o conteúdo citoplasmático das células tratadas com 1000 μ g/ml. Também, enquanto as células tratadas a 300 μ g/ml apresentam expressivo aumento de volume, comparando-se ao controle, as células tratadas com 1000 μ g/ml apresentaram redução de seu volume. Junto a isso, as células tratadas não apresentam condensação e fragmentação nuclear nem formação de *blebs* (vesículas bolhosas) de membrana. Tomando-se estas evidências em conjunto, pode-se sugerir que estas células estejam em estágio inicial e final do processo de necrose, respectivamente, e a morte celular foi confirmada pelo aumento significativo das células mortas em ambas as concentrações.

Vale destacar que a exposição das células HB4a a 100µg/ml do extrato de *Synechococcus* sp. durante 24h induz vacuolização do citoplasma, sem aumentar a contagem de células mortas, em relação ao controle, nem comprometer a aparência da cultura *in vitro*. É importante considerar, pois, que concentrações sub-letais de cianotoxina podem também ser prejudiciais.

Andrade (2007) avaliou o efeito da microcistina em células Vero originadas de rim de macaco verde africano que, por sua vez, apresentaram condensação e fragmentação da cromatina e formação de *blebs* de membrana, além de outras alterações celulares compatíveis com apoptose. Teneva *et al.*, (2005) compararam os efeitos de microcistina e anatoxina sobre linfócitos B e T de camundongos e observaram que, enquanto microcistina induziu apoptose em células B, as células T permaneceram ilesas. Por outro lado, a toxicidade provocada por anatoxina, ainda mais expressiva que aquela da microcistina, não pode ser relacionada com indução de apoptose celular. Este trabalho também mostrou como as cianotoxinas podem provocar alterações em tecidos diferentes daqueles que representam seu alvos principais.

Um estudo realizado por Gásci *et al.*, (2009) comparou os efeitos de microcistina e cilindrospermopsina em células CHO, oriundas de ovário de hamster chinês. Microcistina induziu efeitos compatíveis com apoptose celular, mas não apresentou indício de necrose. Cilindrospermopsina, por outro lado, em concentrações mais baixas e por um curto intervalo de exposição (até 12h), foi capaz de induzir apoptose, mas, por períodos de exposição mais longos (24 a 48h), foram observadas características de necrose.

Fessard e Bernard (2003) testaram o efeito de concentrações baixas de cilindrospermopsina sobre células CHO e avaliaram o dano genotóxico pelo teste do cometa alcalino. O estudo não detectou danos ao DNA, entretanto foram observadas toxicidade e alterações morfológicas das células, mas que não puderam ser conectadas com o processo de apoptose. Lankoff *et al.* (2007) também não observaram dano ao DNA de células CHO induzido por cilindrospermopsina nem pelos produtos de seu metabolismo. Entretanto, esse estudo revelou que o tratamento com essa cianotoxina diminuiu a proliferação celular e aumentou o aparecimento de células necróticas, independentemente de metabolização, e de modo concentração e tempo-dependentes.

É importante ressaltar que não é só a exposição aguda a doses letais de cianotoxinas que podem trazer risco à saúde humana e acarretar problemas de saúde pública como o ocorrido em uma clínica de hemodiálise em Caruaru/PE onde morreram 52 de 100 pacientes expostos a água contaminada por cianobactérias (AZEVEDO *et al.* 2002), mas a

REFERÊNCIAS

- ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. **Perfil das exportações de camarão cultivado**. 2003 Disponível em: < <http://www.abccam.com.br> > Acesso em: 5 mai 2010
- ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. **Perfil das exportações de camarão por estado (jan-jun) d2007-2009**, 2009. Disponível em: < <http://www.abccam.com.br/> > Acesso em: 5 mai 2010
- ALLAN, G. L.; MORIARTY, D.J.W; MARGUIRE, G.B. Effect of pond preparation and feeding rate na production og *Penaeus monodon* Fabricius water quality bactéria and benthos in model farming ponds. **Aquaculture**. v. 130. p 329-349. ,2005
- AMORIM, A. **Optimização de bioensaios para a avaliação da toxicidade de cianobactérias**. Relatório de Estágio do 5º ano do Curso de Biologia. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Ramo de Especialização Científico-Tecnológico em Ecologia e Recursos Zoológicos, Porto, 1994
- ANDRADE, M. S. B. **Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultrastrururais de microcistina em células VERO**. Dissertação de mestrado.Universidade do Porto PORTO-PT, 2007.
- ARAGÃO, J.S. **Toxicidade do efluente de uma fazenda de cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* e do metabissulfito de sódio em juvenis de *Mysidopsis juniae***. dissertação de mestrado. (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, 2006.
- ARTHAUD, I. D. B. **Redução de toxicidade do efluente de uma refinaria de petróleo, empregando reatores biológicos aeróbicos, de leito fixo e fluxo contínuo ascendente, inoculados com *Aspergillus niger***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração – Saneamento Ambiental). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2005.
- AZEVEDO, F. A. e CHASIN, A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos, RiMa. São Paulo, Intertox. 340p. 2003
- AZEVEDO, S. M. F. O; , CARMICHAEL W. W.; JOCHIMSEN E. M; RINEHART, K. L. ; LAU S.; SHAW G. R.; EAGLESHAM G. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. **Toxicology** v.181_182 p. 441_446, 2002
- AZEVEDO, S.M.F.O. 1998. Toxinas de Cianobactérias: Causas e conseqüências para a saúde pública. **Med on line**, Rio de Janeiro, v. 01, p. 1 – 16, setembro de 1998. Disponível em : < http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm > Acesso em: 5 Fev. 2010.
- BRIAND, J-F.; JACQUET, S.; BERNARD, C. & HUMBERT, J.F. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. **Veterinary Research**. V. 34, p.361-377, 2003.
- CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos, RiMa, 2006 118p.

CAMPBELL, L. A.; LAWTON, K. A.; BEATTIE e COOD, G. A. Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and Microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR containing) cyanobacteria. **Environ. Toxicol.** v. 9 .p. 71–7, 1994.

CAMPOS, A. A. B.. MAIA, E. P., COSTA, W.M., BRITO, L.O., Olivera, A. Descrição dos principais grupos fitoplanctônico do afluente e efluente em fazenda de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* com sistema de recirculação parcial de água. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v.33. P. 113 - 119, 2007.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacterial. **Scientific American**. V. 270 p. 64-68. 1994.

CARMICHAEL, W. W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.S; MOLICA, R J. R.; JOCHIMSEN, E M. e LAU, S. Human fatalities from cyanocabteria: chemical and biological evidence for cyanotoxin. **Environmental Health Perspectives**. V.109 (7). P. 663-668, 2001.

CASTRO, C.B. **Análise da comunidade fitoplanctônica coletada em fazendas de cultivo de camarão utilizando bioensaios**. 2007. Monografia. (Bacharel em Ciências Biológicas) Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 2007.

CETESB –COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. 1992. ÁGUA DO MAR – TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM *Mysidopsis juniae* Silva1979(Crustacea-Mysidacea). Norma Técnica L5.251. São Paulo, CETESB,p.19.

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

CODD, G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. **Ecological Engineering**, v. 16 p.51-60. 2000.

COSTA, C. R.; OLIVI P.; BOTTA, C. M. R.; ESPÍNDOLA E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Revista Quim. Nova**, Vol. 31, No. 7, 1820-1830, 2008.

DEVLIN, J.P.; EDWARDS, O; E.; GORHAM, P. R.; HUNTER, N. R.; PIKE, R. K.; STAVRIC, B. Anatoxina, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44hl. **Can J. chem.**, v.55. p.1367-1371.1977.

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). **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 65 p. 201–208. 2006

DI BERNARDO, L. Algas e suas influências na qualidade das águas e nas tecnologias de tratamento. **ABES**, São Paulo, 1995

DUY, T.N, LAM, P.K.S, SHAW, G.R. \$ CONNELLD.W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue green algal) toxins in water. **Review of environmental contamination and toxicology** v.163. p.113-186. 2000.

ELER, M.N.; ESPÍNDOLA, E.L.; ESPÍNDOLA, E.A. Avaliação sócio-econômica dos empreendimentos de pesquepague. In: **Avaliação dos impactos de pesque-pague: Uma análise da atividade na bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu**. Eler, M.N. Espíndola (org.). São Carlos: Rima. p. 31-75. 2006

EMBRAPA. Questões Ambientais da Carcinicultura de Águas Interiores: o Caso da Bacia do Baixo Jaguaribe, CE Documentos 96, 2005

ENGSTRÖM-ÖST, J.; LEHTINIEMIA, M.; GREEND, S.; KOZLOWSKY-SUZUKID, B.; VIITASALO, M. Does cyanobacterial toxin accumulate in mysid shrimps and fish via copepods? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 276 p. 95– 107. 2002.

ESTEVEZ, F. de A. 1950. **Fundamentos de limnologia**. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 602 p.

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

FERNADES, V. O.; CAVATI, B.; OLIVEIRA, L. B.; SOUZA, B. D. Ecologia de cianobactérias: Fatores promotores e concenquência das florações. **Oecol. Bras.**, v.13(2) p. 247-258. 2009

FESSARD, V.; BERNARD, C. Cell alterations but no DNA strand breaks induced in vitro by cylindrospermopsin in CHO K1 cells. **Environ Toxicol.** v.18(5): p.353-359. 2003

FERRÃO-FILHO, A. S.; ; MOLICA, R. e AZEVEDO, S. M. F. O. Ecologia, Ecofisiologia Toxicologia de Cianobactérias. **Revista Oecologia Brasiliensis**. V.13(2): p. 225-228. 2009a.

FERRÃO FILHO, A.S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos V.13 (2): p. 273-312, 2009 b.

FIGUEIREDO, M. C.; ROSA, M. F. ; GONDIM, R. S. Sustentabilidade ambiental da carcinicultura no Brasil: desafios para a pesquisa. **Revista Econômica do Nordeste**. v.34. 2003.

FREEMAN, K.. Psychic networks: training computers to predict algal blooms. **Environmental Health Perspectives**, 108: 465-467. 2000

FUNASA. Fundação Nacional da Saúde. *Portaria nº 518*, 25 de março de 2004. Ministério da Saúde, Brasil. 2004

GÁCSI, M.; ANTA, O.; VASAS, G.; MÁTHÉ, C.; BORBÉLY, G.; SAKER, M. L.; GYÖRI, J. FARKAS, A.; VEHOYSZKY, A. BÁNFALYI. Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. **Toxicology in vitro** v. 23. p. 710-718. 2009.

GUERRA, R Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. **Chemosphere**. N44 p. 1737 -1747. 2001

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Technological**, v. 12. p. 471, 1977.

IBAMA. **Diagnóstico da Carcinicultura no Estado do Ceará**. Relatório Final. DIPRO/CGZAM e GEREX-CE, vol. I. Abril de 2005.

JÖHNK, K.D.; HUISMAN, J.; SHARPLES, J.; SOMMEIJER, B.; VISSER, P.M. & STROOM, J.M. Summer heatwaves promote *blooms* of harmful cyanobacteria. **Global Change Biology**, 14: 495-512. . 2008

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; An, J.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, B.C.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S. T.; AZEVEDO, S.M.F.O. e JARVIS, W.R.. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 338 p.873-878. 1998

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** v.48 p.995–1001. 2006

LANKOFF, A.; WOICIK, A.; LISOWSKA, H.; BIALCZYK, .; DZIGA, D. ARMICHAEL, W. W. No induction of structural chromosomal aberrations in cylindrospermopsin-treated CHO-K1 cells without and with metabolic activation. **Toxicon** v.15;50(8) p.1105-1115.. 2007.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas**-princípios e aplicações. São Carlos: RiMa. 2006

MACKINNON, J. & MACKINNON, K. Review of the protected areas system of the Indo-Malayan realm. Gland, Switzerland, World Conservation Union (IUCN) *in* FAO & Wetlands International, 2006.

MARSHALL, P. N., BENTLEY, S. A., LEWIS, S. M. Staining properties and stability of a standardised Romanowsky stain" **J Clin Pathol** v.31 p.280–282. 1978.

MARTINS, R.; Fernandez, N. , Beira, R.; Vasconcelos, V. Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine *Synechocystis* and *Synechococcus* cyanobacterial strains in marine invertebrates. **Toxicon**. v. 50. p. 791–799. 2007.

MOLICA, R.J.R.,. **Efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de microcistinas em duas cepas de *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin (Cyanophyceae)**. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós -Graduação em Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 88p. 1996

MOSS, B. *Ecology of Fresh Waters*. Blackwell, Oxford, 417 pp. 1988

MUNDAY, B.; ELEFThERIOU, A.; KENTOURI, M.. The interactions of aquaculture and the environment. A bibliographical review. **The commission of european communities directorate general for fisheries**. Greece. p 183. 1992.

NICKLISCH, A.; SHATWELL, T. & KÖLLER, J.. Analysis and modeling of the interactive effects of temperature and light on phytoplankton growth and relevance for the spring bloom. **Journal of Plankton Research**, v.30(1) p.75-91. 2008

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

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*). **B. Inst. Pesca.** v.34(4) p. 543 - 551, 2008

PIMENTEL, M. F. **Caracterização ecotoxicológica dos efluentes da indústria de beneficiamento de castanha de caju.** Monografia. (Bacharel em Ciências Biológicas) Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 2006

POERSCH, L.; CAVALLI, R. O.; JÚNIOR-WESIELESKY, W.; CASTELLO, J.P.; PEIXOTO, S.R.M. Perspectiva para o desenvolvimento dos cultivos de camarões marinhos no estuário na lagoa de patos, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria. V.36 n. 4, 2006.

ROCHA, I.P. Panorama da carcinicultura brasileira em 2007. Desempenho, desafios e Oportunidades. **Panorama da Aqüicultura**, v.17, n. 104, p. 26-31, 2007.

SILVA, R.C. **Acúmulo e depuração de Cilindrospermopsina (cianotoxina) e seu efeito no crescimento em tilápias juvenis (*Oreochromis niloticus*).** Dissertação de Mestrado, IBCCF-CCS – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 89p. 2008.

SIQUEIRA, D. e OLIVEIRA-FILHO, E. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. **Universitas Ciências da saúde pública.** v. 03(1). p. 109-127. Abril, 2008.

SIVONEM, K. e JONES, G. Cyanotoxin. In: Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health. Consequence, monitoring and management **Edited by** (CHORUS, I. & BARTRAM, J), E & FN spon, 1999.

SCHOPF, J.W.; KUDRYAVTSEV, A. B.; CZAJA, A. D.; TRIPATHI, A. B. Evidence of Archean life: Stromatolites and microfossils. **Precambrian Research** v.158 p.141–155(2007)

TEVENA, I.; MLADENOV, R.; POPOV, N.; DZHAMBASOV, B. Cytotoxicity and apoptotic effects of microcystin-LR and anatoxin-a in mouse lymphocytes. **Folia Biologica (Praha).** v.51(3) p.62-7. 2005

TERCALLA, F., DIETRICH, D., SCHLATTER, C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxins to yearling rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.** V.30 p. 215–224. 1994.

THOSTRUP, L., CHRISTOFFERSEN, K. Accumulation of microcystinin *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis*. **Arch. Hydrobiol.** V. 145. p.447–467. 1999.

UTHERMÖHL, H. On the perfecting of quantitative phytoplankton method. **Int. Ass. Theor. Appl. Limnol. Commun.** v.9. 1958

VASCONCELOS, V.M. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mitilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v.32 p. 227-237. 1995.

VEIGA, L. F.; VITAL, N.; Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: **Métodos em Ecotoxicologia Marinha.** São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda., p. 111-122, 2002.

WATANABE, M. F. e OISHI, S. Effects of environmental factors on toxicology of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. **Applied and environmental microbiology**. v.40 (5).p. 1342-1344, 1985.

WAINGERG, A. A E CAMARA, M. R. Carcinicultura no litoral oriental do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Interações ambientais e alternativas mitigadoras. In **AQUACULTURA BRASIL'98** .Anais.Recife: persona .v.2 p.527-544. 1998.

WIWGAND, C., PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** V.203 (3) p.201–218. 2005.

WILLIAMS, D.E., CRAIG, M., DAWE, S.C., KENT, M.L., ANDERSEN, R.J., HOLMES, C.F.B. ¹⁴C-labeled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. **Toxicon** v.35 p.985– 989. 1997.

ANEXOS

Anexo 1. Meio de cultura ASN III utilizado para o cultivo da cianobactéria *Synechococcus* sp.

| Composto | Fórmula molecular | Quantidade (g) |
|------------------------------|---|-----------------------|
| Cloreto de sódio | NaCl | 25 |
| Sulfato de magnésio | MgSO ₄ .7H ₂ O | 3,5 |
| Nitrato de sódio | MgC ₁₂ .6H ₂ O | 2,0 |
| Fosfato dibásico de potássio | NaNO ₃ | 0,75 |
| Cloreto de magnésio | (K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 0,75 |
| Cloreto de cálcio | CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,5 |
| Cloreto de potássio | KCl | 0,5 |
| Carbonato de sódio | NaCO ₃ | 0,03 |
| Ácido cítrico | C ₆ H ₈ O ₇ | 0,003 |
| Citrato férrico amoniacal | | 0,003 |
| EDTA | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ | 0,0005 |
| Glicina* | C ₂ H ₅ NO ₂ | 10 mL |

*Solução de glicina a 0,08 mg/mL em dH₂O

Anexo 2. Composição da solução de elementos traços utilizados para suplementar o meio de cultura ANS III, para 1L de água destilada

| Composto | Fórmula molecular | Quantidade (g) |
|---------------------|--|-----------------------|
| Ácido bórico | H ₃ BO ₃ | 2,86 |
| Cloreto de manganês | MnCl ₂ .4H ₂ O | 1,81 |
| Sulfato de zinco | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,222 |
| Molibdato de sódio | NaMoO ₄ .2H ₂ O | 0,39 |
| Sulfato cúprico | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,079 |
| Nitrato de cobalto | Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | 0,049 |

Anexo 3. Valores e variação dos parâmetros físico-químicos no início e no final de cada teste com *Mysidopsis juniae*

| Teste 1 | | | | | | | | | |
|------------------|--------|------|------|------|------|------|----------|-------|------|
| [] em Cel/mL | Início | | | Fim | | | Variação | | |
| | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. |
| C0 | 8,04 | 6,35 | 36 | 8,04 | 5,86 | 37 | - | -0,48 | 1 |
| C1 | 8,23 | 6,36 | 36 | 7,96 | 5,97 | 37 | -0,27 | -0,39 | 1 |
| C2 | 8,28 | 6,40 | 36 | 8,04 | 5,99 | 37 | -0,24 | -0,41 | 1 |
| C3 | 8,41 | 6,27 | 36 | 8,03 | 5,69 | 35 | -0,38 | -0,58 | 1 |
| C4 | 8,36 | 6,31 | 36 | 8,02 | 5,50 | 37 | -0,34 | -0,81 | 1 |

| Teste 2 | | | | | | | | | |
|------------------|--------|------|------|------|------|------|----------|-------|------|
| [] em Cel/mL | Início | | | Fim | | | Variação | | |
| | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. |
| C0 | 7,79 | 6,24 | 36 | 7,91 | 5,93 | 37 | 0,12 | -0,31 | 1 |
| C1 | 7,72 | 6,22 | 37 | 7,86 | 5,55 | 37 | 0,14 | -0,67 | - |
| C2 | 7,73 | 6,23 | 37 | 7,73 | 4,34 | 37 | - | -1,89 | - |
| C3 | 7,77 | 6,16 | 37 | 7,57 | 3,00 | 36 | -0,2 | -3,16 | 1 |
| C4 | 7,87 | 6,26 | 37 | 7,92 | 5,82 | 37 | 0,05 | -0,44 | - |
| C5 | 7,97 | 6,35 | 37 | 7,96 | 5,69 | 37 | -0,001 | -0,66 | - |
| C6 | 8,10 | 6,85 | 35 | 8,00 | 6,06 | 36 | -0,1 | -0,79 | 1 |

| Teste 3 | | | | | | | | | |
|------------------|--------|------|------|------|------|------|----------|-------|------|
| [] em Cel/mL | Início | | | Fim | | | Variação | | |
| | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. |
| C0 | 7,79 | 6,64 | 35 | 7,80 | 6,04 | 36 | 0,01 | -0,60 | 1 |
| C1 | 7,78 | 6,66 | 36 | 7,81 | 5,42 | 37 | 0,03 | -1,24 | 1 |
| C2 | 7,93 | 6,28 | 36 | 7,74 | 5,41 | 36 | -0,19 | -0,87 | - |
| C3 | 7,96 | 6,25 | 36 | 7,57 | 3,64 | 36 | -0,39 | -2,61 | - |
| C4 | 8,01 | 6,38 | 36 | 7,43 | 1,49 | 36 | -0,58 | -5,72 | - |
| C5 | 8,09 | 6,53 | 36 | 7,37 | 0,66 | 36 | -0,72 | -5,87 | - |
| C6 | 8,13 | 6,62 | 35 | 7,33 | 0,86 | 37 | -0,8 | -5,76 | 2 |

| Teste 4 | | | | | | | | | |
|------------------|--------|------|------|------|------|------|----------|-------|------|
| [] em Cel/mL | Início | | | Fim | | | Variação | | |
| | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. |
| C0 | 8,09 | 5,88 | 36 | 7,90 | 4,81 | 37 | -0,19 | -1,07 | 1 |
| C1 | 8,24 | 6,27 | 36 | 7,85 | 4,52 | 37 | -0,39 | -1,75 | 1 |
| C2 | 8,28 | 6,24 | 36 | 7,99 | 5,09 | 37 | -0,29 | -1,15 | 1 |
| C3 | 8,27 | 6,18 | 36 | 7,98 | 5,10 | 37 | -0,29 | -1,08 | 1 |
| C4 | 8,29 | 6,67 | 36 | 8,00 | 5,14 | 37 | -0,29 | -1,53 | 1 |

| | | | | | | | | | |
|----|------|------|----|------|------|----|-------|-------|---|
| C5 | 8,30 | 6,70 | 36 | 8,06 | 5,56 | 37 | -0,24 | -1,14 | 1 |
| C6 | 8,39 | 6,78 | 36 | 8,01 | 5,23 | 37 | -0,38 | -1,55 | 1 |

Teste 5

| [] em Cel/mL | Início | | | Fim | | | Variação | | |
|------------------|--------|------|------|------|------|------|----------|-------|------|
| | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. |
| C0 | 8,01 | 6,22 | 36 | 8,27 | 5,29 | 35 | 0,26 | -0,93 | 1 |
| C1 | 7,99 | 6,38 | 36 | 8,25 | 5,16 | 35 | 0,26 | -1,22 | 1 |
| C2 | 8,03 | 6,45 | 36 | 8,24 | 5,66 | 36 | 0,21 | -0,79 | - |
| C3 | 8,03 | 6,41 | 36 | 8,11 | 5,56 | 35 | 0,080 | -0,85 | 1 |
| C4 | 8,07 | 6,47 | 36 | 8,03 | 5,35 | 35 | -0,04 | -1,12 | 1 |
| C5 | 8,13 | 6,52 | 36 | 8,04 | 5,21 | 36 | -0,09 | -1,31 | 1 |
| C6 | 8,21 | 6,53 | 36 | 8,06 | 4,63 | 36 | -0,15 | -1,90 | 1 |

Teste 6

| [] em Cel/mL | Início | | | Fim | | | Variação | | |
|------------------|--------|------|------|------|------|------|----------|-------|------|
| | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. |
| C0 | 8,05 | 6,51 | 36 | 7,91 | 5,82 | 35 | -0,14 | -0,69 | 1 |
| C1 | 8,10 | 6,75 | 36 | 7,86 | 5,49 | 35 | -0,19 | -1,26 | 1 |
| C2 | 8,08 | 6,73 | 36 | 7,84 | 5,46 | 36 | -0,24 | -2,6 | - |
| C3 | 8,09 | 6,72 | 36 | 7,65 | 4,12 | 36 | -0,44 | -2,78 | - |
| C4 | 8,11 | 6,81 | 36 | 7,79 | 1,92 | 35 | -0,32 | -4,89 | 1 |
| C5 | 8,12 | 6,84 | 36 | 7,61 | 4,06 | 35 | -0,51 | -2,78 | 1 |
| C6 | 8,14 | 6,83 | 36 | 7,45 | 0,43 | 37 | -0,69 | -6,40 | 1 |

Teste 7

| [] em Cel/mL | Início | | | Fim | | | Variação | | |
|------------------|--------|------|------|------|------|------|----------|-------|------|
| | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. | pH | OD | Sal. |
| C0 | 7,94 | 5,04 | 36 | 7,76 | 6,34 | 39 | -0,18 | 1,3 | 3 |
| C1 | 7,95 | 5,37 | 36 | 7,57 | 6,00 | 37 | -0,38 | 0,36 | 1 |
| C2 | 7,96 | 5,89 | 36 | 7,66 | 5,31 | 36 | -0,3 | -0,58 | - |
| C3 | 7,95 | 5,34 | 36 | 7,65 | 4,96 | 38 | -0,35 | -0,41 | 2 |
| C4 | 7,99 | 5,38 | 36 | 7,60 | 4,64 | 37 | -0,39 | -0,71 | 1 |
| C5 | 8,00 | 5,57 | 36 | 7,45 | 2,56 | 36 | -0,55 | -3,01 | - |
| C6 | 8,02 | 5,65 | 36 | 7,41 | 2,15 | 37 | -0,61 | -3,50 | 1 |

Anexo 4. Número de *Mysidopsis juniae* mortos por réplicas nos experimentos de célula viva de *Synechococcus*

| [C] | Teste1 | | Teste2 | | Teste3 | | Teste4 | | Teste5 | | Teste6 | | Teste7 | |
|----------------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|
| | Nº de mortes por réplica | Σ mortos | Nº de mortes por réplica | Σ mortos | Nº de mortes por réplica | Σ mortos | Nº de mortes por réplica | Σ mortos | Nº de mortes por réplica | Σ mortos | Nº de mortes por réplica | Σ mortos | Nº de mortes por réplica | Σ mortos |
| C ₀ | - | - | - | 1 | - | 3 | - | 2 | - | 1 | - | - | - | 1 |
| | - | | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | | EXCLUÍDA | | | |
| | EXCLUÍDA | | - | | 2 | | 1 | | - | | 1 | | | |
| C ₁ | - | 1 | 2 | 6 | - | 10 | 1 | 2 | 1 | 9 | - | - | - | 4 |
| | - | | 1 | | - | | - | | 4 | | 1 | | | |
| | 1 | | 3 | | 10 | | 1 | | 4 | | - | | | |
| C ₂ | - | 5 | 1 | 5 | 1 | 2 | 5 | 12 | 2 | 9 | 1 | 5 | 1 | 1 |
| | 2 | | 1 | | - | | 4 | | 2 | | 1 | | | |
| | 3 | | 3 | | 1 | | 3 | | 5 | | 3 | | | |
| C ₃ | - | 9 | 10 | 30 | 10 | 12 | 7 | 19 | 1 | 7 | 1 | 20 | - | 5 |
| | 2 | | 10 | | 2 | | 7 | | 1 | | 9 | | 3 | |
| | 5 | | 10 | | - | | 5 | | 5 | | 10 | | 2 de 11 | |
| C ₄ | 10 | 24 | 6 | 21 | 10 | 30 | 7 | 20 | 4 | 9 | 10 | 30 | 10 | 17 |
| | 5 | | 10 | | 10 | | 6 | | 3 | | 10 | | 6 | |
| | 9 | | 5 | | 10 | | 7 | | 2 | | 10 | | 1 | |
| C ₅ | - | | 10 | 19 | 10 | 30 | 7 | 23 | 1 | 4 | 10 | 20 | 10 | 21 |
| | - | | 5 | | 10 | | 7 | | 1 | | - | | 10 | |
| | - | | 4 | | 10 | | 9 | | 2 | | 10 | | 1 | |
| C ₆ | - | | - | | - | | 8 | 26 | 6 | 17 | 10 | 30 | 10 | 23 |
| | - | | - | | - | | 9 | | 6 | | 10 | | 3 | |
| | - | | - | | - | | 9 | | 5 | | 10 | | 10 | |