

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA FÍSICA,
QUÍMICA E GEOLÓGICA

Estudos sobre a incorporação de Microcistinas de
cianobactérias em carpa prateada –

Hypophthalmichthys molitrix (Valenciennes, 1844)

Sheila Bueno Giordano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Física Química e Geológica como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica.

Orientador Prof. Dr. João Sarkis Yunes

Co-orientador Prof. Dr. Mário Roberto Chim Figueiredo

Rio Grande - Março de 2007

AGRADECIMENTOS

Ao professor João Sarkis Yunes, pelo apoio, amizade, orientação e desenvolvimento desta dissertação.

Ao professor Mário Chim, pelo carinho, ensinamentos e paciência durante a fase experimental deste trabalho.

Aos colegas da Unidade de Pesquisas em Cianobactérias pelo apoio, em especial, aos amigos Gilmar e Wilson. Também ao Alexandre Matthiensen por tantos ensinamentos e idéias.

Aos colegas do Justino, Márcio e Aldemar pela ajuda e companheirismo, pelos chimarrões e tantas conversas no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Larus, especialmente a Caroline Ança, pela amizade e compreensão.

A minha irmã (pipia), meu cunhado Mateus e meus pais João Bosco e Eloina, por estarem presentes em todas as etapas da minha vida, por todo amor e carinho.

Ao Velasquez pela eterna paciência, amor e carinho.

Aos meus familiares e amigos que aqui não foram citados, mas estão sempre presentes na minha memória.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	8
MATERIAL E MÉTODOS	9
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	45

RESUMO

As cianobactérias são organismos autotróficos comuns em diversos tipos de habitats naturais. Quando expostas à águas ricas em nutrientes, temperatura elevada e luz solar, podem formar florações. Essas florações podem afetar a composição química e biológica da água liberando toxinas e diminuindo níveis de oxigênio, provocando a morte de animais. Peixes filtradores são especialmente importantes porque atuam como consumidores do fitoplâncton, como alimento para outros peixes e são potenciais reguladores de florações algais. A carpa prateada é modelo de peixe filtrador, entre outros de água doce e marinha. O trabalho foi realizado utilizando-se carpas oriundas de uma piscicultura, com objetivo de analisar-se a incorporação de microcistinas pelos peixes. Também foi avaliada a relação existente entre o número celular de cianobactérias, concentração de toxinas na água e no músculo dos peixes, relacionando estes valores com os valores aceitáveis para alimentos contaminados com microcistinas, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), expressos através da Tolerância Diária Ingerida (TDI = 0,04 µg de microcistinas / kg / dia). Para isto, os peixes foram colocados em aquários de vidro e tratados com cianobactérias tóxicas e não tóxicas a diferentes números celulares, que variaram de 195.000 a 1.350.000 cél. *Microcystis* / mL. A análise da presença da toxina nos tecidos dos peixes, foi realizada após extração por meio do imunoenensaio específico para microcistinas – ELISA. Os experimentos indicaram valores de toxinas no músculo do peixe entre 0 e 0,015 µg / g de peso seco do músculo. A variação das concentrações de toxinas encontradas no músculo não foram lineares com as concentrações de toxinas presentes na água, que ultrapassaram 27 µg / L. Assim, apesar de não ter-se encontrado no músculo valores superiores a 0,015 µg / g de peso seco, pode-se considerar que o consumo da carpa prateada, assim como de outros peixes filtradores de água doce, salobra ou marinha, apresentam risco à saúde humana, quando em contato com cianobacterias tóxicas, e portanto devem ser monitorados.

ABSTRACT

Cyanobacteria are autotrophic organisms that live in several natural habitats. When exposed to nutrient rich waters, high temperature and irradiation, they can reach large cell densities (blooms). These blooms affect the chemical and biological water composition, release toxins and decrease oxygen in water causing animal death. Filter-feeding fish are specially important because they feed phytoplankton, and are eaten for other fish and they can control algal blooms. The several carp species are examples of filter feeding fish, among other fish of fresh and marine waters, that have gills specialized in filtration. The objective of this work was to analyze the hepatotoxins uptake by carp from fish farming. Furthermore, the relation between cellular number of cyanobacteria and toxin concentration (in the water and in the fish muscles) was also evaluated. These values were compared with the tolerable value for food contaminated with microcystin according to the World Health Organization (Tolerable Daily Intake $TDI = 0,04 \mu\text{g}$ of microcystin / kg / day). To evaluate this, fish were separated in aquaria with toxic and non-toxic cyanobacteria at different cell numbers, from 195.000 to 1.350.000 cells / mL. The toxin analysis was done through Immunoassay specific for Microcystins – ELISA. The experiments showed value of toxins in the muscle (between 0 and $0,015 \mu\text{g}$ of microcystin /g of d.w.muscle). The concentrations of toxins found in muscle were not linear with the concentrations of toxins present in the water higher than $27 \mu\text{g} / \text{L}$. In this way although the highest value of microcystins in carp muscle is $0,015 \mu\text{g} / \text{g}$ d.w., the present work suggest that silver carp uptake, as like other filter-feeding fish of fresh or marine waters, represent a risk to human health when in contact with toxic cyanobacteria.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Reagentes utilizados para preparação dos meios de cultivo de cianobactérias em laboratório.....	10
TABELA 2: Gradiente de mistura da fase móvel.....	18
TABELA 3: Variação das concentrações de microcistinas em $\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco nas brânquias, fígado e músculo nos tratamentos controle e tóxico.....	24
TABELA 4: Variação no número de células de <i>M. aeruginosa</i> por mililitro de água e concentração de microcistina (ug/L) na água e no músculo nos dois experimentos.....	30
TABELA 5: Quantidade de microcistina detectada em cada etapa da extração.....	31
TABELA 6: Dados do músculo – experimento 1.....	46
TABELA 7: Dados do fígado – experimento 1	47
TABELA 8: Dados das brânquias – experimento 1.....	48
TABELA 9: Dados do músculo – experimento 2.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da microcistina.....	4
Figura 2: Foto da carpa prateada.....	5
Figura 3: Concentração média de microcistinas na água.....	23
Figura 4: Concentração média de microcistinas no músculo ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco).....	25
Figura 5: Concentração média de microcistinas no fígado ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco).....	26
Figura 6: Concentração média de microcistinas no fígado ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco).....	27
Figura 7: Concentração de microcistinas na água – experimento 2.....	28
Figura 8: Concentração média de microcistinas no músculo ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco).....	29

INTRODUÇÃO

A construção de reservatórios artificiais para diversos fins é uma das mais antigas e importantes intervenções humanas nos ecossistemas naturais. A interferência drástica ocasionada no fluxo natural dos rios, pela ação antrópica, tem promovido inúmeros problemas, como alterações nos sistemas biológicos, atmosféricos, hidrológicos e sociais nas regiões onde são construídos os reservatórios artificiais (TUNDISI, 1999). Um exemplo destas intervenções é a prática da aquíicultura.

A prática da aquíicultura aumenta os processos de eutrofização, causando problemas ao meio ambiente. A eutrofização é considerada um dos graves problemas atuais a nível global, pois causa grandes impactos ecológicos negativos, de saúde pública e econômica, pela deterioração dos recursos hídricos (TUNDISI, 2003). Baseia-se num fenômeno, no qual ocorre o enriquecimento das águas por nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) em um grau que não pode ser compensado pela mineralização total, de modo que a decomposição do excesso de matéria orgânica produzida resulta na diminuição da concentração de oxigênio nas camadas mais profundas do corpo d'água (MARGALEF, 1983).

O processo de eutrofização nos ecossistemas aquáticos pode desencadear uma série de efeitos indesejáveis, que em sua maioria resultam em mudanças na qualidade da água com: depleção do oxigênio dissolvido, perdas na biodiversidade aquática, perdas das qualidades cênicas, morte intensiva de peixes, aumento no crescimento de macrófitas aquáticas e na incidência de florações de microalgas e de cianobactérias (TUNDISI, 1999).

As cianobactérias são organismos autotróficos, na maioria aeróbicos, com sistema fotossintetizante idêntico ao dos vegetais, sendo comuns, em todos habitats naturais (MUR *et al.* 1999). Contém dentro de uma típica célula procariótica um

complexo fotossintético semelhante em estrutura e função aos cloroplastos dos eucariontes, incluindo um aparelho fotossintético completo e um complexo enzimático para a fixação de nitrogênio semelhante ao de outros diazotróficos (BOLD & WYNNE, 1985). São organismos cosmopolitas, sendo encontradas numa larga faixa de condições físico-químicas (MUR *et al.* 1999). Quando expostas às condições de águas ricas em nutrientes, temperatura elevada e luz solar, multiplicam-se atingindo grandes densidades, caracterizando as florações (CARMICHAEL, 1992).

Problemas associados com cianobactérias parecem aumentar em áreas de elevado crescimento populacional junto a corpos d'água usados para despejo de esgotos e em regiões com prática de agricultura, provocando um aumento das concentrações de nutrientes nos corpos d'água (CARMICHAEL & FALCONER, 1993; CHORUS, 1993). Devido à sua capacidade competitiva, observa-se um aumento na dominância de espécies de cianobactérias em ambientes eutrofizados. As florações são mais frequentes em lagos e reservatórios de águas lênticas, pois há um elevado tempo de estagnação da água. Temperaturas entre 15°C e 30°C e pH entre 6 e 9 são favoráveis ao crescimento das cianobactérias. É frequente a ocorrência de florações em que predominam as cianobactérias do gênero *Microcystis* (REYNOLDS, 1984).

Algumas florações de cianobactérias provocam alterações no gosto e no sabor da água, redução no oxigênio dissolvido, além da liberação de toxinas prejudiciais à saúde humana e animal. Há diversos registros de morte por envenenamento de gado bovino, cavalos, porcos, ovelhas, cães, peixes e invertebrados, pela ingestão ou contato com essas florações tóxicas (CARMICHAEL, 1994; FALCONER, 1999).

As toxinas produzidas por cianobactérias são enquadradas em três categorias, segundo seus efeitos tóxicos em mamíferos: (1) neurotoxinas; (2) dermatotoxinas – lipopolissacarídeos (LPS); e (3) hepatotoxinas (FALCONER, 1993).

A categoria tratada neste trabalho são as hepatotoxinas. Existem dois tipos de hepatotoxinas: as microcistinas e as nodularinas. As microcistinas foram isoladas a partir da cianobactéria *M. aeruginosa*, por isso receberam tal denominação (PEARSON, 1990). Porém essas cianotoxinas têm sido observadas também em espécies planctônicas dos gêneros *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Nostoc* e *Anabaenopsis*, e no gênero terrestre *Hapalosiphon* (SIVONEN & JONES, 1999). Têm sido reportadas em torno de 70 variantes estruturais de microcistinas que foram caracterizadas a partir de amostras de florações e de cepas isoladas de cianobactérias (CODD *et al.* 2005). A nodularina têm sido observada somente na espécie *Nodularia spumigena* (CARMICHAEL, 1994). No presente estudo nos reportaremos à microcistina D-Leu (Figura 1).

As hepatotoxinas são peptídeos cíclicos formados por sete (microcistinas) ou cinco (nodularinas) aminoácidos com os dois aminoácidos terminais do peptídeo linear se juntando, formando um composto cíclico. Elas são solúveis em água e, com exceção talvez de algumas microcistinas mais hidrofóbicas, são incapazes de penetrar diretamente nas membranas lipídicas de células animais, plantas e bactérias (FALCONER, 1993).

Atualmente os valores aceitáveis para alimentos contaminados com microcistinas são, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), expressados através da Tolerância Diária Ingerida (TDI = 0,04 µg de microcistinas / kg / dia). A concentração máxima de ingestão da toxina na água de consumo permitida é 1 µg / L / dia (FALCONER *et al.* 1994).

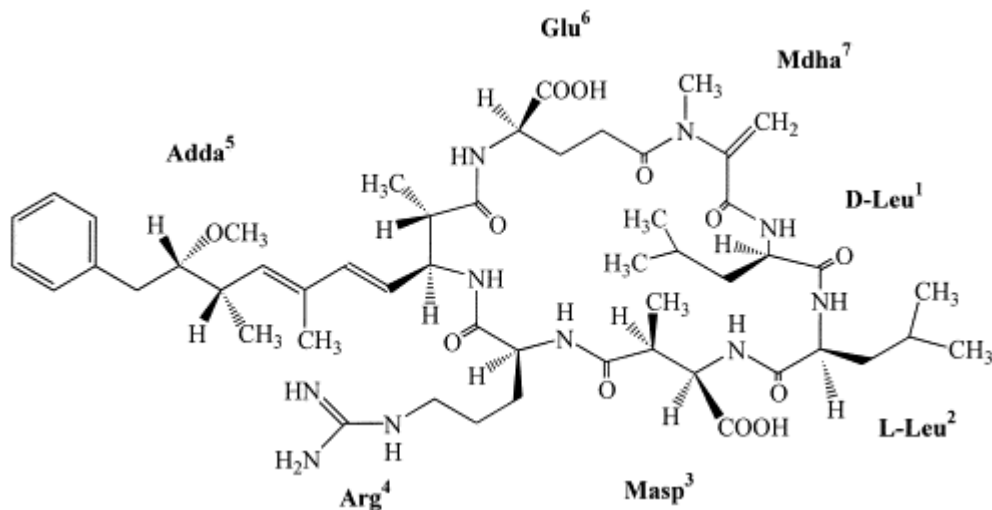


Figura 1: Estrutura química da Microcistina D-Leu (MATTHIENSEN *et al.* 2000).

Animais com hepatotoxicose são levados à morte por alterações citoesqueléticas das células do fígado, causando hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática (VOLTERRA, 1993). Em nível molecular, as microcistinas agem como inibidores das proteínas fosfatases 1 (PP1) e 2 A (PP2A) (MACKINTOSH *et al.* 1990).

Os peixes fitoplantófagos são especialmente importantes porque tem um importante papel nos ecossistemas aquáticos como consumidores do fitoplâncton, como alimento para outros peixes e são potenciais reguladores de florações algais (OPUSZYNSKI & SHIREMAN, 1995; XIE & LIU, 2001). Um dos exemplos destes peixes é a carpa prateada – *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844) (Figura 2). Esta é uma espécie pertencente à família Cyprinidae, de água doce, originária da China, cujo hábito é fitoplanctófago. É uma espécie que beneficia outras por limpar a coluna d'água em razão da floração de algas. Introduzidas no Brasil na década de 80, as várias espécies de carpas ocupam lugar de destaque na piscicultura. Por seu regime alimentar, tem menor custo na alimentação, pois quanto mais próxima dos produtores (vegetais), maior será a produção em consequência da menor perda de energia. Sua principal característica é o desenvolvimento dos rastros branquiais em franjas longas,

finas, adornadas e numerosas, que lhes possibilita uma filtração completa e seletiva das algas da água (HUET, 1970).



Figura 02: Foto da carpa prateada – *Hypophthalmichthys molitrix*. Fonte: www.ceplac.gov.br

A popularidade da carpa como alimento para população e como agente de controle biológico é devido ao seu hábito alimentar (CREMER & SMITHERMAN, 1980). Florações de cianobactérias em cercados foram completamente eliminadas entre 10 e 20 dias pela introdução da carpa prateada (XIE & LIU, 2001). Em estudo para verificar o efeito do clareamento da água feito por três espécies de peixes sob *Microcystis aeruginosa*, observaram que a carpa prateada possui maior eficácia na redução no número de colônias de cianobactérias (DATTA & JANA, 1998). Embora a carpa prateada estimule a biomassa total do fitoplâncton em alta e baixa densidade de estocagem, elimina eficientemente florações de cianobactéria em cercados com peixes, assim como o conteúdo de microcistina intracelular sendo um eficiente peixe biomanipulador para reduzir estas florações de cianobactérias em lagos eutróficos onde a quantidade de zooplâncton é escassa (ZHANG *et al.* 2006).

A vulnerabilidade dos peixes à microcistina é provavelmente influenciada pela natureza do habitat e modo de alimentação (SNYDER *et al.* 2002). Espécies nativas de habitats eutróficos, como esta espécie de carpa, são mais vulneráveis que espécies

nativas de habitats oligotróficos expostas mais frequentemente à toxinas (XIE *et al.* 2004).

Em experimento com carpa comum (*Cyprinus carpio*), LI *et al.* (2004) verificaram que o crescimento do peixe foi significativamente menor quando exposto a uma floração de *M. aeruginosa*. De acordo com CARBIS *et al.* (1996), a toxina em peixes pode causar dano no epitélio branquial, resultando em morte por falha respiratória e desequilíbrio iônico. Nestes organismos a água se move através do epitélio branquial por difusão passiva (MUNDAY, 1990). As células ingeridas atravessam o canal alimentar sem a lise celular e liberação da toxina (PROWSE, 1964). As células sofrem lise no intestino, onde há liberação da toxina (FALCONER, 1993). A carpa não secreta ácido no canal alimentar, a entrada do trato digestivo é neutro ou levemente alcalino (AL-HUSSAINI, 1949). Esta é a feição mais importante no intestino da carpa que limita a absorção de microcistinas, pois a eficiente digestão da toxina requer ambiente ácido (MORIARTY & MORIARTY, 1973). Apesar desta barreira, a toxina é absorvida no intestino (CARBIS *et al.* 1997).

A depuração da toxina é mais rápida no sangue seguida pelo fígado e músculo (XIE *et al.* 2004).

A bioacumulação de cianotoxinas por animais aquáticos incluindo peixes, moluscos e zooplâncton, têm sido reportada por AMORIM & VASCONCELOS (1999), TENCALA *et al.* (1994) e VASCONCELOS (1995). Como consequência, a ingestão destes organismos intoxicados, pode levar a intoxicação humana (MAGALHÃES *et al.* 2001), causando grande prejuízo à saúde da comunidade.

É crescente o interesse por parte dos aquícultores pela criação de organismos de baixo valor comercial e de fácil manejo, como as carpas. No entanto, não chegam a concretizar os projetos, muito provavelmente em virtude da falta de financiamento e,

quando o fazem, são projetos que têm falta de apoio tecnológico no que se refere à criação de espécies autóctones. Aliados à falta de financiamento, existe a incerteza quanto à comercialização das espécies exóticas – carpa, tilápia ou espécies marinhas, que só agora começam a ser cultivadas em escala industrial.

OBJETIVOS

O presente estudo visa analisar a incorporação das microcistinas em peixes filtradores usando como modelo a carpa prateada, visando também determinar a capacidade de concentração de hepatotoxinas em relação às aquelas presentes na água. Apontar intervalos de concentrações de células tóxicas onde as toxinas incorporadas pelo pescado não causem danos à saúde humana, através do seu consumo, testando a metodologia para que possa ser aplicada para peixes de água salobra e marinha.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos peixes

As carpas prateadas - *Hipophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844), foram obtidas na Piscicultura Água Viva. A piscicultura localiza-se na BR-293 km 20, município de Capão do Leão – RS.

Todos os organismos foram adaptados às condições laboratoriais por pelo menos 96 horas, em tanque de fibra de 250 litros de água, com aeração constante, através de aeradores de aquário.

Cultivo das cianobactérias

O trabalho foi realizado com duas cepas de cianobactérias, *Aphanothece* RSMAN92 e *Microcystis aeruginosa* RST9501. O tratamento controle (I) recebeu a cianobactéria não tóxica - *Aphanothece* sp. Os tratamentos com a toxina (II e III) receberam cianobactérias tóxicas - *Microcystis aeruginosa*. As cianobactérias foram cultivadas em laboratório, a 25°C, radiação luminosa de 67 $\mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e pH 8,0. As cepas das cianobactérias foram cultivadas, em dois meios de cultivo distintos, *M. aeruginosa* em meio BGN / 2, e *Aphanothece* em meio BGN / 3. Os meios de cultivos foram preparados de acordo com RIPKA *et al.* (1979), e estão descritos a seguir.

Em um erlenmeyer de 1 litro foram colocados todos os compostos descritos na tabela 1.

Tabela 1: Reagentes utilizados para preparação dos meios de cultivo de cianobactérias em laboratório.

COMPOSTO	BGN/2	BGN/3	Metais Traços:
K ₂ HPO ₄ (3g/100mL)	1 mL	1 mL	ZnSO ₄ .7H ₂ O (0,222g/L)
MgSO ₄ .7H ₂ O (7,5g/100mL)	1 mL	1 mL	MnCl ₂ .4H ₂ O (1,81g/L)
CaCl ₂ .2H ₂ O(3,6g/100mL)	1 mL	1 mL	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (0,39g/L)
Citrato de amônio férrico (0,6g/100mL)	1 mL	1 mL	CuSO ₄ .5H ₂ O (0,079g/L)
Na ₂ EDTA (0,1 g/100mL)	1 mL	1 mL	CoCl ₂ .6H ₂ O (0,04g/L)
Acido Citrico (0,6g/100ML)	1 mL	1 mL	H ₃ BO ₃ (2,86g/L)
Na ₂ CO ₃ (2g/100mL)	1 mL	1 mL	
NaNO ₃ (15g/100mL)	5 mL	3,33 mL	
Metais Traços	1 mL	1 mL	
pH	8,0	7,4 – 7,6	

O volume foi completado com 987 mL no meio BGN/2 e 988,7 mL no meio BGN/3 de água deionizada fechado com algodão e levado para autoclavar por 1 hora em autoclave modelo AV75, 4000 watts de potência (PHOENIX - Brasil).

Depois de resfriado o meio foi inoculado com 1 mL de cultivo das duas cianobactérias dos experimentos, agitado e colocado em aeração constante para crescimento do meio.

Contagem das cianobactérias

As contagens foram realizadas diretamente a partir dos cultivos realizados para o experimento e, a partir de amostras coletadas ao longo do experimento. Para obter-se quantidades regulares de células por mililitro, as contagens foram realizadas em microscopia ótica microscópio STUDAR-Lab em câmara de Neubauer, com aumento de 400 x em triplicata.

Teste preliminar

O teste preliminar foi realizado com o objetivo de avaliar-se a adaptação da carpa às condições experimentais em laboratório. O teste teve duração de 13 dias, sendo 3 dias iniciais de adaptação e 10 dias de exposição às cianobactérias. O teste foi realizado em sala climatizada a 20°C, no Laboratório de Aquacultura Continental da FURG. Foi utilizado um sistema em circuito fechado sem renovação de água, com 9 caixas plásticas de 130 litros, com 30 litros de água em cada caixa. A água foi proveniente de poço localizado no terreno onde se localiza o laboratório. Cada três caixas representou um tratamento: isto é, foram três tratamentos com três repetições cada. Os peixes utilizados no experimento apresentaram pesos médios de 72 g.

Antes dos peixes serem colocados nas caixas plásticas, uma amostra de três peixes foi retirada para análise e esta foi identificada como amostra do dia 1 (D1). Em cada caixa foram colocados 5 peixes. O tratamento I recebeu cianobactérias não-tóxicas - *Aphanotece*, utilizadas como controle e em concentração celular igual a 20.000 cél / mL; os tratamentos II e III receberam cianobactérias produtoras de toxinas - *Microcystis aeruginosa*. O tratamento II recebeu concentrações celulares de 20.000 células / mL, enquanto que o tratamento III recebeu concentrações celulares de 100.000 células / mL.

No Segundo dia de adaptação, o tratamento III foi fertilizado com 240 µg N / L NaNO₃ e 30 µg P / L KH₂PO₄.

As amostragens do teste preliminar foram realizadas antes dos peixes serem colocados nas caixas no primeiro dia (D1) e após treze dias de teste (D13). Assim, foi retirado um peixe de cada caixa. Destes foram extraídos os músculos. Amostras de água também foram armazenadas para posterior análise da toxina.

Antes de ser finalizada a etapa de adaptação, os peixes do tratamento III morreram, o que forçou a retirada de amostras de músculo no quarto dia do teste (D4).

O teste prosseguiu com os tratamentos I e II, que não foram fertilizados. Assim, a extração e análise de toxinas foi realizada apenas em uma amostra de cada tratamento I, II e III. Não foi realizada análise estatística, nem foi possível obter média e desvio padrão. Mantendo-se o caráter de teste preliminar, a análise foi feita com objetivo de verificar se houve presença ou não de toxina no músculo dos organismos.

A análise da água ocorreu somente nas amostras do último dia de amostragem (D13), e também foi realizada em apenas uma amostra de cada tratamento.

Experimento 1

O experimento foi realizado na Unidade de Pesquisas em Cianobactérias da FURG, e teve duração de 10 dias de exposição às cianobactérias. Foram utilizados 4 aquários de vidro, com capacidade de 9 litros em cada. Em cada aquário, foram colocados 8 litros de água da torneira que foi autoclavada para eliminação do cloro.

Foram utilizadas duas cepas de cianobactérias: uma controle - *Aphanotece* sp. - não tóxica e uma espécie tóxica - *Microcystis aeruginosa* RST9501, com duas repetições. Os peixes utilizados no experimento pesaram em média 70g.

Amostras de água do tanque de fibra e amostras de peixes, foram retiradas para análise e identificadas pelo dia, D1. No mesmo dia o experimento foi iniciado. No D1 foram colocados meios de cultivo com 180.000 células / mL, sendo que nos aquários 1 e 2 continham as cepas de *Aphanotece* (tratamento - controle) e nos aquários 3 e 4 continham as cepas de *M. aeruginosa* (tóxico). Um aerizador por aquário foi mantido ligado ao longo do experimento para manter a oxigenação da água. Cada aquário recebeu três peixes.

A contagem de células foi realizada antes de cada amostragem. A cada 3 dias, foi retirada uma amostra de água e um peixe de cada aquário. A água foi trocada por um novo meio de cianobactérias com 180.000 cel / mL. As amostragens de peixes posteriores ao primeiro dia (D1) foram caracterizadas como D4 - amostra do dia 4; D7 - amostra do dia 7 e D10 - amostra do dia 10 - último dia de experimento.

Neste experimento foram coletados e analisados o músculo, o fígado e as brânquias.

Experimento 2

O experimento teve duração de 25 dias de exposição às cianobactérias. Foram realizadas amostragem a cada 5 dias, totalizando 6 amostragens.

O desenho experimental foi igual ao experimento 1, com duas espécies de cianobactérias (controle e tóxico) e duas repetições para cada. Os peixes utilizados neste experimento pesaram em média 51,2 g. Antes dos peixes serem colocados nos aquários foram retirados 4 peixes do tanque de fibra e identificados como amostra do dia 1 (D1). Em cada aquário foram colocados 5 peixes, e as amostragens de peixes foram feitas a cada 5 dias, sendo identificadas como: D5 - amostra do dia 5; D10 – amostra do dia 10; D15 – amostra do dia 15; D20 – amostra do dia 20 e D25 – amostra do dia 25. Neste experimento foram analisados somente os músculos.

A cada 5 dias, a água do meio era renovada com adição de 530.000 células / mL, de cianobactérias não tóxicas, nos aquários 1 e 2 (controle); e o mesmo número de cianobactérias tóxicas, nos aquários 3 e 4 (tóxico).

Extração das Toxinas

A cada amostragem os peixes foram pesados. Retirou-se o músculo dos peixes de cada experimento. No experimento 1 foram retirados também fígado e brânquias. O material retirado foi pesado para obtenção do peso fresco. Após pesagem, foram armazenados em frascos plásticos e congelados. Após o congelamento, o material foi liofilizado para obtenção do peso seco e congelado novamente.

A extração das microcistinas no músculo, no fígado e nas brânquias dos peixes foi feita seguindo uma adaptação da metodologia descrita por MAGALHÃES & AZEVEDO (1998). Para a extração da toxina, o material foi macerado e transformado em pó. Do pó, foi retirado 1g onde foi adicionado 15 mL de metanol 100%, e colocado no agitador orbital por duas horas, e na geladeira por, no mínimo, 15 horas. O material foi centrifugado (centrifuga HermLe modelo Labnet 323) por 20 minutos a uma velocidade de 5000 rpm. O sobrenadante foi colocado em um funil de separação e, ao precipitado, foi acrescentado 15 mL de metanol 100%, para novamente ser centrifugado por 20 minutos a 5000 rpm. O novo sobrenadante foi acrescentado ao anterior (no funil), com a adição de 30 mL de n-hexano 100%. O material foi agitado e após 5 minutos a fração metanólica foi removida para um erlenmeyer, evaporada em evaporador rotatório a temperatura entre 55 e 60 °C, e a fração seca foi ressuspensa em 1mL de água milli-Q. Todos os solventes foram padrões P.A. “para análise” e fornecidos pela MERCK – Brasil.

A cada dia de amostragem, foi retirado 3 mL de água dos aquários (tanque de fibra, caixas plásticas e aquários). As amostras de água foram congeladas até o dia de análise. Para análise da água, cada amostra foi descongelada a temperatura ambiente, sonificada em sonificador Ultrasonic Processor, Modelo GE 50 (20k Hz e 25 watts) para o rompimento da parede das células e liberação da toxina.

Metodologia para análise das toxinas em imunoenensaio específico para microcistinas

As frações obtidas do tecido e da água foram analisadas através do Imunoenensaio Específico para Microcistinas - ELISA, com limite de detecção de 0,03 $\mu\text{g} / \text{L}$, limite de quantificação de 0,06 $\mu\text{g} / \text{L}$. O método possui limite de resolução entre 0,16 e 2,5 $\mu\text{g} / \text{L}$ (ENVIROLOGIX, Portland, USA).

Os resultados apresentados nas figuras e nos anexos correspondem a valores < 0,03 $\mu\text{g} / \text{L}$ (limite de detecção) porque as amostras originais foram sujeitas a concentrações antes da análise.

O procedimento foi desenvolvido de acordo com as recomendações do fabricante. O método consistiu na adição de 125 μL de diluente do ensaio da microcistina em cada poço, e em seguida, na adição de 20 μL das amostras, o conteúdo foi misturado e os poços foram cobertos com parafilm e incubados durante 30 minutos num agitador orbital a temperatura ambiente. Logo, foram adicionados 100 μL de conjugado da microcistina em cada poço, e novamente o conteúdo foi misturado e incubado por 30 minutos. Depois da incubação, o parafilm foi removido e o conteúdo dos poços descartado e os poços foram lavados com solução de lavagem. O excesso da solução de lavagem foi removido. Foram adicionados 100 μL do substrato e os poços foram cobertos com novo parafilm, misturados e incubados por mais 30 minutos. Logo em seguida foram adicionados 100 μL da solução final, e a placa foi introduzida lida no leitor de placas modelo Quick ELISA para leitura das amostras.

Avaliação do percentual de recuperação da toxina pelo método de extração utilizado

Para avaliar o percentual de recuperação da toxina foram utilizados 4 peixes com peso médio de 3,7g. Um peixe foi tratado como controle e os outros 3 foram tratados com o padrão D-Leu microcistina. Destes 4 peixes, o músculo foi extraído sem pele, pesado e colocado em recipientes individuais para cada organismo. No músculo (peso médio = 1,3 g) de 3 peixes, foi injetado 120 μ L do padrão de microcistina (130 μ g / mL). O material foi liofilizado, transformado em pó e congelado. O procedimento de extração da toxina realizado no teste preliminar e nos dois experimentos foi aplicado para avaliação do percentual de recuperação a cada etapa isolada do processo de extração. As amostras foram congeladas liofilizadas e analisadas por imunoenensaio e por cromatografia.

Metodologia utilizada para detecção das toxinas por cromatografia

O equipamento consistiu de um CLAE (Cromatógrafo líquido de alta eficiência-Shimatzu – Japão) com detector SPD 10A VP, bomba FCV 10AL VP, forno de coluna CTO-10AS_{VP} ambos controlados através do software CLASS-VP 6.21 SP5. O método possui limite de detecção de 10 µg / L, e limite de quantificação de 15 µg / L. Foi utilizado coluna Seppack C-18 (Phenomenex, Luna 5µ, 250 X 4.60 mm), e como fase móvel acetonitrila (0.05% TFA) e água (0.05% TFA), sob o gradiente abaixo (Tabela 2):

Tabela 2: Gradiente de mistura da fase móvel.

% água	65	40	30	0	0	65	65
Tempo (min.)	0	15	18	20	22	23	30

Um volume de 100 µL da amostra foi injetado no sistema e bombeada com uma vazão de 1 mL / minuto, e por afinidade química os compostos foram separados e a leitura feita em 238 nm, com forno a temperatura de 40°C.

Foram utilizados reagentes MERCK. Os padrões de microcistinas-LR (Sigma) e microcistina D-Leu (UPC), foram utilizados devido o método basear-se no tempo de retenção da toxina (HARADA *et al.*, 1995). Os padrões foram estocados em meio ácido no escuro, sob refrigeração. As análises foram realizadas utilizando-se o sistema cromatográfico. Para o cálculo da concentração das soluções em µg / L foram utilizadas a área dos picos dos cromatogramas da toxina.

Cálculo da concentração de toxinas nos peixes

Os valores das concentrações de microcistinas em $\mu\text{g} / \text{L}$ nos peixes, foram convertidos em $\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco. A conversão deu-se a partir dos valores do peso seco (g) e da concentração de microcistinas nos órgãos analisados pelo imunoensaio, segundo a fórmula:

$$[\text{MCYST}] \mu\text{g} / \text{g} = \frac{[\text{MCYST}] \mu\text{g.L}^{-1}}{1.000 \times \text{PS (g)}}$$

$[\text{MCYST}] \mu\text{g} / \text{g}$ = Concentração de microcistina em um grama de peso seco de cada amostra analisada;

$[\text{MCYST}] \mu\text{g} / \text{L}$ = Concentração de microcistina em um litro da solução obtida após a extração;

PS(g) = Peso seco de cada órgão analisado.

*Os dados apresentados como resultados, não foram corrigidos pelo percentual de recuperação. O cálculo do percentual de recuperação foi realizado somente para avaliação do método utilizado para extração da toxina.

Análise Estatística

Para análise estatística foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) utilizando-se o modelo de experimento fatorial, utilizando-se o programa estatística 5.0. As médias foram interpretadas ao nível de significância de 5 % ($\alpha = 0,05$) para todas as análises realizadas neste trabalho.

Para normalização, os resultados foram transformados através dos métodos matemáticos descritos a seguir:

Experimento 1:

- Análise da concentração de microcistinas no músculo: $x' = 1/x$, onde x' é o resultado transformado e x é o resultado obtido após o cálculo da concentração de microcistina em $\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco do músculo.
- Análise do fígado: não foi realizada nenhuma transformação matemática.
- Análise da concentração de microcistinas nas brânquias: $x' = 1/x$, onde x' é o resultado transformado e x é o resultado obtido após o cálculo da concentração de microcistina em $\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco das brânquias.
- Análise da água: $x' = \sqrt{x}$, onde x' é o resultado transformado e \sqrt{x} é a raiz quadrada do valor encontrado após o cálculo da concentração de microcistina em $\mu\text{g} / \text{L}$ de água.

Experimento 2:

- Dos dados de concentração de microcistinas no músculo foram extraídos a raiz quadrada: $x' = \sqrt{x}$, onde x' é o resultado transformado e \sqrt{x} é a raiz quadrada do valor encontrado após o cálculo da concentração de microcistina em $\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco do músculo.

- Análise da água: $x' = \sqrt{x + 1} - \sqrt{x}$, onde x' é o resultado transformado e x é o valor encontrado após o cálculo da concentração de microcistina em $\mu\text{g} / \text{L}$ de água.

Para apresentação dos resultados mostrados nas figuras e tabelas de cada experimento, foram utilizados os valores obtidos diretamente das tabelas em anexo, sem transformação. Os valores transformados foram utilizados somente para satisfazer os pré-requisitos da análise estatística e para interpretação dos dados.

RESULTADOS

Teste preliminar

Os peixes mantidos nos três tratamentos do teste responderam às condições de cultivo com boa adaptação ao sistema, mesmo na presença de cianobactérias produtoras de microcistinas.

Foi verificado que os peixes possivelmente haviam tido contato com cianobactérias tóxicas quando ainda estavam na piscicultura. Esta afirmação é baseada na presença de microcistina na amostra do primeiro dia (D1), onde foram detectadas concentrações de microcistinas de 0,008 $\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco do músculo. Não foi realizada a análise da presença de cianobactérias na água da piscicultura ou microcistinas na água dos viveiros da piscicultura.

No último dia do teste (D13), foram extraídas e analisadas amostras de músculos de um peixe de cada tratamento (I e II). As concentrações de microcistinas foram de 0,0109 (tratamento I) e de 0,0085 (tratamento II) $\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco.

A água do teste também foi amostrada no dia 13 (D13) e foram detectadas concentrações da microcistina de 0,193 $\mu\text{g} / \text{L}$ no tratamento I e 3,148 $\mu\text{g} / \text{L}$ no tratamento II.

Neste teste foram analisadas amostras únicas, não sendo possível obter médias e desvios-padrão. Não foi possível nenhuma conclusão a respeito das concentrações da microcistina no músculo dos peixes nem na água.

A fertilização dos tanques do tratamento III foi realizada para manutenção do crescimento das cianobactérias, e foi a causa da morte dos peixes do tratamento III no quarto dia (D4) do teste. Neste tratamento, o músculo do peixe retirado para extração da microcistina apresentou concentração de 0,0151 μg de microcistina / g de peso seco.

Experimento 1

O número de células tóxicas de *Microcystis aeruginosa* no tratamento tóxico variou de 195.000 a 1.000.000 por mililitro ao longo dos 10 dias do experimento. Na água deste tratamento foram detectadas concentrações médias de microcistinas entre 0,4 e 23,8 $\mu\text{g} / \text{L}$ (Figura 3).

Não foi detectada a presença de células de cianobactérias tóxicas na água do controle com *Aphanotece*, embora microcistinas tenham sido detectadas na água dos aquários durante o experimento com concentrações entre 0,4 e 2,4 μg de microcistinas / L, a contaminação pode ter sido devido a eliminação de microcistinas pelos peixes.

Nos quatro dias de amostragem houve diferença ($p = 0,00$), entre o controle e o tratamento tóxico, onde o tratamento tóxico apresentou concentrações de microcistinas estatisticamente maiores (em até 20 $\mu\text{g} / \text{L}$) que o tratamento controle, ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

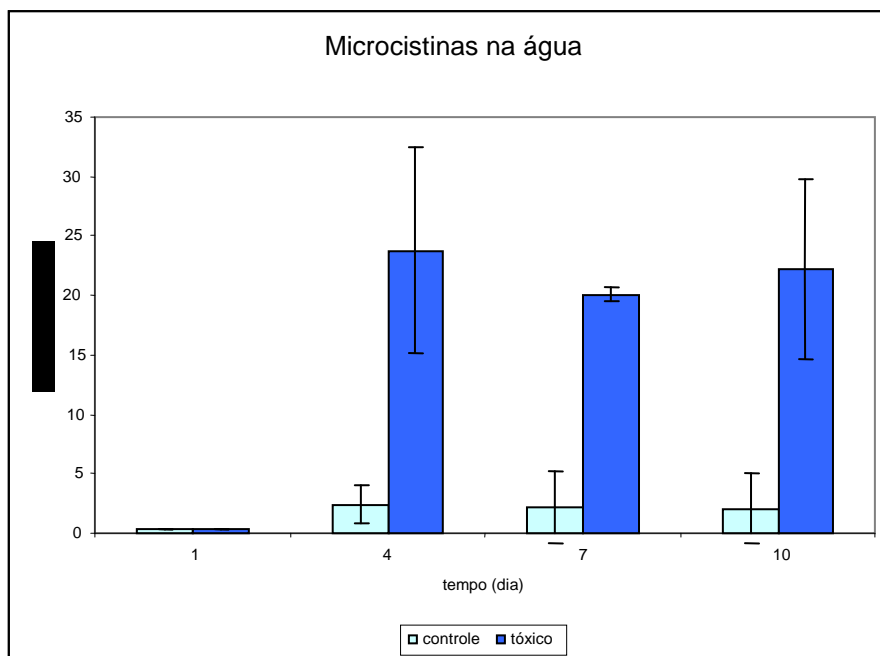


Figura 3: Concentração média de microcistinas na água ($\mu\text{g} / \text{L}$) nos tratamentos controle e tóxico durante o experimento (\bar{x} -Desvio padrão) $n = 2$.

As médias das concentrações de microcistinas na água foram estatisticamente diferentes ao longo do experimento no tratamento tóxico ($p = 0,01$). A diferença ocorreu entre D1 e as outras amostras (D4, D7 e D10). A introdução da cepa com cianobactéria tóxica elevou a concentração de microcistinas na água a partir do quarto dia D4 neste experimento. Após, as concentrações de microcistinas nos D4, D7 e D10 foram iguais.

No controle as concentrações de microcistinas na água durante o experimento foram estatisticamente iguais.

Neste experimento foram extraídos músculo, fígado e brânquias dos peixes para análise de microcistinas. O órgão que apresentou a mais elevada concentração de microcistina foi a brânquia, com níveis entre 4,6 e 21,5 μg de microcistinas / g, seguida pelo fígado e músculo (tabela 3).

Tabela 3: Variação das concentrações de microcistinas em μg / g de peso seco nas brânquias, fígado e músculo nos tratamentos controle e tóxico. ($n = 4$)*

<i>Tratamento</i>	<i>Brânquia</i>	<i>Fígado</i>	<i>Músculo</i>
controle	4,6 – 11,6	0,02 – 0,03	0,0007 – 0,001
tóxico	4,6 – 21,5	0,03 – 0,05	0,001 – 0,005

*n – número de amostras analisadas.

As concentrações de microcistinas no músculo nos tratamentos controle e tóxico foram estatisticamente diferentes ($p = 0,00$).

As médias das concentrações de microcistinas no músculo dos peixes no tratamento tóxico foram crescentes ao longo do experimento ($p = 0$), com nítido aumento da concentração de microcistinas entre o primeiro dia D1 e o último dia de experimento D10, 0,001 e 0,005 μg de microcistinas/g respectivamente. No controle

houve diminuição na concentração de microcistinas no músculo entre o D7 e D10 (Figura 4). Isto não correspondeu às concentrações de microcistinas na água que, mantiveram-se constantes entre D4 e D10 (Figura 3).

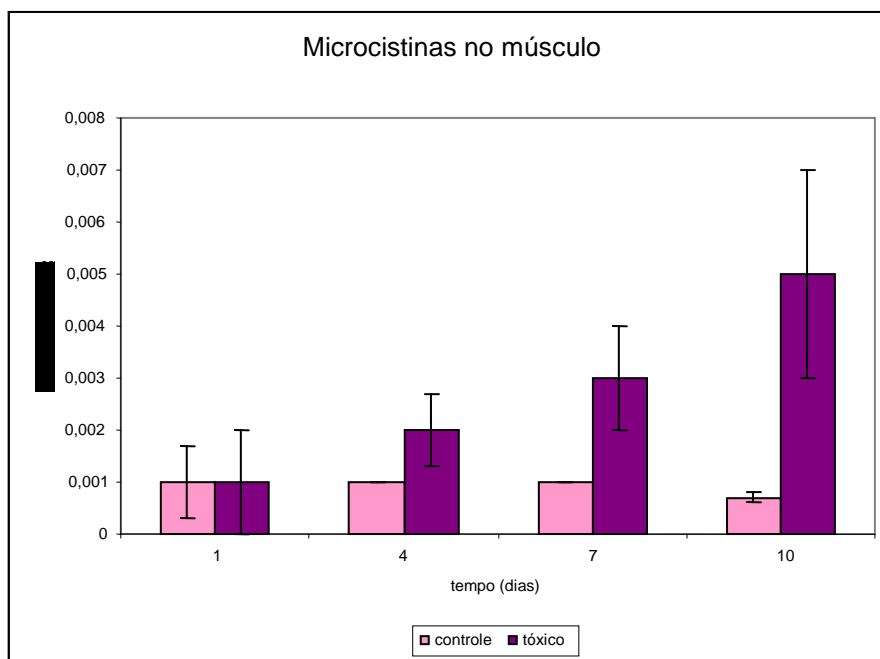


Figura 4: Concentração média de microcistinas no músculo ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco) nos tratamentos controle e tóxico durante o experimento (\pm -Desvio padrão) $n = 2$.

A média das concentrações de microcistina no fígado dos peixes nos tratamentos controle e tóxico não foram diferentes ao longo do experimento ($p = 0,40$) e variaram entre 0,02 e 0,05 μg de microcistinas/g, sendo o valor mais alto encontrado no D10, sugerindo uma possível acumulação de microcistinas neste órgão alvo (Figura 5). No tratamento controle, as concentrações de microcistinas no fígado e na água somente variaram entre D1 e D4. No tratamento tóxico, as concentrações de microcistinas no fígado acompanharam as concentrações na água apenas entre as amostras D1 a D4 e D7 a D10.

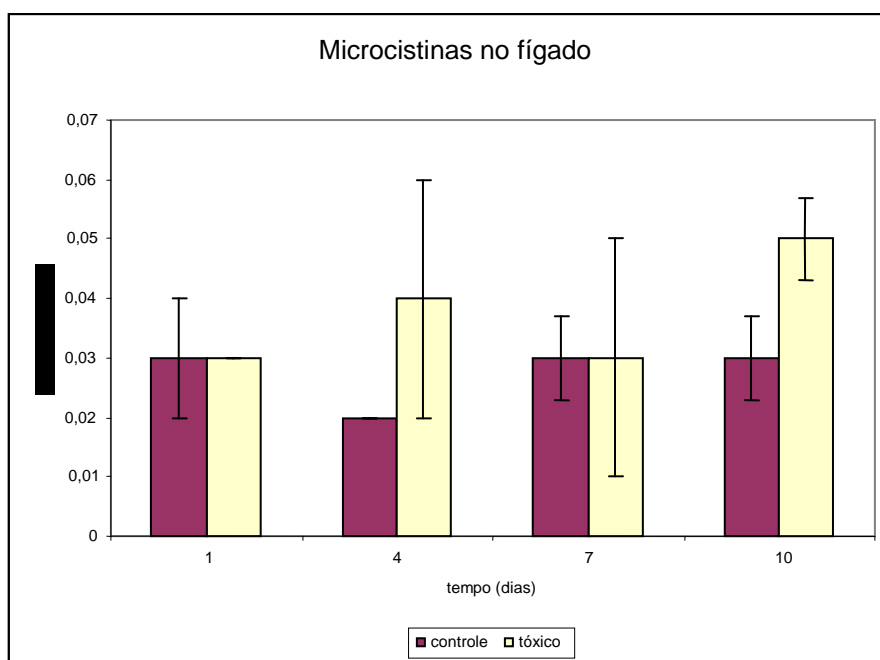


Figura 5: Concentração média de microcistinas no fígado ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco) nos tratamentos controle e tóxico durante o experimento (\pm -Desvio padrão) $n = 2$.

A média das concentrações de microcistina nas brânquias dos peixes nos tratamentos controle e tóxico foram estatisticamente diferentes ao longo do experimento ($p = 0,00$) e variaram entre 4,6 e 21,5 μg de microcistinas/g (Figura 6). As concentrações de microcistinas nas brânquias corresponderam com a concentração de microcistinas na água no tratamento controle. As concentrações de microcistinas no tratamento tóxico corresponderam com as concentrações encontradas na água entre os D1 e D4, e entre D7 e D10, mas sobretudo evidencia um efeito nítido de retenção das microcistinas nas brânquias ao longo do tempo de experimento.

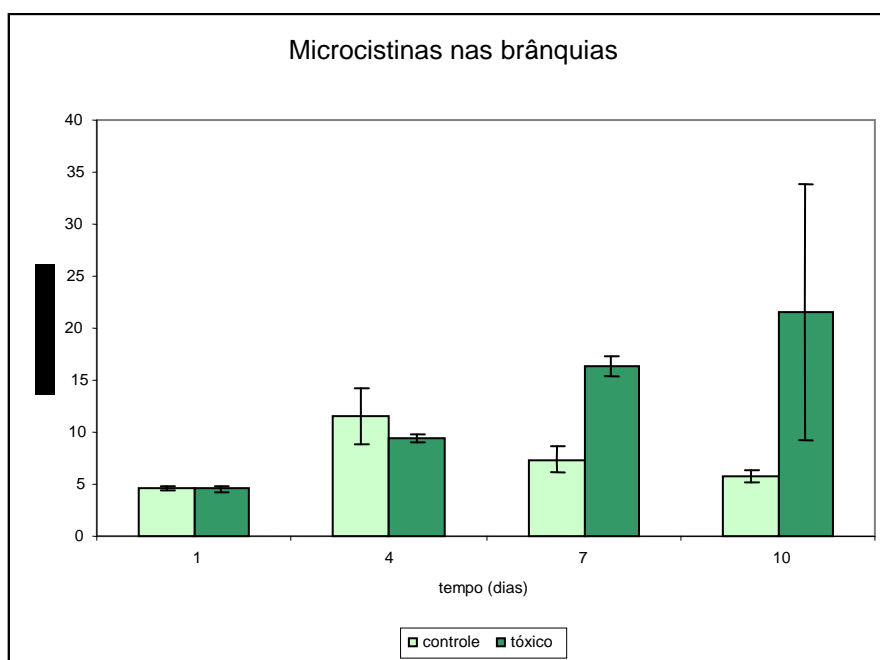


Figura 6: Concentração média de microcistinas nas brânquias ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco) nos tratamentos controle e tóxico durante o experimento (\pm -Desvio padrão) $n = 2$.

A variação média no número de células de *M. aeruginosa* foi crescente no tratamento tóxico, onde no quarto dia de experimento (D4) foi igual a 195.000 céls / mL, no dia 7 (D7) foi igual a 950.000 e no dia 10 (D10) foi de 1.000.000 de céls / mL. A concentração de microcistinas na água não variou linearmente com o número de células, já que esta diminuiu entre D4 (23,8 μg de microcistinas/L) e D7 (20,1 μg de microcistinas/L), respectivamente. É importante lembrar que, a cada dia de amostragem foram adicionadas 180.000 céls / mL, e que os altos números celulares foram atingidos no decorrer dos dias em que os peixes estavam expostos às células, sendo evidente que houve crescimento celular nos aquários do experimento tratados com a toxina mesmo sem a fertilização da água dos aquários.

Os resultados do aumento no número de células foram lineares com o aumento na concentração de microcistinas no músculo e nas brânquias no tratamento tóxico ao longo do experimento.

Experimento 2

Este experimento foi realizado no intuito de testar quantidades mais altas de células tóxicas e observar a incorporação da toxina no músculo. O número de células tóxicas – *Microcystis aeruginosa* – na água do tratamento tóxico variou de 825.000 a 1.350.000 por mililitro. Na água deste tratamento foram detectadas concentrações médias de microcistinas entre 0,1 e 27,1 µg / L (Figura 7).

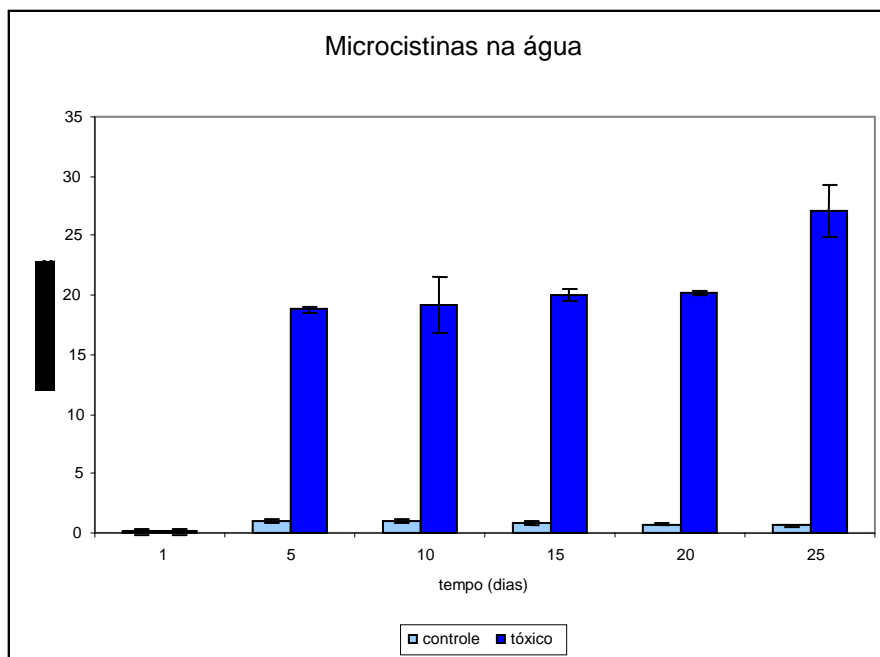


Figura 7: Concentração de microcistinas na água nos tratamentos controle e tóxico, ao longo do experimento (\pm -Desvio padrão) $n = 2$.

A concentração de microcistinas na água entre os tratamentos controle e tóxico foram estatisticamente diferentes ($p = 0,00$) ao nível de 5% ($\alpha = 0,05$).

As médias das concentrações de microcistinas encontradas na água não variaram ao longo do experimento no tratamento controle ($p = 0,06$). No tratamento tóxico, houve variação significativa entre D1 e D5, e também entre D20 e D25 ($p = 0,02$).

Neste experimento foi extraído apenas o músculo para análise de microcistina. Não foram detectadas concentrações de microcistinas no primeiro dia (D1). As concentrações de microcistinas no músculo ao longo do experimento variaram entre 0,000 e 0,015 $\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco nos tratamentos controle e tóxico (Figura 8).

Houve diferença significativa nas concentrações médias de toxinas no músculo entre os tratamentos controle e tóxico ($p = 0,001$), onde os valores mais altos foram encontrados no tratamento tóxico.

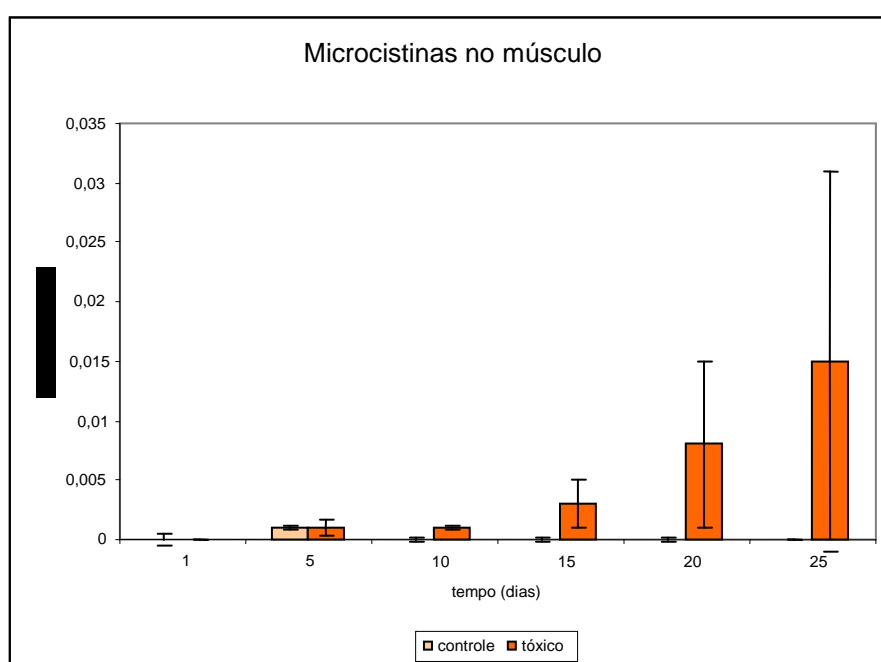


Figura 8: Concentração de microcistinas no músculo nos tratamentos controle e tóxico ao longo do experimento (\pm -Desvio padrão) $n = 2$.

As concentrações médias de microcistinas no músculo dos peixes no tratamento tóxico foram crescentes ao longo do experimento ($p = 0,01$) ao nível de 5% ($\alpha = 0,05$). No tratamento controle, foram detectadas 0,001 μg de microcistina / g de peso seco somente no dia 5 (D5) e, no restante dos dias foram iguais à zero, podendo este resultado (0,001 $\mu\text{g} / \text{g}$) ser devido a um efeito na metodologia de análise.

As concentrações de toxinas encontradas na água e no músculo no tratamento tóxico foram correspondentes, ocorrendo um aumento ao longo do experimento ($p = 0,051$).

Durante o experimento foi observado que a partir do dia 10 (D10), as células do tratamento controle, que receberam *Aphanotece* sp. começaram a morrer diariamente. Isto foi evidenciado pela mudança na coloração da água (amarelamento), neste experimento 2.

Ao longo dos dois experimentos foi dado ênfase, na relação entre concentração de microcistinas na água e no músculo, com o aumento no número de células por mililitro nos aquários do tratamento tóxico (tabela 4).

Tabela 4: Variação no número de células de *M. aeruginosa* por mililitro de água e concentração de microcistina ($\mu\text{g} / \text{L}$) na água e no músculo nos dois experimentos.

Número de células por mililitro de água	$\mu\text{g} / \text{L}$ na água	$\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco no músculo
195.000	23,8	0,002
825.000	20,0	0,003
920.000	18,8	0,001
950.000	20,1	0,003
1.000.000	22,2	0,005
1.150.000	20,2	0,008
1.265.000	19,2	0,001
1.350.000	27,1	0,015

De acordo com a tabela, aproximando-se os valores menores que 1.000.000 cél / mL, têm-se valores médios de microcistinas na água de 21,7 $\mu\text{g} / \text{L}$, e valores médios de microcistinas por grama de peso seco do músculo igual a 0,002 μg . Do mesmo modo,

aproximando os números celulares maiores ou iguais a 1.000.000 céls / mL, encontra-se concentrações médias de microcistinas na água de 22,1 µg / L, e valores médios de microcistinas por grama de peso seco do músculo igual a 0,007 µg. De acordo com esta aproximação, verificou-se que com o aumento no número de células na água, ocorreu um aumento aparente na concentração de microcistinas no músculo dos peixes, mas a diferença não é significativa, ou seja, as médias não diferem.

O método para extração de microcistinas em peixes utilizado neste trabalho obteve um percentual de recuperação da microcistina de 32% quando as análises foram realizadas pelo imunoensaio e 27% por cromatografia (Tabela 5). No entanto, os resultados aqui apresentados não foram corrigidos pelo percentual de recuperação.

Tabela 5: Quantidade de microcistina detectada em cada etapa da extração.

AMOSTRAS	Imunoensaio (µg de microcistina) / L	Cromatografia líquida (µg de microcistina) / L
Amostra 1	4,1	3,3
Amostra 2 - controle	<0,03	<0,03
Amostra 3	3,0	3,7
Amostra 4	7,8	5,5
Média	4,9	4,2
Percentual de recuperação	32%	27%

O método utilizado no presente trabalho foi o Imunoensaio pela rapidez no tempo de resposta, já que entre as médias dos valores não existem diferença.

DISCUSSÃO

Quantidades de células acima de 20.000 cél / mL de água, caracterizam as florações de cianobactérias. Números celulares iguais a este são comuns em corpos d'água utilizados como áreas de lazer e regiões onde se praticam pesca intensiva (pesque-pagues) e podem apresentar nível de toxicidade significativo para organismos capazes de filtrar e alimentar-se destas células, como os peixes filtradores. De acordo com KE *et al.* (2007), peixes filtradores como carpa prateada, carpa cabeça-grande e tilápia, são utilizados no biocontrole de comunidades planctônicas como cianobactérias. Vários estudos têm sido realizados mostrando quantidades de células acima de 100.000 cél / mL. Em experimento de acumulação e depuração de microcistinas em mexilhões, quantidades de células por mililitro iguais a 100.000 cél / mL foram usados por AMORIM & VASCONCELOS (1999). Neste mesmo trabalho os autores sugerem que, em ambientes onde essa quantidade de células é ultrapassada, existe a necessidade de controle para analisar-se o risco de contaminação. No estuário da Lagoa dos Patos onde são realizados estudos evidenciando a presença de cianobactérias tóxicas e sua acumulação em organismos filtradores (LEÃO, 2004). MATTHIENSEN *et al.* (1999) encontraram valores de até 1.000.000 de células / mL. Neste ambiente pratica-se a pesca e parte da população utiliza a lagoa como área de lazer.

Os experimentos do presente trabalho, utilizaram quantidades celulares de *Microcystis* entre 195.000 e 1.350.000 céls / mL. Em experimento realizado por WOOD (2005) foram investigadas a concentração de microcistina em cianobactérias e sua acumulação em truta arco-íris e mariscos nos lagos Rotoiti e Rotoehu na Nova Zelândia. O autor encontrou que com 940.000 céls / mL obteve-se concentrações de microcistinas na água iguais a 450 µg / L. Já em números celulares iguais a 440.000 cél / mL, foram encontrados 765 µg de microcistinas / L. Assim, foi verificado que altas concentrações

celulares de cianobactérias não indicam diretamente altas concentrações de microcistinas. No presente trabalho, há um número semelhante de células, 950.000 cél / mL, no entanto, as concentrações de microcistinas na água foram somente 20,1 µg / L. Em nenhuma etapa dos dois experimentos, foram encontradas concentrações de microcistinas tão altas como citadas por WOOD (2005), onde a concentração mais alta encontrada em um litro de água no presente trabalho foi 27,1 µg de microcistinas/ L. As diferenças entre as concentrações da toxina encontradas por WOOD (2005) e as concentrações encontradas no presente trabalho podem ter sido causadas por perdas na extração da toxina, já que no presente trabalho o percentual de recuperação da toxina foi calculado em 32% e o percentual de recuperação encontrado por WOOD (2005) foi de 70%, para amostras de tecido de peixes. Outra possível causa deve-se a peixes fitoplanctívoros serem mais resistentes à microcistinas que outros peixes devido a menor acumulação da toxina no fígado, órgão alvo da toxina (XIE *et al.*, 2005). Também, o fato de o referido trabalho ter sido realizado com amostras coletadas no ambiente natural, onde a ocorrência de cianobactérias tóxicas é freqüente, sendo identificadas duas espécies produtoras de toxinas, *Anabaena* spp. e *M. aeruginosa*. Podem, no ambiente natural, as cepas produzirem uma concentração maior de toxina do que as cepas utilizadas no presente trabalho, já que o experimento em laboratório foi realizado com apenas uma cianobactéria tóxica, *M. aeruginosa*. Com isso, fica evidente que diferentes cepas de cianobactérias podem produzir diferentes concentrações de toxinas.

A presença da toxina no músculo dos peixes no presente trabalho foi evidenciada no primeiro dia (D1) – experimento 1, indicando uma prévia acumulação de toxinas desde os tanques originais na piscicultura. MAGALHÃES *et al.* (2001) observaram que mesmo após o declínio da floração de *M. aeruginosa* na água em uma

lagoa costeira no Rio de Janeiro, as toxinas continuaram a ser detectadas no músculo e fígado de peixes (*Tilapia rendalli*). Na ocorrência da floração, a 10.000.000 cél / mL, a concentração de microcistinas no músculo da tilápia alcançou 0,0264 µg / g de peso seco. No presente trabalho, em números celulares iguais a 1.350.000 células por mililitro, as concentrações de microcistinas no músculo da carpa alcançaram 0,015 µg por grama de peso seco. As diferenças nas concentrações de microcistinas, nas diferentes espécies de peixes, também podem ser devido às diferenças no metabolismo de cada espécie, assim como os diferentes tempos de depuração da toxina pelos órgãos (XIE *et al.*, 2004). CHEN *et al.* (2007), concluíram que os mecanismos de excreção e a eficiente detoxificação da microcistina por peixes fitoplanctívoros tornam possível o uso destes peixes em águas eutrofizadas contaminadas com cianotoxinas.

As toxinas se distribuem diferentemente nos órgãos dos peixes. No presente trabalho, as concentrações foram maiores nas brânquias (4,6 – 21,5 µg microcistinas/g de peso seco), seguida pelo fígado (0,02 – 0,05 µg microcistinas/g de peso seco) e músculo (0 – 0,015 µg microcistinas/g de peso seco). Esta diferença nos valores deve-se as brânquias serem a via primária de acumulação e retenção das toxinas pela carpa prateada. MOHAMED *et al.* (2003) analisaram a acumulação de microcistinas nos intestinos, fígado, rins e músculo de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Os peixes foram colocados em três grupos de acordo com o número de células encontradas no intestino. O grupo 1 continha entre 5.000.000 a 10.000.000 cél / mL, apresentando concentrações de microcistinas iguais a 0,05 µg / g de peso fresco de músculo. Já os grupos 2 e 3 apresentaram 10.000.000 a 15.000.000 e mais que 15.000.000 cél / mL, e 0,08 e 0,1 µg microcistinas/g de peso fresco de músculo, respectivamente. O trabalho citado anteriormente mostra a variação na acumulação em diferentes tecidos à medida que aumenta o número de células. XIE *et al.* (2005) analisaram a distribuição de

microcistinas em diferentes órgãos de peixes de diferentes níveis tróficos (incluindo herbívoros, omnívoros, fitoplantívoros e carnívoros) em um lago no sul da China. Foram encontradas altas concentrações da toxina no intestino e sangue, seguido por fígado, bile e rins, e o músculo apresentou as mais baixas concentrações. A concentração de microcistinas foi mais alta em peixes carnívoros e omnívoros e mais baixa em peixes fitoplantívoros e herbívoros. Uma provável explicação dada pelos autores é que: (a) peixes carnívoros podem acumular mais microcistinas, (b) peixes fitoplantívoros podem degradar microcistinas mais ativamente, (c) peixes carnívoros podem apresentar outras rotas no trato gastrointestinal e (d) a combinação destes mecanismos pode ocorrer. As concentrações encontradas por XIE *et al.* (2005) no fígado foram de 7,77 μg microcistinas/g de peso seco e no músculo 1,81 μg microcistinas/g de peso seco, enquanto que no presente trabalho, foram de 0,05 μg microcistinas/g de peso seco do fígado e no músculo 0,015 μg microcistinas/g de peso seco. A diferença na concentração da toxina entre o trabalho dos autores e o presente trabalho, pode ser devido aos diferentes tempos de duração dos experimentos e de outras condições experimentais. O presente trabalho teve duração de 25 dias e o trabalho de XIE *et al.* (2005) teve duração de 80 dias, tendo os peixes estudados pelo autor um maior tempo de contato com a toxina das cianobactérias.

A concentração máxima permitida de microcistinas na água de consumo foi estabelecida em 1 μg / L / d (FALCONER *et al.*, 1994). A ingestão diária tolerável (TDI) é 0,04 μg / kg peso corpóreo / d (CHORUS & BARTRAM, 1999). LI *et al.* (2004) consideraram que a ingestão diária de carpa e tilápia por humanos é em média entre 100 a 300 gramas de peixe. Para o presente trabalho, se considerarmos a ingestão de 300 g de músculo fresco da carpa prateada, considerando o maior valor encontrado de microcistina no músculo (0,015 μg / g peso seco e 0,001 μg / g peso fresco) durante

os dois experimentos, a ingestão resultante de microcistina seria uma dose diária de 0,005 µg de microcistina, para uma pessoa de 60 kg, estando abaixo do TDI.

Microcistinas podem ser acumuladas nos órgãos dos peixes através da ingestão de células de *Microcystis*. Como não existem evidências da ação das microcistinas no metabolismo dos peixes, pode ocorrer um risco potencial de transferência da toxina ao longo da cadeia alimentar (FIGUEIREDO *et al.*, 2004). CHEN *et al.* (2006), mostraram que a carpa prateada acumula menos microcistinas no músculo que outras espécies de peixes, indicando um menor risco para o consumo humano. Assim, analisando os valores da toxina encontrados aqui, e considerando o consumo da carpa prateada em ambientes de recreação e lazer, não foi possível prever riscos no consumo do pescado para as concentrações analisadas no presente trabalho em peso fresco do peixe. No entanto, os autores acima citados, encontraram concentrações no músculo da carpa prateada, nas quais ultrapassam o limite permitido em trabalho realizado num lago dominado por uma floração de *Microcystis aeruginosa*. Assim, mesmo não havendo risco, existe a necessidade de monitoramento destes ambientes.

Neste estudo, a ocorrência do amarelamento da água do meio de cultivo dos peixes que estavam sendo tratados com cianobactérias não tóxicas, foi observado a partir do décimo dia (D10) no experimento 2. Supõe-se que a cor amarelada, ocorreu devido à morte de cianobactérias pois houve acúmulo de excrementos e produtos nitrogenados em excesso. Mesmo com a troca diária de água, o amarelamento ocorreu até o final do experimento (D25). Em peixes de água doce, os produtos finais do metabolismo são: água, dióxido de carbono, amônia e pequenas quantidades de uréia e ácido úrico. Amônia é o produto nitrogenado excretado em maior quantidade. Nitrito pode ser formado por decomposição da matéria orgânica, sendo tóxico para os peixes pela formação da metahemoglobina - produto da oxidação da hemoglobina (JENSEN,

1990). Um estudo feito por YUNES (1995) com cianobactérias observou que níveis de nitrito acima de 0,6 mM são tóxicos ao crescimento de cianobactérias, tanto para condições de luz como para escuro, ocorrendo uma diminuição do crescimento, sendo o crescimento destes organismos, estimulado por valores entre 0,2 e 0,6 mM de nitrito. Elevados níveis de compostos nitrogenados são prejudiciais tanto para cianobactérias quanto para os peixes, quando cultivados em associação, excedendo a capacidade do ambiente de metabolizar estes compostos, levando ao risco de morte destes organismos.

CONCLUSÃO

Cepas de cianobactérias da espécie *Microcystis aeruginosa* podem produzir diferentes concentrações de toxinas. No presente trabalho, verificou-se que em diferentes números de cél / mL de *M. aeruginosa* RST9501, foram encontradas concentrações da toxina na água e no músculo dos peixes. Houve diferença significativa entre os tratamentos controle e tóxico no músculo dos peixes. Apesar de não terem sido encontradas concentrações de microcistinas a nível de risco no músculo, a exposição dos peixes a estas toxinas deve ser monitorada, levando-se em conta que diferentes cepas de cianobactérias produzem concentrações variáveis de toxinas podendo haver acúmulo de microcistinas no músculo, a parte comestível do pescado, a nível de risco. Com isto, a carpa prateada serve, não só como indicadora, mas também como vetor da presença da toxina na água. De acordo com estes resultados, monitoramentos em ambientes onde a presença de cianobactérias na água é freqüente, e esta espécie de peixe está presente, devem ser realizados para evitar a contaminação do pescado.

BIBLIOGRAFIA

AL-HUSSAINI, A.H. 1949. On the morphology of alimentary tract of some fish in Relation to differences in their feedings habits: cytology and physiology. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 90, 323-354.

AMORIM, A. & VASCONCELOS, V. 1999. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 37, 1041-1052.

BOLD, H.C. & WYNNE, W.J. 1985. Introduction to the algae. Structure and reproduction. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA.

CARBIS, C.R., MITCHELL, G.F., ANDERSON, J.W. & MCCAULEY, I. 1996. The effects of microcystins on the serum biochemistry of carp, *Cyprinus carpio* L., when toxins are administered by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *Journal of Fish Diseases*. 19, 151-159.

CARBIS, C.R.; RAWLIN, G.T.; GRANT, P.; MITCHELL, G.F., ANDERSON, J.W. & MCCAULEY, I. 1997. A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *Journal of Fish Diseases* 20, 81-91.

CARMICHAEL, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites - The cyanotoxins. *J. Of Appl. Bacteriol*, 72, 445-459.

CARMICHAEL, W.W. & FALCONER, I.R. 1993. Diseases related to freshwater blue green algal toxins, and control measures. In Falconer I.R., editor. Algal toxins in seafood and drinking water. London: Academic Press; p 187-209.

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

CHEN, J. XIE, P., ZHANG, D., KE, Z., YANG, H. 2006. In situ studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stocked in Lake Taihu with dense toxic *Microcystis* blooms. *Aquaculture* vol. 261, n°3, 1026-1038.

- CHEN, J., XIE, P., ZHANG, D. & LEI, H. 2007. *In situ* studies on the distribution Patterns and dynamics of microcystins in a biomanipulation fish – bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Environmental pollution* 147, 150-157.
- CHORUS, I. 1993. Algal Metabolites and Water Quality: Toxins, Allergens, and Test-and-Odor-Substances. *Memorie dell Istituto Italiano do Idrobiologia*. 52, 257-280. *International Journal of Limnology*.
- CHORUS, I. & BARTRAM, J. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management: World Health Organization. E & FN Spon, Routledge, London.
- CODD, G., MORRISON, L.F. & METCALF, J.S. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol* 203:264-272.
- CREMER, M. & SMITHERMAN, R.O. 1980. Food habits and growth of silver and bighead carp in cages and ponds. *Aquaculture* 20, 57-64.
- DATTA, S. & JANA, B.B. 1998. Control of bloom in a tropical lake: grazing efficiency of Some herbivorous fishes. *Journal of Fish Biology* (1998) 53, 12–24.
- FALCONER, I.R. 1993. Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae, in: FALCONER, I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, pp. 165–176.
- FALCONER, I.R., BURCH, M.D., STEFFENSEN, D.A., CHOICE, M. & COVERDALE, O.R. 1994. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *J. Environ. Toxicol. Wat. Qual.* 9, 131–139.
- FALCONER, I.R. 1999. An overview of problem caused by toxic bluegreen algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environ. Toxicol.* 14, 5–12.
- FIGUEIREDO, D.R., AZEITEIRO, U.M., ESTEVES, S.M., GONCALVES, F.J.M & PEREIRA, M.J. 2004. Microcystin-producing blooms – a serious global public health issue. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 59, 151 – 163.

HARADA, K.; SUZUKI, M. & WATANABE, M.F. 1995. Structural analyses of cyanobacterial toxins. In: CODD, G.A., JEFFERIES, T.M., KEEVIL, C.W. & POTER, E. 1995. Detection Methods for Cyanobacterial Toxins. *The Royal Society of Chemistry*. 24-33p.

HUET, M. 1970. *Traité de Pisciculture*. Bruxelles, Ch. de Wyngaert, 718p.

JENSEN, F.B. 1990. Nitrite and red cell function in carp: control factors for nitrite entry, membrane potassium ion permeation, oxygen affinity and methaemoglobin formation. *J. Exp. Biol.* 152, 149-166.

KE, Z., XIE, P., GUO, L., LIU, Y. & YANG, H. 2007. *In situ* study on the control of toxic *Microcystis* blooms using phytoplanktivorous fish in the subtropical Lake Taihu of China: A large fish pen experiment. *Aquaculture* (2007) in press.

LEÃO, J.C. 2004. Retenção de Microcistinas em organismos filtradores nativos do estuário e costa adjacente da Lagoa dos Patos. FURG, Dissertação de Mestrado. 93p.

LI, S.F., YANG, H.Q. & LU, W.M. 1980. Preliminary research on diurnal feeding rhythm and the daily ration for silver carp, bighead carp and grass carp. *J. fish. China* 4(3), 275 – 283.

LI, X.Y.; CHUNG, I.K. JUNG; KIM, J.I. & LEE, J.A., 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon*, 44, 821-827.

MACKINTOSH, C., BEATTIE, K.A., KLUMPP, S., COHEN, P. & CODD, G.A. 1990. Cyanobacterial MCYST-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264, 187-192.

MAGALHÃES, V.F. & AZEVEDO, S.M.F.O. 1998. Ecological Implications of Hepatotoxic *Microcystis aeruginosa* in the Jacarepaguá Lagoon, Brazil. Anais da VIII Conferencia Internacional de Algas Nocivas Vigo, Espanha, 25-29 de Junho de 1997, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. pp: 26-28.

MAGALHÃES, V.F., SOARES, R.M. & AZEVEDO, S.M. 2001. MCYST Contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39, 1077-1085.

MARGALEF, R. 1983. *Limnologia*. Barcelona: Omega. 1100pp.

MATTHIENSEN, A., YUNES, J. S. & CODD, G. A. 1999. Occurrence, distribution and toxicity of cyanobacteria from the Patos Lagoon estuary, Southern Brazil. *Rev. Bras. Biol.* 1999, vol. 59, no. 3, 361-376.

MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K.A.; YUNES, J.S.; KAYA, K. & CODD, G.A. 2000. [D-Leu] Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis*RST9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry* 55 (5) 383-387.

MOHAMED, Z.A., CARMICHAEL, W.W. & HUSSEIN, A.A. 2003. Estimation of microcystins in the fresh water fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ. Toxicol.* 18, 137-141.

MORIARTY, C.M. & MORIARTY, D.J.W. 1973. Quantitative estimation of the daily ingestion of phytoplankton by *Tilapia nilotica* and *Haplochromis nigripinnis* in Lake George, Uganda. *Journal of Zoology*. 171, 15-23.

MUNDAY, B.L. 1990. Fish physiology. In: *Fin Fish Diseases Refresher Course for Veterinarians Proceedings* 128 pp. 121-129. PostGraduate Committee in Veterinary Science, Sydney.

MUR, L.R.; SKULBERG, O.M. & UTKILEN, H. Cyanobacteria in the environment. 1999. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). *Toxic cyanobacteria in Water: Guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon, cap. 2, p. 14- 40.

OPUSZYNSKI, K. & SHIREMAN, J.V. 1995. Herbivorous Fishes—Culture and Use for Weed Management. CRC Press, Florida, USA.

PEARSON, M.J. 1990. Toxic blue-green algae. Report of the National Rivers Authority. Water Quality Series 2. UK. 127 p.

PROWSE, G. 1964. Some limnological problems in tropical fish ponds. *Verhandlungen International Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie* 15, 480- 484.

REYNOLDS, C.S. 1984. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge Univ. Press, 367 pp.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M. & STANIER, R.Y. 1979. Generic Assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.

SIVONEN, K. & JONES, G. 1999. Cyanobacteria toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequence, Monitoring and Management*. E and FN Spon, London and New York, pp. 41–111.

SNYDER, G.S., GOODWIN, A.E. & FREEMAN, D.W. 2002. Evidence that channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality is not linked to ingestion of the hepatotoxin microcystin-LR. *Journal of Fish Diseases* 25, 275–285.

TENCALA, F., DIETRICH, D. & SCHLATTER, C. 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxins to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 30, 215-224.

TUNDISI, J.G. 1999. Limnologia no século XXI: perspectivas e desafios. São Carlos: Instituto Internacional de Limnologia, São Carlos, SP, 24 pp.

TUNDISI, J.G. 2003. O futuro dos Recursos. Ed. Multi Ciência, 691 pp.

VASCONCELOS, V.M. 1995. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 32, 227-237.

VOLTERRA, L. 1993. Algal toxicity in freshwater environments, In: R. de Benardi, R. Pagnotta & A. Pugnetti (eds.), *Strategies for lake ecosystems beyond 2000*, *Mem. Ist. Ita.l Idrobiol.* 52, 281-299.

WOOD, S.A. 2005. Bloom forming and toxic cyanobacteria in New Zealand: species diversity, distribution, cyanotoxin production and accumulation of microcystins in selected freshwater organisms. PhD thesis, Victoria University.

YUNES, J.S. 1995. Effects of light and CO₂ on Nitrite Liberation by the Heterocystous Cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Plant Physiol*, Vol. 147. pp 313-320.

XIE, L., XIE, P., GUO, L., LI, L., MIYABARA, Y. & PARK, H.D. 2005. Organ Distribution and bioaccumulation of Microcystins in freshwater fish at different Trophic Levels from the Eutrophic lake Chaochu, China. *Environmental Toxicology*: 293-300.

XIE, L., XIE, P., OZAWA, K., HONMA, T., YOKOYAMA, A. & PARK, H.D. 2004. Dynamics of microcystin-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environmental Pollution*, 127, 431-439.

XIE, P. & LIU, J.K. 2001. Practical success of biomanipulation using filter-feeding fish to control cyanobacteria blooms: a synthesis of decades of research and application in a subtropical hypereutrophic lake. *The Scientific World* 1, 337–356.

ZHANG, X., XIE, P., HAO, L., GUO, N., GONG, Y., HU, X., CHEN, J. & LIANG, G. 2006. Effects of the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) on plankton and the hepatotoxic microcystins in an enclosure experiment in a eutrophic lake, Lake Schichahai in Beijing. *Aquaculture*, 257,173-186.

ANEXOS

Tabela 6: Dados do Músculo – experimento 1

Dias	Tratamento	Peso peixe (g)	Peso fresco do músculo (g)	Peso seco músculo (g)	Microcistinas no músculo ($\mu\text{g/g}$ peso seco)
1	controle	78,9	25,2	5,8	0,001
1	controle	76,4	24,4	5,7	0,002
1	tóxico	79,8	30,5	7,0	0,003
1	tóxico	130,1	49,3	10,7	0,001
4	controle	65,8	22,9	5,1	0,001
4	controle	61,3	24,4	5,6	0,001
4	tóxico	58,1	22,2	5,1	0,002
4	tóxico	61,8	23	5,1	0,003
7	controle	42,1	15,1	3,4	0,001
7	controle	66	24,5	5,4	0,001
7	tóxico	46,8	16,5	3,7	0,002
7	tóxico	46	16,8	3,7	0,004
10	controle	73,8	26,7	5,7	0,0008
10	controle	74,3	24,7	5,2	0,0006
10	tóxico	78,5	29,3	6,4	0,007
10	tóxico	64,1	24,8	5,5	0,004

Tabela 7: Dados do Fígado - Experimento 1

Dias	Tratamento	Peso peixe (g)	Peso fresco do fígado (g)	Peso seco do fígado (g)	Microcistinas no fígado ($\mu\text{g/g}$ peso seco)
1	controle	78,9	4,1	0,9	0,05
1	controle	76,4	3,9	0,8	0,03
1	tóxico	79,8	4,6	1,0	0,02
1	tóxico	130,1	7,4	1,4	0,02
4	controle	65,8	4	0,8	0,02
4	controle	61,3	2,9	0,7	0,02
4	tóxico	58,1	2,4	0,8	0,03
4	tóxico	61,8	3,5	0,5	0,06
7	controle	42,1	2,8	0,6	0,04
7	controle	66	2,4	0,5	0,03
7	tóxico	46,8	2,2	0,5	0,05
7	tóxico	46	2,1	0,4	0,02
10	controle	73,8	3,7	0,6	0,03
10	controle	74,3	3,6	0,5	0,04
10	tóxico	78,5	2,3	0,4	0,05
10	tóxico	64,1	2,5	0,5	0,06

Tabela 8: Dados das Brânquias – experimento 1

Dias	Tratamento	Peso peixe (g)	Peso fresco brânquia (g)	Peso seco brânquia (g)	Microcistinas nas brânquias (µg/g peso seco)
1	controle	78,9	3,4	0,6	5,4
1	controle	76,4	3,2	0,6	5,6
1	tóxico	79,8	3,7	0,6	4,0
1	tóxico	130,1	5,83	0,8	3,6
4	controle	65,8	3,1	0,4	13,5
4	controle	61,3	2,7	0,4	9,7
4	tóxico	58,1	2,3	0,4	9,1
4	tóxico	61,8	2,5	0,4	9,7
7	controle	42,1	2,1	0,5	8,3
7	controle	66	3,2	0,5	6,5
7	tóxico	46,8	2,6	0,4	17
7	tóxico	46	1,8	0,2	15,6
10	controle	73,8	3,6	0,5	5,3
10	controle	74,3	3	0,5	6,1
10	tóxico	78,5	3	0,5	12,8
10	tóxico	64,1	2,3	0,4	30,2

Tabela 9: Dados do músculo – experimento 2

Dias	Tratamento	Peso peixe (g)	Peso fresco músculo (g)	Peso seco músculo (g)	Microcistinas no músculo (µg/g peso seco)
1	Controle	62,0	19,7	4,0	0,0004
1	Controle	71,0	20,0	3,9	0,0012
1	Tóxico	72,0	11,6	2,2	0
1	Tóxico	62,0	9,2	1,7	0
5	Controle	64,0	19,4	4,1	0,0016
5	Controle	69,4	17,2	2,9	0,0012
5	Tóxico	52,5	9,2	1,5	0,002
5	Tóxico	60,0	15,9	3,1	0,001
10	Controle	52,2	20,2	4,0	0,0007
10	Controle	58,0	19,8	3,9	0,0009
10	Tóxico	56,0	6,4	1,2	0,0004
10	Tóxico	51,0	4,4	0,7	0,003
15	Controle	30,0	15,7	3,0	0,0004
15	Controle	45,5	20,7	4,1	0,0001
15	Tóxico	55,4	14,6	2,3	0,005
15	Tóxico	38,8	10	1,9	0,002
20	Controle	32,4	23,8	4,9	0,0003
20	Controle	32,3	11,6	2,2	0
20	Tóxico	78,2	14,1	2,7	0,014
20	Tóxico	38,7	12,9	2,0	0,003
25	Controle	39,4	5,3	0,8	0,0001
25	Controle	65,6	8,2	1,6	0
25	Tóxico	36,8	7,1	1,2	0,027
25	Tóxico	68,7	16,1	2,6	0,004