

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA  
BACHARELADO EM QUÍMICA**

**JULIANA DE CARVALHO SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE AGUDA DE EXTRATOS BRUTOS  
DE *Microcystis aeruginosa* EM *Danio rerio* ATRAVÉS DE  
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENÉTICO**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**CURITIBA**

**2016**

**JULIANA DE CARVALHO SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE AGUDA DE EXTRATOS BRUTOS  
DE *Microcystis aeruginosa* EM *Danio rerio* ATRAVÉS DE  
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENÉTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento acadêmico de Química e Biologia – DAQBI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas

CURITIBA  
2016

JULIANA DE CARVALHO SILVA

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE AGUDA DE EXTRATOS BRUTOS  
DE *Microcystis aeruginosa* EM *Danio rerio* ATRAVÉS DE  
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENÉTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

**Avaliador:** Profa. Dra. Lucila Adriani Coral  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR

**Avaliador:** Profa. Dra. Lucia Regina Rocha Martins  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR

Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas

**Orientadora**

Dra. Danielle Caroline Schnitzler

**Coordenadora de Curso**

Curitiba, 30 de novembro de 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Em especial, agradeço meus pais, minha irmã e familiares, pelo amor, suporte e incentivo incondicional.

Agradeço as minhas amigas Alana Cristine Pellanda e Julia Caroline Freire Sovierzoski, e meu amigo Alysson de Pauloveloso, que contribuíram muito para a minha formação.

Agradeço a minha orientadora, professora Dra. Adriane Martins de Freitas, pela orientação, apoio e confiança.

Agradeço a professora Dra. Wanessa Ramsdorf e a minha colega de laboratório (mestranda) Regiane Reque, pelo auxílio na execução deste trabalho.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste momento, o meu muito obrigada.

## RESUMO

SILVA, Juliana de Carvalho. **Avaliação da ecotoxicidade aguda de extratos brutos de *Microcystis aeruginosa* em *Danio rerio* através de biomarcadores bioquímicos e genético**. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Florações de cianobactérias representam um dos principais riscos à saúde pública e ambiental devido à possibilidade destes organismos liberarem cianotoxinas após a lise celular. As cianotoxinas mais encontradas são as microcistinas, produzidas principalmente pela espécie *Microcystis aeruginosa*, sendo a microcistina-LR a mais comumente encontrada e a mais tóxica. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ecotoxicidade aguda de extratos brutos (com e sem meio de cultivo ASM-1) de *Microcystis aeruginosa* em peixes da espécie *Danio rerio*. A quantificação de MC-LR foi realizada por CLAE-DAD, e as concentrações encontradas foram:  $81,66 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  no extrato com meio ASM-1 e de  $20,60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  no extrato sem meio ASM-1. Os peixes foram expostos aos extratos por via hídrica durante 48 horas (sistema estático). Após este período, amostras de sangue e do corpo dos animais (exceto a cabeça) foram coletadas e os efeitos ecotoxicológicos avaliados em função das alterações de biomarcadores bioquímicos e genético. A atividade enzimática de glutathione-S-transferase (GST) nos grupos expostos às concentrações de MC-LR mostrou-se significativamente menor que o grupo controle, o que indica uma inibição da atividade e uma relação de causa-efeito com a cianotoxina presente nos extratos brutos. Comparando os dois grupos de exposição, foi verificada uma redução mais elevada da atividade na maior concentração de MC-LR ( $81,66 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), o que corrobora com estudos que também observaram inibição da atividade de GST em maiores concentrações analisadas de MC-LR. Para glutathione reduzida (GSH) os grupos expostos às concentrações de MC-LR, presentes nos extratos brutos, não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle. No ensaio cometa, os escores obtidos nos grupos expostos a MC-LR não apresentaram diferença significativa entre eles e em relação ao controle.

**Palavras-chave:** Cianotoxina. Glutathione-S-transferase. Glutathione reduzida. Microcistina-LR. Peixes.

## ABSTRACT

SILVA, Juliana de Carvalho. **Acute ecotoxicity evaluation of extracts of gross *Microcystis aeruginosa* in *Danio rerio* (zebrafish) using biochemical and genetic biomarkers.** 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Cyanobacterial blooms represent one of the biggest issues related to environmental impact and public health due to the release of cyanotoxins after cell lysis. The most found cyanotoxins are microcystins produced by *Microcystis aeruginosa*, being microcystin-LR the most common and toxic type. This study aims to evaluate the acute ecotoxicity of crude extracts (with and without ASM-1 medium) of *Microcystis aeruginosa* in *Danio rerio* fish specie. To quantify MC-LR the method used was HPLC-DAD and the concentrations found were: 81,66  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in the extract with ASM-1 medium and 20,60  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in the extract without the ASM-1 medium. The fishes were exposed to the extracts by waterway for 48 hours (static system). After that, the blood and body samples (except the head) were collected and the ecotoxicological effects evaluated according to changes of biochemical and genetic biomarkers. The glutathione-S-transferase (GST) enzymatic activity in groups exposed to MC-LR was significantly lower when compared to the control group indicating an inhibition of the activity possibly related to the cyanotoxin in the crude extracts. Comparing the two exposed groups the decrease of activity was more pronounced in higher concentrations of MC-LR (81,66  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), in agreement with similar studies about inhibition of GST activity in high concentrations of MC-LR. For the glutathione reduced (GSH), the groups exposed to MC-LR in the crude extracts, did not show significant statistic difference comparing to the control group. In the comet assay, the scores obtained were compared among groups and between groups and control group and no significant difference was observed.

**Key-words:** Cyanotoxin. Fishes. Glutathione-S-transferase. Glutathione reduced. Microcystin-LR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral de microcistinas e as principais variações encontradas em florações tóxicas.....	17
Figura 2 - <i>Danio rerio</i> .....	21
Figura 3 - Exposição dos peixes às amostras .....	29
Figura 4 - Classificação dos núcleos no ensaio cometa: A) classe 0; B) classe 1; C) classe 2; D) classe 3; E) classe 4; F) célula em apoptose .....	34
Figura 5 - Curva padrão de soro de albumina bovina .....	35
Figura 6 - Atividade de Glutathione-S-transferase. As letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), utilizando o teste Tukey .....	38
Figura 7 - Curva padrão de glutathione reduzida .....	40
Figura 8 - Concentração de Glutathione reduzida. As letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ), utilizando o teste Tukey .....	41
Figura 9 - Relação entre os escores atribuídos ao grupo controle e grupos expostos à MC-LR no ensaio cometa. As letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ), utilizando o teste Kruskal-Wallis .....	44

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
2.1	Objetivo Geral .....	11
2.2	Objetivos específicos .....	11
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
3.1	Poluição das águas e eutrofização .....	12
3.2	Cianobactérias .....	13
3.3	Cianotoxinas .....	15
3.3.1	Microcistinas.....	16
3.4	Ecotoxicidade da microcistina-LR .....	19
3.4.1	<i>Danio rerio</i> .....	20
3.5	Biomarcadores Bioquímicos .....	22
3.5.1	Glutathione-S-transferase (GST).....	23
3.5.2	Glutathione reduzida (GSH) .....	23
3.6	Biomarcadores genéticos .....	24
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
4.1	Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> e preparação dos extrato brutos .....	26
4.2	Quantificação de microcistina-LR nos extratos brutos.....	27
4.3	Manejo e cultivo dos organismos-teste .....	28
4.4	Exposição aos extratos brutos de <i>M. aeruginosa</i> .....	29
4.5	Análise dos biomarcadores bioquímicos .....	29
4.5.1	Concentração de proteínas .....	30
4.5.2	Glutathione-S-transferase (GST).....	31
4.5.3	Glutathione reduzida (GSH) .....	32
4.6	Análise do biomarcador genético .....	33
4.7	Análise estatística.....	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
5.1	Biomarcadores bioquímicos .....	35
5.1.1	Concentração de proteínas .....	35
5.1.2	Glutathione-S-transferase (GST).....	37
5.1.3	Glutathione reduzida (GSH) .....	39



<b>5.2 Biomarcador genético.....</b>	<b>42</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>47</b>
<b>APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS REALIZADOS NO ENSAIO COMETA .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO A – COMPOSIÇÃO DO MEIO LÍQUIDO ASM-1 UTILIZADO NO CULTIVO DE <i>M. aeruginosa</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO B – PARECER CEUA-UTFPR (PARTE 1).....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO B – PARECER CEUA-UTFPR (PARTE 2).....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO C – PREPARO DE SOLUÇÕES PARA O ENSAIO COMETA .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A eutrofização é responsável pelo aparecimento de florações de algas e de cianobactérias, que formam extensas massas superficiais de coloração verde, e representam um risco em potencial à saúde pública e ambiental em função da natureza tóxica de diversas espécies encontradas (MARTINS, 2010; SANTOS; BRACARENSE, 2008).

No Brasil, as espécies tóxicas encontradas de cianobactérias são principalmente dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix* e *Aphanocaps*, sendo que a produção de toxinas ocorre principalmente sob condições que favorecem o crescimento das cianobactérias (GARCIA, 2013).

As toxinas produzidas por cianobactérias são conhecidas como cianotoxinas e geralmente permanecem dentro das células e são liberadas na água após a lise celular (GARCIA, 2013). As cianotoxinas podem ser classificadas, de acordo com as propriedades toxicológicas, em dermatotoxinas (irritantes ao contato), neurotoxinas (afetam o sistema neuromuscular) e hepatotoxinas (afetam as células do fígado) (SANTOS; BRACARENSE, 2008).

As microcistinas (MCs) são as cianotoxinas mais estudadas, pois são frequentemente as mais encontradas nas florações de cianobactérias em águas doces e em reservatórios de todo o mundo. Estruturalmente, são caracterizadas por heptapeptídeos monocíclicos e produzidas principalmente pela espécie *Microcystis aeruginosa* (SANCHES et al., 2012; MARTINS, 2010). As microcistinas pertencem a classe das hepatotoxinas que atuam por inibição das fosfatases proteicas PP1 e PP2A das células hepáticas (MARTINS, 2010). Atualmente, mais de 80 isoformas de microcistinas são conhecidas (KIST, 2012), sendo que a microcistina-LR (MC-LR) é considerada a mais tóxica e de maior distribuição (MARTINS, 2010).

Em exposições agudas, esse grupo de toxinas é responsável pela destruição da estrutura interna do fígado, acarretando choque hipovolêmico ou insuficiência hepática (SANTOS; BRACARENSE, 2008; CARMICHAEL, 1994). A exposição crônica a pequenas doses pode favorecer o desenvolvimento de câncer, como foi verificado nos estudos realizados por Nishiwaki-Matsushima et al. (1992).

Recentemente, foi atribuída às microcistinas a capacidade de provocar tanto um aumento como também uma redução na atividade de enzimas

antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione redutase (GR), a glutathione peroxidase (GPx), e a glutathione S-transferase (GST). A exposição às MCs pode resultar em uma geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e desencadear o estresse oxidativo (KIST, 2012; SANTOS; BRACARENSE, 2008).

Muitos estudos também têm demonstrado efeitos tóxicos das microcistinas em vários organismos aquáticos, como letalidade e imobilidade (efeitos agudos), e diminuição no crescimento e fecundidade (efeitos crônicos). Efeitos bioquímicos envolvendo alteração na atividade de enzimas fosfatases e efeitos comportamentais também já foram relatados (FILHO, 2009).

Peixes, como *Danio rerio*, são muito utilizados como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos, pela capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais naturais e artificiais e pela facilidade de ser cultivado em laboratório, além de apresentar sensibilidade satisfatória para diversas substâncias químicas (KNIE; LOPES, 2004).

O uso de biomarcadores em programas de avaliação ambiental vem crescendo, pois eles refletem os efeitos tóxicos de substâncias químicas através de alteração numa resposta biológica (OLIVEIRA, 2014). Vários parâmetros bioquímicos de peixes são utilizados como biomarcadores e os mais amplamente analisados são as enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, ou seja, enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante (MARTINEZ, 2006). A detecção de fragmentações nas cadeias de DNA também representa uma técnica importante da ecotoxicologia, como biomarcador de genotoxicidade. O ensaio cometa tem sido muito utilizado para verificar a genotoxicidade de substâncias e investigar efeitos na integridade do DNA, reparo e recuperação em espécies de importância ambiental (RAMSDORF, 2007).

Neste contexto, os biomarcadores são usados para identificar as interações entre os contaminantes e seres vivos e, dessa forma, podem indicar os efeitos subletais causados pela microcistina-LR nos peixes da espécie *Danio rerio*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ecotoxicidade aguda de extratos brutos de *Microcystis aeruginosa*, que possuem a microcistina-LR como componente majoritário, em peixes (*Danio rerio*), utilizando biomarcadores bioquímicos e genético.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de extratos brutos de *M. aeruginosa* (com e sem meio ASM-1) em tecidos de *Danio rerio* a partir de análises de biomarcadores bioquímicos (glutaciona-S-transferase e glutaciona reduzida);
- Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de extratos brutos de *M. aeruginosa* em sangue de *D. rerio* através de ensaio cometa;
- Verificar uma possível relação de causa-efeito entre a microcistina-LR presente nos extratos brutos e as alterações nos biomarcadores bioquímicos e genético utilizados.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Poluição das águas e eutrofização

A qualidade da água se tornou preocupante para a saúde pública no final do século XIX e início do século XX, principalmente com o avanço da relação entre doenças e água contaminada. Essa relação começou a ser estudada na metade do século XIX, em 1855, no trabalho do epidemiologista John Snow que provou a associação de um surto de cólera em Londres com reservatórios de abastecimento público contaminados por esgoto (FREITAS; FREITAS, 2005).

A contaminação das águas naturais é causada principalmente pelo lançamento, direto ou indireto, de esgotos domésticos e resíduos industriais ricos em nutrientes, não tratados ou insuficientemente tratados, e pelo carreamento de fertilizantes utilizados na agricultura. Em função disso, muitas substâncias químicas atingem os corpos hídricos, causando modificações, e ocasionando a eutrofização (SANCHES et al., 2012; KNIE; LOPES, 2004).

A eutrofização consiste no aumento da concentração de nutrientes em um ecossistema aquático, principalmente nitrogênio e fósforo. A eutrofização pode ocorrer de forma natural, em que os nutrientes são trazidos lenta e continuamente pelas chuvas e águas superficiais, ou artificialmente, quando é induzida pelo homem e os nutrientes possuem origens distintas (ESTEVES, 2011).

O aumento da população humana e da industrialização acarretaram na maior liberação de fosfatos e nitrogênio. Ressalta-se a produção de produtos de limpeza contendo compostos polifosfatados, a partir de 1945, os quais começaram a ser liberados nos esgotos domésticos, juntamente com excrementos humanos, e a utilização excessiva de fertilizantes fosfatados e nitrogenados para incrementar a produção agrícola (ESTEVES, 2011).

No Brasil, os casos de eutrofização artificial estão relacionados, quase que totalmente, com o despejo de esgotos domésticos e industriais sem o devido tratamento (ESTEVES, 2011). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2011), na pesquisa realizada em 2008, apenas 55,1% dos

municípios brasileiros possuíam serviço de coleta de esgoto sanitário, sendo que grande parte do esgoto coletado não recebia tratamento adequado e somente 28,5% dos municípios realizavam o tratamento antes de lançá-lo nos corpos d'água.

A eutrofização artificial é responsável pelo desequilíbrio dos ecossistemas aquáticos e uma das consequências mais graves deste processo é a proliferação de algas, que compromete a qualidade da água, ocasionando mudança de cor, sabor e odor desagradáveis, além da redução na transparência e na concentração de oxigênio nas camadas inferiores da coluna d'água (SANCHES et al., 2012; ESTEVES, 2011). O aparecimento de florações tanto de algas como de cianobactérias, que formam extensas massas superficiais de coloração verde, possui uma incidência cada vez mais elevada no mundo e provoca alteração na biodiversidade aquática, incluindo a morte de organismos, além de representar um risco em potencial à saúde em função da natureza tóxica de algumas espécies (MARTINS, 2010; SANTOS; BRACARENSE, 2008).

### **3.2 Cianobactérias**

Cianobactérias, também chamadas de cianofíceas, são microrganismos procariontes, estruturalmente semelhantes às bactérias, e capazes de realizar a fotossíntese como as algas (GARCIA, 2013). Surgiram no planeta Terra há aproximadamente 3,5 bilhões de anos (SOARES, 1999) e se distribuem amplamente em diferentes ambientes, desde águas limpas e eutróficas, fontes termais, passando por ambientes hipersalinos e até de condições extremas, como geleiras e regiões desérticas (MARTINS, 2010; GARCIA, 2013). As florações de cianobactérias se desenvolvem preferencialmente em água doce, com temperatura elevada (25-30 °C) (SOARES, 1999), alta luminosidade e pH entre 6 e 9, além da abundância de nutrientes (MARTINS, 2010; SANTOS; BRACARENSE, 2008).

As cianobactérias podem ocorrer na forma unicelular, como nos gêneros *Aphanothece* e *Synechococcus*, ou em colônias de seres unicelulares como *Gomphospheria*, *Microcystis* e *Merismopedium*, ou ainda em células filamentosas

como *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* e *Nostoc* (SANCHES et al., 2012).

As florações de cianobactérias implicam riscos à biota aquática e à saúde humana, pois cerca de 50 a 75% das florações apresentam diversas espécies potencialmente produtoras de toxinas, e se tornam mais preocupantes quando ocorrem em áreas de reservatório e outros corpos d'água empregados para o consumo humano e/ou de animais, podendo causar sérios danos (MARTINS, 2010). As espécies tóxicas encontradas no Brasil são principalmente dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix* e *Aphanocapsa* (GARCIA, 2013).

Muitos estudos relatam que as cianobactérias produzem a maioria das toxinas sob condições que favorecem o seu crescimento. As cianotoxinas geralmente permanecem dentro das células e são liberadas na água após a lise celular, que acontece durante estresse celular, morte natural e uso de alguns algicidas (GARCIA, 2013).

A análise da água em relação às cianobactérias é de extrema importância, pois no Brasil já foram relatados casos de intoxicação provocados pelo consumo de água com cianotoxinas. O mais conhecido ocorreu em 1996, em uma clínica de Caruaru-PE em que dos 123 pacientes renais crônicos submetidos a tratamento de hemodiálise, 54 faleceram (MARTINS, 2010). Segundo a Secretaria da Saúde, a clínica recebia água sem tratamento completo (MARTINS, 2010) e a água estava contaminada com a cianotoxina microcistina-LR, que possui uma ação mais potente quando aplicada diretamente na corrente sanguínea do que quando ingerida (SANCHES et al., 2007).

Em função dos acontecimentos de intoxicação, foi lançada a Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000 pelo Ministério da Saúde que estabeleceu padrões de potabilidade e procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano, incluindo a obrigatoriedade do monitoramento de cianobactérias (BRASIL, 2000).

Em 2004, essa portaria foi substituída pela Portaria nº 518 e a mais recente é a Portaria nº 2914 de 2011, que estabelece a frequência de monitoramento de cianobactérias em manancial de abastecimento de água. A análise mensal é exigida para o número máximo de  $10.000 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$  e semanal, quando o número de cianobactérias exceder este valor. Acima de  $20.000 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ , exige-se análise

semanal de cianotoxinas no ponto de captação. Para o controle da microcistina, que é a toxina mais conhecida produzida por cianobactérias, a concentração máxima permitida é de  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (BRASIL, 2011).

Os programas de monitoramento são fundamentais e têm alertado as autoridades sobre a presença de cianobactérias que liberam cianotoxinas na água e dos potenciais riscos que podem provocar (SANCHES et al., 2012).

### 3.3 Cianotoxinas

As toxinas produzidas por cianobactérias são conhecidas como cianotoxinas e definidas como endotoxinas (SOARES, 1999). São metabólitos secundários à formação dos fotopigmentos que apresentam uma eficiente atividade, capazes de induzir patologias graves mesmo após curtos períodos de exposição (MARTINS, 2010). As cianotoxinas podem ser classificadas, de acordo com as propriedades toxicológicas, em dermatotoxinas (irritantes ao contato), neurotoxinas e hepatotoxinas (SANTOS; BRACARENSE, 2008).

As dermatotoxinas são lipopolissacarídeos presentes na membrana externa da parede celular das cianobactérias. A sua toxicidade não é tão elevada e manifesta-se pelo contato com a pele ou mucosas corporais, desenvolvendo-se uma reação alérgica (MARTINS, 2010).

As neurotoxinas possuem um elevado grau de toxicidade, são classificadas estruturalmente como alcalóides e afetam o sistema neuromuscular. Seu modo de ação consiste principalmente em bloquear o impulso nervoso, causando a morte por insuficiência cardíaca e/ou respiratória. A produção dessas toxinas já foi observada em espécies dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* e *Lyngbia* e, em geral, englobam saxitoxina, anatoxina-a e anatoxina-a(s) (MARTINS, 2010).

As hepatotoxinas são peptídeos cíclicos que atuam por inibição das fosfatases protéicas PP1 e PP2A das células hepáticas. São responsáveis pela destruição da estrutura interna do órgão, levando em uma situação extrema, à hemorragia intra-hepática, choque hipovolêmico e morte. Os sintomas observados



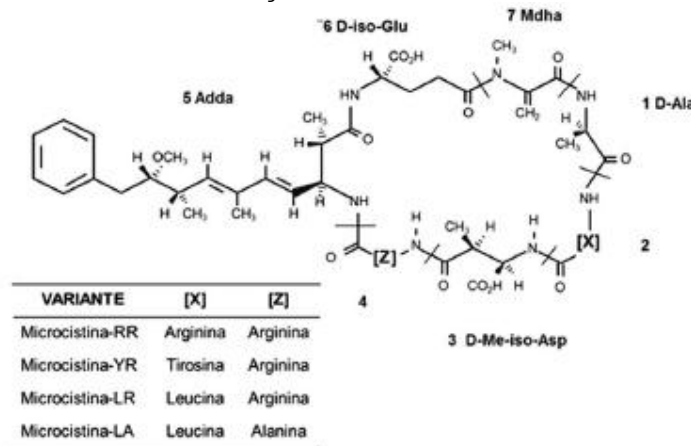
após a ingestão dessas hepatotoxinas são fraqueza, anorexia, dor abdominal, vômitos e diarreia, e a exposição crônica pelo consumo de água contaminada pode aumentar o índice de câncer hepático. A produção de hepatotoxinas já foi detectada em espécies dos gêneros *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Cylindrospermopsis* e incluem as microcistinas e a nodularina (MARTINS, 2010).

### 3.3.1 Microcistinas

As microcistinas (MCs) são as cianotoxinas mais frequentemente encontradas nas florações de cianobactérias em águas doces e em reservatórios de todo o mundo, e, conseqüentemente, as mais estudadas. Essa hepatotoxina é produzida principalmente pela espécie *Microcystis aeruginosa*, e estruturalmente caracterizada por heptapeptídeos monocíclicos (SANCHES et al., 2012; MARTINS, 2010).

As microcistinas são compostas por uma D-alanina (D-Ala) na posição 1, dois L-aminoácidos variáveis (X e Z) nas posições 2 e 4, ácido glutâmico (D-Glu) na posição 6 e três aminoácidos incomuns: ácido D-eritro- $\beta$ -metil-aspártico (D-MeAsp) na posição 3; ácido (2s, 3s, 8s, 9s)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico (Adda) na posição 5 e N-metil-deidroalanina (Mdha) na posição 7 (MARTINS, 2010). O aminoácido Adda é considerado responsável pela atividade biológica da molécula, em função da sua interação com as proteínas fosfatases. Já o Mdha é importante por formar uma ligação covalente irreversível com estas mesmas proteínas (SOARES, 1999). A estrutura química geral das microcistinas é mostrada na Figura 1.

**Figura 1 - Estrutura geral de microcistinas e as principais variações encontradas em florações tóxicas**



**Fonte: Cassini, Antunes e Keller (2013).**

A nomenclatura das microcistinas foi proposta por Carmichael et al. (1988), sendo que apenas as variações qualitativas observadas em seus dois L-aminoácidos foram utilizadas para denominação e identificação. Por exemplo: microcistina-LR (leucina- arginina); microcistina-LA (leucina-alanina); microcistina-YR (tirosina-arginina); microcistina-YA (tirosina-alanina); microcistina-RR (arginina-arginina), entre outros (LEAL; SOARES, 2004; CARMICHAEL et al., 1988). Atualmente, mais de 80 isoformas de microcistinas são conhecidas e se diferem principalmente pela sequência peptídica dos L-aminoácidos e também através do grau de hidroxilação, metilação e epimerização da molécula (KIST, 2012). A microcistina-LR (MC-LR) é considerada a mais tóxica e de maior distribuição (MARTINS, 2010).

As microcistinas apresentam grande estabilidade e resistência à hidrólise, à oxidação em pH próximo da neutralidade e à temperatura, pois mantêm sua toxicidade mesmo após a fervura (VILELA, 2009). Agem principalmente inibindo irreversivelmente as fosfatases proteicas de serina/treonina do tipo 1 e 2 (PP1 e PP2A) (MARTINS, 2010). A inibição dessas enzimas ocasiona o aumento da fosforilação de proteínas, que está relacionado com a atividade citotóxica e promotora de tumores (KIST, 2012).

A exposição crônica a pequenas doses dessas toxinas pode favorecer o desenvolvimento de câncer hepático, pois o mecanismo de fosforilação e desfosforilação das proteínas desempenha um importante papel no processo de divisão celular. Deste modo, a hiperfosforilação protéica estimula a proliferação celular e as microcistinas são consideradas promotoras de carcinogênese, como foi verificado nos estudos realizados por Nishiwaki-Matsushima et al. (1992). Ressalta-se que essas toxinas podem não iniciar a formação de um câncer, porém, se as modificações já tiverem se iniciado, elas podem acelerar o desenvolvimento de tumores (agentes promotores) (CARMICHAEL, 1994).

Em exposições agudas, esse grupo de toxinas atinge os hepatócitos (células do fígado), através de receptores de ácidos biliares, e provoca a desorganização do citoesqueleto. Como consequência, o órgão desenvolve uma série de lesões e em minutos ou horas, ocasiona choque hipovolêmico devido a retenção de sangue pelo fígado (hemorragia intra-hepática) ou insuficiência hepática, em algumas horas ou dias (SANTOS; BRACARENSE, 2008; CARMICHAEL, 1994).

No trabalho de Weng et al. (2007), foi salientado que a microcistina-LR é responsável pela indução de apoptose de hepatócitos e pela destruição da arquitetura hepática, ainda que os mecanismos envolvidos não estejam totalmente esclarecidos.

Dependendo da dose, tempo de exposição e do organismo, recentemente foi atribuído às microcistinas a capacidade de provocar tanto um aumento como também uma redução na atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona redutase (GR), a glutatona peroxidase (GPx), e a glutatona-S-transferase (GST). A exposição às MCs pode resultar em uma geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e desencadear o estresse oxidativo (SANTOS; BRACARENSE, 2008; KIST, 2012).

### 3.4 Ecotoxicidade da microcistina-LR

Testes ecotoxicológicos vêm sendo amplamente utilizados desde os anos 1970 no monitoramento e avaliação da qualidade de águas e efluentes por órgãos ambientais de vários países. A análise ecotoxicológica permite identificar as substâncias químicas, isoladas ou em forma de misturas, que são nocivas, e como e onde seus efeitos se manifestam, bem como suposições indiretas do seu risco para o meio ambiente (KNIE; LOPES, 2004).

A ideia de utilizar organismos representativos de ambientes aquáticos nos testes para o controle ambiental foi propagada progressivamente. Muitas espécies se mostraram potencialmente aptas para esse monitoramento. Os critérios da escolha das espécies representativas foram, principalmente, as boas experiências com seu manuseio e a sua relevância na cadeia alimentar, além da sua fácil disponibilidade e ampla dispersão. Dentre os organismos escolhidos, são muito utilizados microcrustáceos como *Daphnia magna* e peixes como *Danio rerio*, entre outros (KNIE; LOPES, 2004).

Muitos estudos têm demonstrado que as cianotoxinas exercem efeitos nocivos para vários organismos aquáticos, como efeitos agudos (imediatos) que incluem letalidade e imobilidade, e crônicos (maior tempo de exposição) como diminuição no crescimento e fecundidade. Efeitos bioquímicos envolvendo alteração na atividade de enzimas fosfatases e efeitos comportamentais também já foram relatados (FILHO, 2009).

Em *Daphnia magna*, a toxicidade da microcistina-LR (MC-LR) foi estudada por Dao, Do-Hong e Wiegand (2010), que observaram que as daphnias são afetadas em relação à diminuição de absorção de alimento, inibição de proteases digestivas e letalidade, além do desenvolvimento de tolerância a essas toxinas. Após a exposição crônica de duas gerações do microcrustáceo a 5 ou 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de MC-LR, os resultados indicaram que a menor concentração afetou levemente o crescimento e a reprodução das daphnias mãe (primeira geração). A sobrevivência diminuiu durante a exposição crônica com o aumento na concentração de microcistina. A idade para maturação da segunda geração (filhotes) aumentou, e a sobrevivência diminuiu depois que os pais foram expostos à toxina, mesmo que

eles tenham crescido em um meio controle. Além disso, foi observado uma inibição de ovos/embriões e má formação nos recém nascidos.

Em peixes, a microcistina também pode causar efeitos deletérios como distúrbios na regulação iônica, danos hepáticos, mudanças comportamentais e mortalidade, entre outros (SANCHES et al., 2012). Martins (2010) analisou os efeitos cardio-respiratórios de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) após 48 h de injeção intraperitoneal de microcistina-LR ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de peso corpóreo). Os resultados obtidos indicaram alteração nos mecanismos homeostáticos, impossibilitando a manutenção de uma resposta respiratória normal frente à hipóxia ambiental (baixa concentração de oxigênio em ambientes aquáticos), reduzindo as chances de sobrevivência nesses ambientes. A MC-LR também apresentou efeito direto sobre o tecido cardíaco, o que provavelmente causou a diminuição da frequência cardíaca dos peixes expostos.

Em outro teste experimental agudo (72 h) com tilápias (*O. niloticus*), Santos et al. (2007) obtiveram resultados que mostram estímulo à proliferação de hepatócitos nos peixes expostos à microcistina, que é considerada promotora tumoral.

Jos et al. (2005) e Prieto et al. (2006) relataram que o estresse oxidativo provocado pela microcistina-LR causa uma intensa peroxidação lipídica do fígado, rim e brânquias de tilápias (*Oreochromis sp.*), e também aumenta a atividade das enzimas superóxido dismutase e da catalase.

#### 3.4.1 *Danio rerio*

*Danio rerio* (*Teleostei, Cyprinidae*) é um peixe tropical de água doce e de origem asiática. A espécie é internacionalmente conhecida como “zebrafish”, pois possui coloração prateada com listras azul-escuras (Figura 2). No Brasil, é também conhecido como paulistinha. Desde os anos 1930 *D. rerio* é muito utilizado em pesquisas científicas e, portanto, um dos peixes mais estudados, por ser capaz de

se adaptar facilmente a diferentes condições ambientais naturais e artificiais (KNIE; LOPES, 2004).

**Figura 2 - *Danio rerio***



**Fonte: Fish, Tanks and Ponds (2016).**

Esses peixes são onívoros, vivem em média três anos e atingem comprimento máximo de 5 cm. Possuem comportamento pacífico e muito ativo. Na natureza vivem em cardumes e por este motivo podem ser mantidos num mesmo aquário em número relativamente grande (KNIE; LOPES, 2004).

Muitos aspectos favorecem o uso de *Danio rerio* em testes de toxicidade: disponibilidade comercial em muitos países; reconhecimento internacional como espécie para uso em ensaios ecotoxicológicos; fácil cultivo em laboratório; sensibilidade satisfatória para diversas substâncias químicas; e resistência a amplas variações de temperatura, de dureza e pH da água (KNIE; LOPES, 2004).

Existem alguns estudos em que foram avaliados efeitos agudos da microcistina-LR sobre parâmetros comportamentais em *zebrafish*. Baganz, Staaks e Steinberg (1998) verificaram que a exposição à MC-LR causou mudanças de efeito dose dependente na atividade locomotora espontânea dos peixes. Exposições a baixas concentrações (0,5 e 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) causaram um aumento na mobilidade no período diurno e concentrações maiores (15 e 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) levaram a uma redução significativa da mobilidade. Ao contrário das atividades diárias, o aumento das atividades noturnas de nado ocorreu nas maiores concentrações de MC-LR à que os organismos foram expostos. Além disso, na maior concentração de exposição (50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) também verificou-se diminuição na atividade da desova.

Kist et al. (2011) relataram que a exposição à  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de MC-LR diminuiu significativamente a distância percorrida e houve um aumento no tempo de imobilidade quando comparado ao controle, enquanto a exposição à  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  não modificou estes parâmetros nos peixes. Foi realizado também um teste de interação social, e os resultados mostram que as concentrações  $50$  e  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de MC-LR não promoveram nenhuma alteração nos animais em relação a este comportamento.

Efeitos da microcistina-LR em biomarcadores bioquímicos também foram observados em peixes. Wiegand et al. (1999) estudaram a atividade de duas enzimas de detoxificação (GST e GPx) e mostraram a relação existente entre a absorção de MC-LR em estágios larvais de *D. rerio* e o aumento da atividade enzimática. Portanto, efeitos crônicos, como redução no crescimento em estágios embrionários, podem estar associados ao aumento da demanda energética envolvida no processo de detoxificação.

### **3.5 Biomarcadores Bioquímicos**

Os biomarcadores são definidos, em termos ecotoxicológicos, como uma alteração em resposta biológica que reflete os efeitos tóxicos de substâncias químicas. Podem ser usados para identificar as interações entre os contaminantes e os organismos vivos e indicar os efeitos crônicos ou subletais. Recentemente tem crescido o interesse pela análise de biomarcadores em programas de avaliação de contaminação ambiental (OLIVEIRA, 2014).

O uso de biomarcadores bioquímicos em programas de monitoramento possui algumas vantagens: geralmente são os primeiros a serem detectados, são suficientemente sensíveis à presença de contaminantes, exibem alta especificidade e baixo custo de análise, além de fornecerem informações sobre o efeito metabólico causado pelo xenobiótico (substância química estranha ao sistema biológico) (MARTINEZ, 2006).

Vários parâmetros bioquímicos de peixes são utilizados como biomarcadores em função das respostas apresentadas a substâncias tóxicas. Dentre os biomarcadores bioquímicos, os mais amplamente analisados são as enzimas

envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, ou seja, as enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante (MARTINEZ, 2006).

### 3.5.1 Glutathione-S-transferase (GST)

As enzimas de biotransformação estão presentes em todos os animais, cuja função principal é catalisar a transformação de xenobióticos orgânicos lipossolúveis em metabólitos hidrossolúveis mais facilmente eliminados (LIVINGSTONE, 1998). Essas proteínas também realizam funções adicionais no processo de detoxificação. Em peixes, o fígado é a principal fonte de GST, onde corresponde a uma grande parte das proteínas hepáticas solúveis (MARTINEZ, 2006).

A GST é responsável por catalisar a conjugação da molécula glutathione reduzida (GSH) com diferentes xenobióticos ou componentes celulares deteriorados pela ação de espécies reativas de oxigênio (STOREY, 1996).

Em alguns estudos já foi mencionado o aumento na atividade hepática dessa enzima em peixes expostos a contaminantes orgânicos (MARTINEZ, 2006), o que pode estar relacionado com o processo adaptativo do organismo à presença de diversos compostos orgânicos no ambiente (GALLAGHER et al., 2001). No entanto, a redução da atividade de GST em peixes de locais poluídos e expostos a pesticidas também já foi relatada (VAN DER OOST et al., 2003), indicando que os resultados deste biomarcador bioquímico devem ser analisados com cautela.

### 3.5.2 Glutathione reduzida (GSH)

Os parâmetros de estresse oxidativo também representam um grupo importante de biomarcadores. O estresse oxidativo é provocado por um desequilíbrio



entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e os sistemas antioxidantes do organismo (OLIVEIRA, 2014).

A biotransformação de xenobióticos é uma importante causa do surgimento de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies são potentes oxidantes capazes de reagir com macromoléculas celulares críticas, promovendo diferentes tipos de danos biológicos que podem provocar a morte celular (MARTINEZ, 2006).

A glutatona reduzida é uma molécula não-enzimática que participa do sistema de defesa antioxidante sequestrando EROs e, dessa forma, protege as células contra danos oxidativos (MEISTER, 1988). Possui baixa massa molecular e pode ser empregada como biomarcador, pois responde à contaminação ambiental com variações na sua concentração (MARTINEZ, 2006). Em peixes expostos a poluentes, a redução da concentração de GSH corresponde a uma reação aguda, enquanto o aumento indica uma adaptação ao aumento da atividade de detoxificação (VAN DER OOST et al., 2003).

### **3.6 Biomarcadores genéticos**

Muitos componentes moleculares e celulares em peixes vêm sendo utilizados como biomarcadores, e dentre os parâmetros genéticos, destacam-se as quebras e alterações na estrutura do DNA (RAMSDORF, 2007).

Danos na desoxirribose, que frequentemente resultam em quebras nas fitas, podem acontecer em decorrência da oxidação do DNA. A detecção de fragmentações nas cadeias de DNA representa uma técnica importante da ecotoxicologia, pois tem apresentado maior sensibilidade do que outros métodos empregados na análise de danos no material genético (LEE; STEINERT, 2003). O ensaio cometa tem sido muito utilizado para verificar a genotoxicidade de substâncias e investigar efeitos na integridade do DNA, reparo e recuperação em espécies de importância ambiental (RAMSDORF, 2007).

Os danos no material genético, ao nível celular individual, são avaliados através da verificação da migração em gel do DNA de células após uma corrida eletroforética (RAMSDORF, 2007). A denominação cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados depois da passagem de corrente elétrica (BOMBAIL et al., 2001).

O princípio deste ensaio está baseado no fato de que o DNA da célula que não apresentar dano migrará de maneira homogênea formando um círculo, enquanto para o DNA que apresentar dano, fragmentos de diversos tamanhos serão formados, de modo que os fragmentos menores migrem mais rapidamente que os fragmentos maiores com a corrente elétrica. Quando ocorre um dano intenso, muitos fragmentos de vários tamanhos serão formados e migrarão em velocidades distintas, gerando a imagem típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990).

Entretanto, a ocorrência de quebras no material genético não pode ser atribuída a uma exposição específica e, então, pode não estar diretamente associada com a genotoxicidade de uma substância química. Dessa forma, a não especificidade do ensaio cometa é compensada pela alta sensibilidade e aplicabilidade a inúmeros tipos de células, tornando-o ideal para o monitoramento ambiental (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Outra limitação na detecção das quebras refere-se aos mecanismos de reparo que podem atuar antes das análises. Porém, o reparo do DNA em organismos aquáticos ocorre mais lentamente, em comparação às células de mamíferos, o que pode ser vantajoso na verificação de quebras em peixes (ESPINA; WEISS, 1995).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Cultivo de *Microcystis aeruginosa* e preparação dos extrato brutos

O cultivo da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* foi realizado no Laboratório de Limnologia, Ecologia e Cromatografia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, a partir de um inóculo da cepa BB005 fornecida pelo Prof. Dr. Armando Augusto H. Vieira, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos. Este organismo foi isolado de florações ocorridas do reservatório de Barra Bonita em São Paulo.

As condições de cultivo em laboratório basearam-se em estudos realizados por Soares, Magalhães e Azevedo (2004) e Jiang et al. (2008), em que foram mantidos: fotoperíodo de 14 horas claro e 10 horas escuro, luminosidade de aproximadamente 2400 lux e temperatura entre 23 e 30 °C.

A *Microcystis aeruginosa* foi cultivada em meio de cultura líquido ASM-1 (Anexo A). Depois de preparado, o meio teve o pH corrigido para 7,4 com solução de NaOH 0,5 mol·L<sup>-1</sup>, e foi autoclavado por 20 minutos a 120 °C (OLIVEIRA, 2009).

Foram realizados dois cultivos de *M. aeruginosa*, cada um em 2 erlenmeyers de 2 L contendo 1,8 L de meio de cultura e com inóculo de cultivos anteriores, com uma densidade celular inicial de 1x10<sup>5</sup> células·mL<sup>-1</sup>. O desenvolvimento dos cultivos aconteceu por 21 dias, sob as condições previamente descritas, em que atingiram densidade celular de 1 a 2x10<sup>6</sup> células·mL<sup>-1</sup>, que foi conferida por contagem em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico. O tempo para atingir essa densidade foi verificado após estudo cinético do crescimento da *M. aeruginosa* (MICHELETTO, 2016, dados não publicados). Os erlenmeyers foram abertos somente dentro de câmara de fluxo laminar para manter a assepsia do cultivo.

Dois extratos brutos foram preparados: extrato com meio ASM-1 e extrato sem meio ASM-1 (para retirar a possível influência do meio de cultivo e analisar melhor o extrato). Para retirar o meio ASM-1 um dos cultivos de *M. aeruginosa* foi centrifugado a 10.000 xg e 10 °C durante 20 minutos e o

sobrenadante descartado. Em seguida, o *pellet* formado foi lavado 2 vezes com solução de cloreto de sódio 0,1%, para retirada total do meio de cultivo. Por fim, o *pellet* de *M. aeruginosa* foi resuspendido em 3,6 L de água de osmose, a fim de obter o volume inicial do cultivo. Para o extrato bruto com meio ASM-1, foi utilizado o outro cultivo desenvolvido sem modificações. Em seguida, ambos foram fracionados em garrafas PET (500 mL) previamente limpas, e submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento para o rompimento das células e, conseqüentemente, a liberação da cianotoxicina (microcistina-LR) para o meio extracelular (SILVEIRA, 2012). Os extratos foram mantidos a -20°C até serem utilizados.

#### **4.2 Quantificação de microcistina-LR nos extratos brutos**

Primeiramente, foi realizado o preparo das amostras por extração em fase sólida (SPE), segundo método descrito por Micheletto (2016, dados não publicados).

A concentração de microcistina-LR presente nos extratos brutos foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD), segundo metodologia desenvolvida e validada por Torres (2016).

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência Prominence (Shimadzu) equipado com bomba quaternária LC-2AT, forno CTO-20A, degaseificador DGU-20A, detector (DAD) SPD-M20A e controladora CBM-20A. Este sistema é operado através do programa LCSolutions. Utilizou-se coluna analítica com fase estacionária de octadecilsílica polimérica, com partículas de 3,4 µm (XTerra, Waters), 3 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento, e pré-coluna C18 (Phenomenex).

O método empregado consiste dos seguintes parâmetros: volume de injeção de 50 µL e fase móvel composta de solução de ácido trifluoracético 0,05% v/v (Himedia), como solvente A; e metanol (J. T. Baker) filtrado em membrana de PTFE 0,45 µm (Unifil) como solvente B; vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; temperatura 35 °C. A separação foi realizada por método com eluição gradiente, da seguinte forma:

concentração inicial de 50% de solvente B mantida isocraticamente por 50 min, seguida de gradiente de limpeza de 50 a 100% de solvente B em 2 min, mantendo-se em 100% por 20 min e retorno à condição inicial em 2 min. As separações foram obtidas no intervalo de 190 a 450 nm e os cromatogramas foram monitorados a 238 nm, que representa o máximo de absorção das microcistinas análogas.

As concentrações de microcistina-LR encontradas foram: 81,66  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  no extrato com meio ASM-1 e de 20,60  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  no extrato sem meio ASM-1.

### 4.3 Manejo e cultivo dos organismos-teste

Os ensaios com peixes foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) (Anexo B).

Os peixes da espécie *Danio rerio* foram adquiridos em comércio local (54 peixes) e aclimatados por 32 dias em 2 aquários de vidro (25 L), contendo 15 L de água filtrada e decolorada, aeração constante, temperatura controlada a  $26\pm 1^\circ\text{C}$ , mantida por termostato, ambiente tranquilo e iluminação ajustada ao ritmo dia/noite de 12/12 horas (KNIE; LOPES, 2004).

A água de cultivo apresentou dureza de 50 a 60  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ , como o recomendando pela NBR 15088:2011, de 10 a 60  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ , sendo o limite máximo de 300  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ; oxigênio dissolvido acima de 90% de saturação e pH de 7,7 a 8,2, mensurado diariamente por meio de pHmetro (KNIE; LOPES, 2004).

Diariamente, as sujidades e restos de alimentos depositados no fundo do recipiente de cultivo foram retirados por sifonamento e os peixes alimentados (manhã e tarde) com ração comercial apropriada (Vipan Sera em flocos), e para os finais de semana uma quantidade adicional de alimento foi fornecida (KNIE; LOPES, 2004).

#### 4.4 Exposição aos extratos brutos de *M. aeruginosa*

O ensaio agudo estático foi realizado durante 48 horas, onde os peixes foram expostos aos extratos brutos de *Microcystis aeruginosa* por via hídrica. Os animais foram divididos em 6 béqueres de 2 L, contendo 1,5 L de amostra e 5 indivíduos em cada recipiente, seguindo a relação de 1 g de peixe·L<sup>-1</sup>, considerando que o peso médio de *Danio rerio* é 0,3 g (KNIE; LOPES, 2004). Foram utilizados 2 béqueres para o controle com água filtrada e decolorada, 2 béqueres para o extrato centrifugado (sem meio ASM-1) e 2 béqueres para o extrato com meio ASM-1, como pode ser visualizado na Figura 3, da direita para esquerda. Dessa forma, os peixes 1 a 10 pertencem ao grupo controle, 11 a 20 ao grupo 1 (sem meio ASM-1) e 21 a 30 ao grupo 2 (com meio ASM-1).

**Figura 3 - Exposição dos peixes às amostras**



Fonte: Autoria própria.

#### 4.5 Análise dos biomarcadores bioquímicos

Os ensaios foram realizados baseados em metodologia descrita por Ramsdorf (2011). Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados utilizando benzocaína 10% (via hídrica). Posteriormente, foi feita uma secção separando a cabeça do restante do corpo, e os tecidos (exceto a cabeça) foram acondicionados em tubos de microcentrífuga em banho de gelo e, em seguida, mantidos a -80 °C em ultrafreezer até homogeneização.

O corpo (exceto a cabeça) de cada exemplar foi homogeneizado com 1 mL de tampão fosfato de potássio pH 6,5 (0,1 M), utilizando um desagregador de tecidos (Ultra Stirrer, modelo Ultra 80) até completa homogeneização do material, e centrifugado a 10.000 xg por 20 minutos a 4 °C. Na sequência, o sobrenadante (homogenato) foi retirado e aliquoteado em microtubos para cada biomarcador: 50 µL para proteínas totais, 100 µL para GST e 200 µL para GSH. O material foi congelado em ultrafreezer (-80 °C) (RAMSDORF, 2011) e serviu como amostra para as análises, que foram realizadas em placas de microtitulação de 96 poços e a leitura das absorbâncias feita em leitor de microplacas (BMG Labtech, modelo FluoStar Omega). Ressalta-se que houve perda do material do peixe 18.

#### 4.5.1 Concentração de proteínas

O procedimento de quantificação de proteínas foi baseado no método de Bradford (1976). Inicialmente, os homogenatos (50 µL) foram descongelados (e mantidos em gelo) e 950 µL de tampão fosfato de potássio pH 7,5 (0,1 M) foi adicionado, e a mistura nos microtubos foi agitada em vortex. Como referência para a concentração de proteína, uma curva padrão com soro de albumina bovina (BSA, Sigma-Aldrich) foi desenvolvida separadamente. Para isso, uma solução de BSA 1000 µg·mL<sup>-1</sup> foi preparado (em água ultrapura) e diluído sucessivamente a 500, 250 e 125 µg·mL<sup>-1</sup> em microtubos, que foram mantidos em gelo.

O reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) utilizado já vem preparado, mas este deve ser diluído na proporção de 1:5 (em água ultrapura), e isso foi realizado em um béquer envolto por papel alumínio e no escuro.

Por fim, foram preparadas as microplacas de 96 poços, onde foi adicionado 10 µL de amostras (branco – água ultrapura, padrões de BSA e alíquotas dos peixes) em quadruplicata e 250 µL de reativo de Bradford, com a leitura da absorbância a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg·mL<sup>-1</sup> de proteínas totais.

A concentração de proteínas totais obtida foi utilizada nos cálculos dos biomarcadores bioquímicos descritos a seguir.

#### 4.5.2 Glutathione-S-transferase (GST)

O método utilizado para análise da atividade de GST foi baseado em estudo de Keen, Habig e Jakoby (1976), com modificações, em que a enzima GST catalisa a reação do substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a GSH (glutathione reduzida) e há a formação de um tioéter.

Os homogenatos (100 µL) foram descongelados (e mantidos em gelo) e 300 µL de tampão fosfato de potássio pH 6,5 (0,1 M) foram adicionados, e os microtubos agitados em vortex até completa homogeneização.

Posteriormente, foi calculada a quantidade da solução de reação necessária a ser preparada (quantidade excedente), considerando o número de amostras, replicatas e 200 µL por poço da microplaca. Então, foram preparadas as soluções que compõem o meio de reação: GSH (Sigma-Aldrich) 2,0 mM (em tampão fosfato de potássio 6,5) e CDNB (Sigma-Aldrich) 2,5 mM (em etanol P.A.). Em seguida, a solução de CDNB foi adicionada aos poucos à solução de GSH com constante agitação (em agitador magnético) e por fim, o volume inicial calculado foi completado com a adição de 26 mL de tampão fosfato de potássio 6,5, mantendo-se a agitação, até a obtenção de uma solução transparente que foi mantida em banho de gelo.

Para verificar a atividade global de GST, nas microplacas foram adicionados 50 µL das amostras, em quadruplicata, e 150 µL do meio de reação e a absorbância foi medida a 340 nm por 2 minutos, a cada 12 segundos. A atividade, em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteínas}^{-1}$ , foi calculada pela Equação (1) utilizando o *software* Excel, sendo 0,6 cm o caminho óptico percorrido pelo feixe de luz (200 µL),  $\epsilon$  do CDNB =  $9,6\text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$ , diluição do corpo = 4 (considerando 100 µL de homogenato + 300 µL de tampão = 400 µL/100 µL de homogenato) e [Proteínas Totais] = a concentração de proteínas em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

$$\text{Ativ. GST} = \frac{[(\Delta\text{Absorb}\cdot\text{min}^{-1})\div(0,6 \cdot \epsilon \cdot 1000)] \times \text{diluição do corpo}}{[\text{Proteínas Totais}]\div(\text{V total no poço} \div \text{V de amostra no poço})} \times 1000 \quad (1)$$



#### 4.5.3 Glutathiona reduzida (GSH)

O método empregado para análise da concentração de GSH foi baseado no estudo de Sedlak e Lindsay (1968). Ao volume de 200  $\mu\text{L}$  de homogenato foram acrescentados 50  $\mu\text{L}$  de TCA 50% (ácido tricloroacético, Neon), preparado em água ultrapura, e a mistura foi agitada em vortex e centrifugada durante 10 minutos a 10.000  $\times g$  e 4  $^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi mantido em gelo e utilizado como amostra.

Posteriormente, foi preparada a solução de GSH 800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , em tampão Tris-base (Hidroximetilaminometano) 0,4 M. Então, para obtenção da curva padrão, o GSH preparado foi diluído sucessivamente, em tampão Tris-base, nas concentrações de 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

O último reagente preparado foi o DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), Sigma-Aldrich) 2,5 mM e, por fim, as microplacas foram preparadas da seguinte maneira: 50  $\mu\text{L}$  de TCA 10% (diluindo o 50%) como branco e 230  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-base; 50  $\mu\text{L}$  dos padrões de GSH, 10  $\mu\text{L}$  de TCA 50% e 220  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-base; 50  $\mu\text{L}$  de amostra e 230  $\mu\text{L}$  do tampão Tris-base; e por último em todos os poços foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de DTNB. A absorbância foi lida em 450 nm e as análises foram realizadas em quadruplicata.

A concentração de GSH foi calculada através da Equação (2), em  $\mu\text{gGSH}\cdot\text{mg prote\acute{i}nas}^{-1}$ , utilizando o *software* Excel, sendo [Proteínas Totais] = a concentração de proteínas em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a diluição igual a 1,25 (considerando 200  $\mu\text{L}$  de homogenato + 50  $\mu\text{L}$  de TCA = 250  $\mu\text{L}/200 \mu\text{L}$  de homogenato) e o coeficiente angular obtido da curva padrão de GSH.

$$[\text{GSH}] = \frac{[(\text{Abs.m\acute{e}dia} - \text{Abs.Branco}) \div \text{Coef.angular}] \times \text{dilui\c{c}\~{a}o do corpo}}{[\text{Prote\acute{i}nas Totais}]} \quad (2)$$

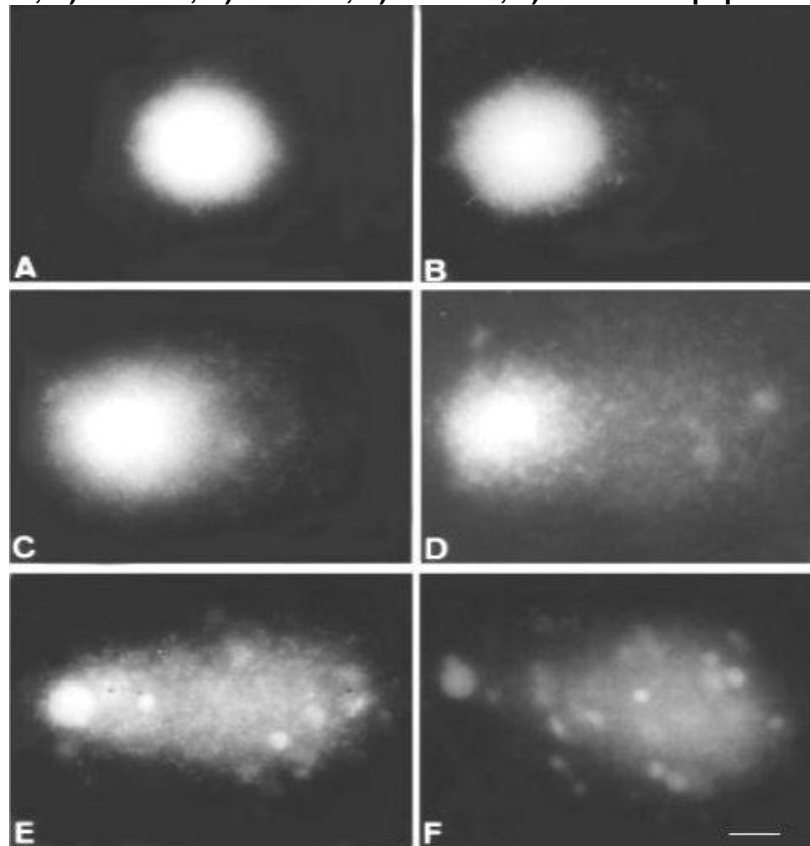
#### 4.6 Análise do biomarcador genético

Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados em benzocaína 10% (via hídrica). Em seguida, os exemplares de *Danio rerio* foram decapitados para coleta de sangue com micropipeta e o material coletado (aproximadamente 10  $\mu$ L) foi adicionado à microtubo contendo 200  $\mu$ L de soro bovino fetal, para a execução do ensaio cometa.

O método utilizado para o ensaio cometa (método alcalino) foi baseado no descrito por Speit e Hartmann (2005). Os procedimentos realizados estão descritos no APÊNDICE A.

Após preparação das lâminas, elas foram analisadas no microscópio de fluorescência, em que foram examinados visualmente 100 núcleos por lâmina. Os núcleos foram classificados, de acordo com o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética (Figura 4), em: 0 (ausência de cauda e de dano aparente), 1 (cauda pequena e dano pequeno), 2 (cauda média e dano médio), 3 (cauda maior que o diâmetro da cabeça e dano grande) e 4 (cauda muito extensa com cabeça muito reduzida e dano máximo). Em cada uma das classes, a quantidade de núcleos contabilizados foi multiplicada pelo numeral de sua classe (0, 1, 2, 3 ou 4), e a somatória desses resultados (totalizando os 100 núcleos) foi definida como o escore de cada indivíduo.

Figura 4 - Classificação dos núcleos no ensaio cometa: A) classe 0; B) classe 1; C) classe 2; D) classe 3; E) classe 4; F) célula em apoptose



Fonte: Silva et al. (2000).

#### 4.7 Análise estatística

Para o ensaio cometa, as medianas dos escores foram submetidas ao teste Kruskal-Wallis (para dados não paramétricos) no *software* BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007). Para os biomarcadores bioquímicos, análise de variância (ANOVA), para identificar se existem diferenças entre os grupos, e teste Tukey para verificar quais pares são diferentes, foram realizados pelo *software* GraphPad Prism. Os testes foram reconhecidos como estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

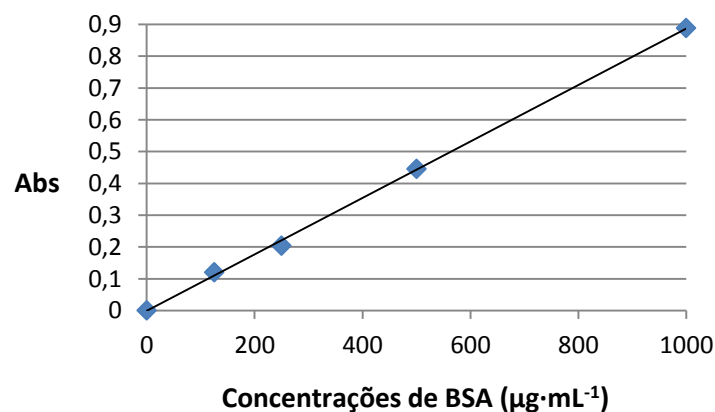
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Biomarcadores bioquímicos

#### 5.1.1 Concentração de proteínas

Inicialmente, a partir dos valores de absorvância das concentrações padrões de BSA, foi possível desenvolver a curva padrão do ensaio (Figura 5), em que foram utilizadas as médias das absorvâncias obtidas (descontando-se a média das absorvâncias do branco igual a 0,16575).

Figura 5 - Curva padrão de soro de albumina bovina



Fonte: Autoria própria.

Com a construção do gráfico no *software* Excel, obteve-se a equação da reta ( $y=ax+b$ ):  $y=0,0009x - 0,0014$  com  $r=0,9996$ , e a partir dela foram calculadas as concentrações de proteínas nas amostras, sendo que  $y$  representa o valor da absorvância, descontando-se a média das absorvâncias do branco igual a 0,17575, e  $x$  a concentração de proteínas. As médias das absorvâncias das amostras e as

concentrações calculadas (considerando a diluição do homogenato realizada no ensaio igual a 20) estão demonstradas na Tabela 1.

**Tabela 1 - Médias das absorbâncias e concentração de proteínas nas amostras. O grupo 1 representa os peixes que foram expostos ao extrato sem meio ASM-1 (20,60  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de MC-LR) e o grupo 2 ao extrato com meio ASM-1 (81,66  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de MC-LR)**

Grupos de exposição	Peixes	Médias das absorbâncias - Branco	Proteínas totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) x fator de diluição (20)	Proteínas totais ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Média das concentrações ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
Controle	1	0,2785	311,00	6220,00	6,22	6,63 $\pm$ 0,62
	2	0,3245	362,11	7242,22	7,24	
	3	0,2815	314,33	6285,67	6,29	
	4	0,2912	325,17	6503,33	6,50	
	5	0,3562	397,39	7947,78	7,95	
	6	0,2980	332,67	6653,33	6,65	
	7	0,2740	289,05	6120,00	6,12	
	8	0,2587	337,39	5781,11	5,78	
	9	0,3022	342,11	6747,78	6,75	
	10	0,3065	327,11	6842,22	6,84	
Grupo 1	11	0,2642	295,17	5903,33	5,90	6,79 $\pm$ 0,67
	12	0,2620	292,67	5853,33	5,85	
	13	0,3402	379,61	7592,22	7,59	
	14	0,3122	348,50	6970,00	6,97	
	15	0,3022	337,39	6747,78	6,75	
	16	0,2882	321,83	6436,67	6,44	
	17	0,3410	380,72	7614,44	7,61	
	18	-	-	-	-	
	19	0,3342	372,94	7458,89	7,46	
	20	0,2942	328,50	6570,00	6,57	
Grupo 2	21	0,2582	288,50	5770,00	5,77	6,30 $\pm$ 0,85
	22	0,3000	335,17	6703,33	6,70	
	23	0,3122	348,50	6970,00	6,97	
	24	0,3092	345,17	6903,33	6,90	
	25	0,2082	232,94	4658,89	4,66	
	26	0,3352	374,05	7481,11	7,48	
	27	0,2732	305,17	6103,33	6,10	
	28	0,2562	286,28	5725,55	5,73	
	29	0,3122	348,50	6970,00	6,97	
	30	0,2572	287,39	5747,78	5,75	

Os valores de concentração de proteínas ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) obtidos por grupo de exposição foram analisados por ANOVA, e não houve variância entre o controle e os grupos 1 e 2, pois  $p=0,3313$ , indicando que os organismos utilizados possuem quantidades semelhantes de proteínas totais. Estes valores foram utilizados nos cálculos dos biomarcadores bioquímicos GST e GSH.

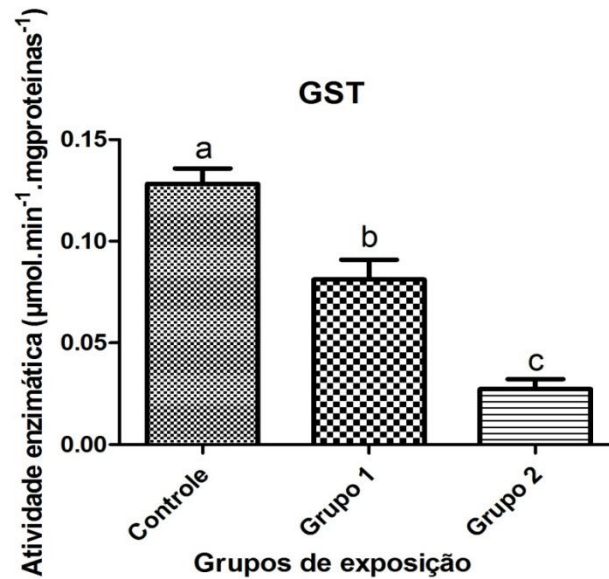
### 5.1.2 Glutathione-S-transferase (GST)

Para verificar a atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST), foram calculadas as médias das absorbâncias dos tempos de leitura e obtidas as variações correspondentes a 1 minuto (120 s – 60 s). Os valores de atividade obtidos, por grupo de exposição, podem ser visualizados na Figura 6.

Estaticamente, os grupos apresentaram variância através do teste ANOVA ( $p=0,0000323$ ) e pelo teste Tukey o controle mostrou-se significativamente maior ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo 1 e ao grupo 2, o que indicou uma inibição da atividade da enzima GST nos organismos expostos às duas concentrações de MC-LR presentes nos extratos. Ressalta-se que não se pode atribuir o efeito dos extratos nos organismos apenas a microcistina-LR, pois as cepas de cianobactérias podem produzir mais de 1 tipo de cianotoxinas, mas a partir do perfil cromatográfico dos extratos (dados não mostrados) sabe-se que a MC-LR é o componente majoritário e sua concentração foi quantificada. Entre os grupos 1 e 2 também houve diferença, sendo o grupo 1 significativamente maior que o grupo 2 ( $p < 0,01$ ), indicando que na concentração mais elevada de MC-LR ( $81,66 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) houve maior inibição da atividade enzimática.

Esta supressão na atividade pode ser atribuída a efeitos secundários devido à inibição do substrato. É sugerido que a inibição de uma enzima devido ao substrato pode ser caracterizada por uma modificação covalente da enzima que conduz à uma perda irreversível de atividade. Alternativamente, atividades menores de enzimas podem ser causadas por uma diminuição na síntese das proteínas a nível molecular (EGAAS et al., 1999; GALLAGHER; SHEEHY, 2000).

Figura 6 - Atividade de Glutathione-S-transferase. As letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), utilizando o teste Tukey



Fonte: A autoria própria.

Conforme relatado por Pflugmacher et al. (1998), a enzima GST catalisa a conjugação de MCs com glutathione em vários organismos aquáticos. Além disso, o conjugado formado é solúvel em água e pode assim ser eliminado do corpo do peixe. Uma elevação na atividade de GST sugere assim que uma maior formação de conjugado entre GST e MCs e a subsequente eliminação de MCs tende a acontecer. Por outro lado, uma diminuição na atividade da enzima potencialmente pode resultar em efeitos bioquímicos nos organismos expostos a MCs, conduzindo à bioacumulação acompanhada por danos celulares e alterações fisiológicas e comportamentais (BAGANZ et al., 2004; MALBROUCK et al., 2003).

No estudo realizado por Pavagadhi et al. (2012), peixes adultos da espécie *Danio rerio* foram expostos a diferentes concentrações de MC-LR: 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dissolvidas na água do aquário. Após exposição por 96 horas (aguda), a atividade de GST foi analisada em guelras, fígado, intestino e cérebro, sendo que na concentração de 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  foi observado o nível mais elevado da atividade de GST no intestino e outros tecidos. No intestino não houve diferença significativa em relação ao controle a partir de 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e nos demais tecidos houve

uma diminuição da atividade enzimática nas concentrações mais elevadas (1,0; 5,0 e 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

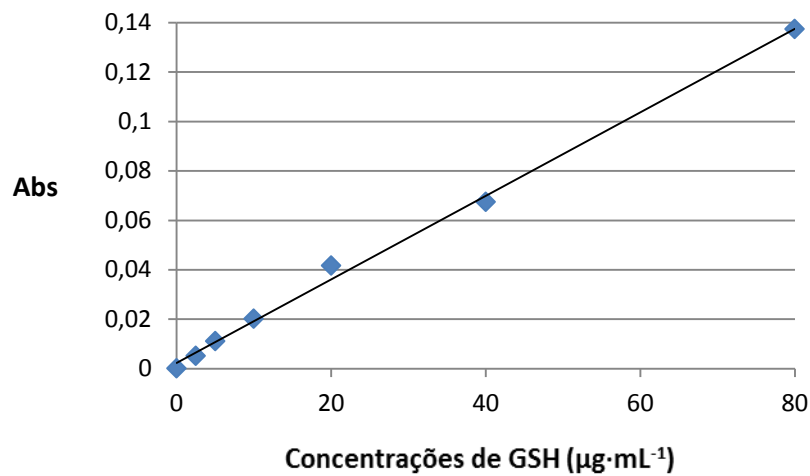
Wiegand et al. (1999) relataram um aumento dose-dependente na atividade de GST em relação ao desenvolvimento ontogenético para embriões de peixe-zebra (de 0,1 a 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de MC-LR). Entretanto, observou-se que a concentração mais elevada (5,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) suprimiu a atividade de GST. A resposta dose-dependente da atividade de GST parece mostrar que os embriões de *Danio rerio* são capazes de suportar MC-LR até cerca de 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , mas que não podem tolerar concentrações mais elevadas com este sistema enzimático. Este resultado sugere que a resposta bioquímica de peixes adultos, obtido no presente trabalho, é bastante semelhante à dos embriões em relação à GST.

A atividade de GST observada neste estudo, comparando os grupos 1 e 2 em que a atividade de GST em concentração de 81,66  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  MC-LR apresentou uma atividade significativamente mais baixa que a concentração de 20,60  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  corrobora com os resultados relatados por Pavagadhi et al. (2012) e Wiegand et al. (1999), que observaram redução da atividade enzimática em maiores concentrações de MC-LR analisadas.

### 5.1.3 Glutathiona reduzida (GSH)

A curva padrão do ensaio (Figura 7) foi obtida a partir das médias das absorbâncias (descontando-se a média das absorbâncias do branco igual a 0,044333), de cada concentração utilizada de GSH.

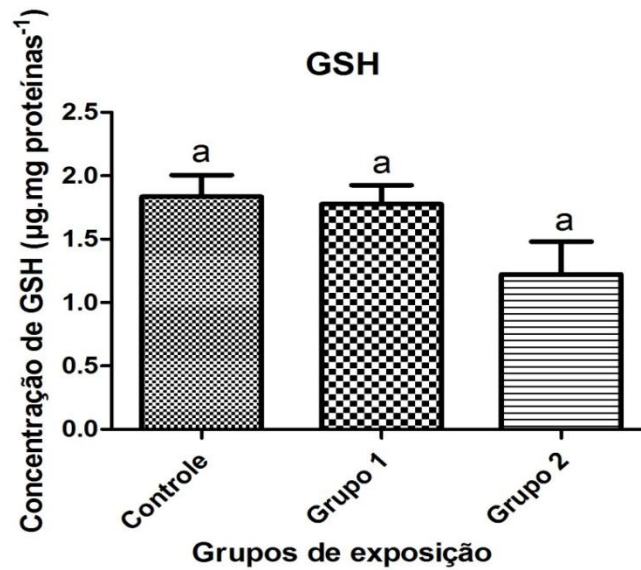


**Figura 7 - Curva padrão de glutathiona reduzida**

**Fonte: Autoria própria.**

Com a construção do gráfico no *software* Excel, obteve-se a equação da reta ( $y=ax+b$ ):  $y= 0,0017x + 0,0024$  com  $r= 0,9984$ . As médias da concentração de GSH obtidas por grupo de exposição estão dispostas na Figura 8, em que observa-se que a concentração foi menor nos dois grupos expostos às concentrações de MC-LR. Estatisticamente, os grupos não apresentaram variância através do teste ANOVA ( $p=0,0838$ ) e, portanto, não houve diferença significativa do grupo controle em relação aos grupos 1 (extrato sem meio ASM-1 e com concentração de  $20,60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de MC-LR) e 2 (extrato com meio ASM-1 e concentração de  $81,66 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de MC-LR).

Figura 8 - Concentração de Glutathiona reduzida. As letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ), utilizando o teste Tukey



Fonte: Autoria própria.

Em peixes expostos a poluentes, a redução da concentração de GSH corresponde a uma reação aguda, enquanto o aumento indica uma adaptação à detoxificação (VAN DER OOST et al., 2003). Então, em relação ao trabalho desenvolvido, a possível redução da concentração de GSH (não significativa) está relacionada com a reação aguda provocada pela exposição aos extratos, contendo microcistina-LR, nos peixes da espécie *Danio rerio*. Além disso, a GSH é utilizada pela enzima GST nas reações de conjugação, então a redução na atividade de GST deve ter demandado menor consumo e menor síntese da molécula GSH.

No estudo realizado por Hauser-Davis et al. (2015) peixes da espécie *Oreochromis niloticus* foram coletados em um lago com florações de cianobactérias, onde a concentração de microcistina analisada variou de 0,55 a 0,60 µg·L<sup>-1</sup>. A concentração de GSH nos peixes foi analisada no fígado, músculo, bile e gônadas, e foi observado uma bioacumulação preferencial de microcistina no músculo, mesmo que o órgão-alvo da MC seja o fígado. Em relação a GSH, os níveis encontrados no fígado e músculo foram os maiores, respectivamente, em relação ao controle. Os níveis de GSH no fígado não apresentaram uma correlação significativa com a concentração de MC no órgão, enquanto no músculo houve uma correlação

significativa devido a maior bioacumulação de microcistina, indicando uma resposta de estresse oxidativo.

Os resultados do presente trabalho não corroboram com o estudo descrito anteriormente, pois não houve uma relação significativa de causa-efeito dos níveis de GSH nos tecidos dos peixes *Danio rerio* com as concentrações de MC-LR utilizadas na exposição, embora tenha sido observada uma inibição de GSH, estatisticamente não significativa. Considerando a exposição aguda a elevadas concentrações de microcistina-LR e a não separação dos órgãos, faz-se necessário novos trabalhos envolvendo a espécie e a cianotoxina.

## **5.2 Biomarcador genético**

Com a realização do ensaio cometa, foi possível analisar e classificar os danos causados pela microcistina-LR no DNA dos peixes utilizados. A quantidade de núcleos contabilizados em cada classe e o escore obtido para cada indivíduo, bem como a mediana dos escores, são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2 - Contabilização das classes, escore obtido e mediana dos escores de acordo com os grupos de exposição. O grupo 1 representa os peixes que foram expostos ao extrato sem meio ASM-1 (20,60 µg·L<sup>-1</sup> de MC-LR) e o grupo 2 ao extrato com meio ASM-1 (81,66 µg·L<sup>-1</sup> de MC-LR)**

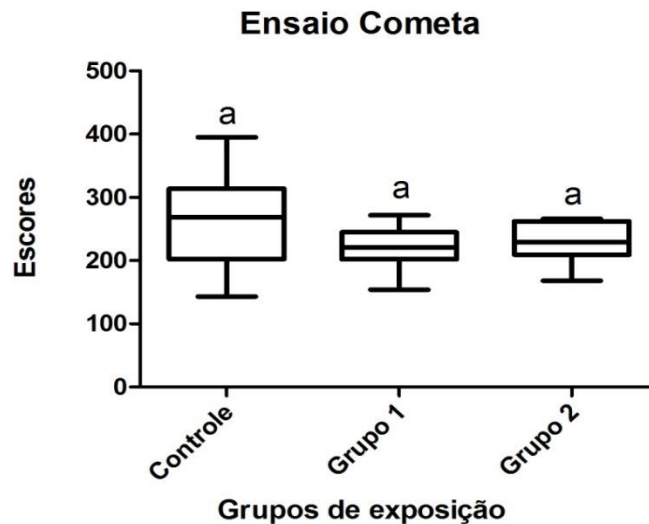
Grupos de exposição	Peixe	Dano 0	Dano 1	Dano 2	Dano 3	Dano 4	Escore	Mediana dos escores
Controle	1	0	4	5	43	48	335	269,0±74,7
	2	2	50	11	12	25	208	
	3	2	27	11	22	38	267	
	4	0	20	20	29	31	271	
	5	15	46	3	11	25	185	
	6	0	7	11	50	32	307	
	7	0	19	6	38	37	293	
	8	13	34	0	17	36	229	
	9	4	77	3	4	12	143	
	10	0	0	1	3	96	395	
Grupo 1	11	0	47	12	9	32	226	220,5±33,8
	12	1	46	11	24	18	212	
	13	0	62	8	13	17	185	
	14	0	49	18	9	24	208	
	15	0	44	6	18	32	238	
	16	1	30	10	14	45	272	
	17	0	48	14	13	25	215	
	18	0	40	5	20	35	250	
	19	2	40	6	17	35	243	
	20	0	73	8	11	8	154	
Grupo 2	21	0	68	8	12	12	168	229,0±32,3
	22	0	34	17	24	25	240	
	23	0	60	4	16	20	196	
	24	5	40	11	20	24	218	
	25	0	37	4	19	40	262	
	26	2	37	8	18	35	247	
	27	0	35	8	13	44	266	
	28	0	52	4	20	24	216	
	29	0	31	11	22	36	263	
	30	0	45	16	19	20	214	

**Classificação dos núcleos: 0 (ausência de dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano grande) e 4 (dano máximo). Em cada uma das classes, a quantidade de núcleos contabilizados foi multiplicada pelo numeral de sua classe (0, 1, 2, 3 ou 4), e a somatória desses resultados (totalizando os 100 núcleos) foi definida como o escore de cada indivíduo.**

Os escores por grupo de exposição foram analisados estatisticamente, sendo que os grupos 1 e 2 (grupos expostos aos extratos com MC-LR) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, pois  $p=0,2868$ . De maneira geral, com a identificação dos danos genéticos, esperava-se que os grupos expostos às duas concentrações de microcistina-LR obtivessem maiores escores em relação ao grupo controle. Porém, isso não foi identificado, sendo que o grupo controle apresentou os escores mais elevados e a maior mediana, como pode ser observado na Figura 9. Sabe-se que a ocorrência de quebras no material genético não pode ser atribuída a uma exposição específica e, então, pode não estar

diretamente associada com a genotoxicidade de uma substância química (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998). Dessa forma, o teste cometa mostrou-se como um ensaio não específico, além de possuir uma limitação na detecção das quebras, pois mecanismos de reparo podem atuar no DNA antes das análises serem realizadas (ESPINA; WEISS, 1995), o que pode ter ocorrido nos peixes expostos às concentrações de microcistina-LR.

**Figura 9 - Relação entre os escores atribuídos ao grupo controle e grupos expostos à MC-LR no ensaio cometa. As letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ), utilizando o teste Kruskal-Wallis**



Fonte: Autoria própria.

No estudo realizado por Silva (2009), em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e Lambari (*Astyanax bimaculatus*), os peixes foram submetidos a duas concentrações de microcistina com o tempo de exposição de 72 horas, de maneira estática, e o dano no DNA foi analisado por teste cometa com amostra de sangue. O extrato foi obtido de uma floração de *Microcystis spp* de um lago e analisado por HPLC, em que foi encontrada uma concentração de  $41,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de microcistina-LR e  $97,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de microcistina-LA, resultando numa concentração total de  $138,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de microcistina no extrato utilizado. Os peixes sofreram exposição em aquários de 40 L contendo alíquotas de  $5,0$  e  $103,725 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de microcistina, na água utilizada. Os resultados obtidos demonstraram que para ambas as espécies, a

exposição à concentração mais elevada de microcistina resultou em valores maiores e significativos ( $p < 0,05$ ) de índice de danos no DNA, quando relacionados aos controles. De maneira geral, as duas concentrações de microcistina utilizadas provocaram maior índice de danos nos peixes em comparação ao grupo controle, indicando que a microcistina causou danos ao DNA para as duas espécies, o que não corrobora com os resultados obtidos no presente estudo realizado em peixes da espécie *Danio rerio* e com um menor tempo de exposição.

Não foram encontrados estudos de dano genético utilizando peixes da espécie *D. rerio* expostos a microcistina-LR, então os efeitos observados neste trabalho podem contribuir com trabalhos futuros. Dessa forma, o ensaio cometa deve ser melhor explorado em relação a avaliação da variabilidade genética entre indivíduos, da mesma espécie, e entre células na resposta aos contaminantes e aos estímulos genotóxicos que podem ocorrer naturalmente nos peixes, desde a sua criação e aclimação, que não podem ser controlados.

## 6 CONCLUSÃO

- O efeito dos extratos brutos, contendo microcistina-LR, nos peixes da espécie *D. rerio* foi avaliado com a análise de dois biomarcadores bioquímicos;
- Houve inibição na atividade da enzima GST e uma relação de causa-efeito com a microcistina-LR presente nos extratos brutos;
- A inibição mais elevada de GST foi observada no extrato com a maior concentração de MC-LR ( $81,66 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), o que corroborou com estudos apresentados;
- Estudos realizados em peixes, expostos a contaminantes, já relataram tanto um aumento quanto uma redução na atividade de GST, o que indica que os resultados deste biomarcador bioquímico devem ser analisados com cautela;
- Não houve uma relação significativa de causa-efeito dos níveis de GSH nos tecidos dos peixes *Danio rerio* com as concentrações de MC-LR presente nos extratos brutos;
- Considerando a exposição aguda de 48 horas (tempo talvez não suficiente para observar efeitos concretos) a elevadas concentrações de MC-LR (superiores às concentrações utilizadas nos estudos apresentados) e a não separação dos órgãos, faz-se necessário novos trabalhos envolvendo a espécie (*D.rerio*) e a microcistina-LR, em relação aos biomarcadores bioquímicos, ajustando tais parâmetros do ensaio;
- Os danos causados no DNA dos peixes foram avaliados através do ensaio cometa, e os escores obtidos nos grupos expostos aos extratos com MC-LR não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, ou seja, não houve relação de causa-efeito;
- A ocorrência de quebras no material genético pode não estar diretamente associada com a genotoxicidade de microcistina-LR e dessa forma, o ensaio cometa deve ser melhor analisado considerando a variabilidade genética entre indivíduos, da mesma espécie, e entre células na resposta aos contaminantes e aos estímulos genotóxicos que podem ocorrer naturalmente nos peixes, desde a sua criação e aclimação, que não podem ser controlados.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar trabalhos com padrão de microcistina-LR em paralelo com a concentração obtida no extrato;
- Exposição aguda de 72 ou 96 horas, tempos utilizados nos estudos apresentados, pois 48 horas pode ser insuficiente para induzir efeitos nos organismos;
- Utilizar concentrações menores de microcistina-LR, semelhantes às utilizadas nos estudos apresentados.



## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984.

APHA - American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 22th ed, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088: ecotoxicologia aquática- toxicidade aguda- método de ensaio com peixes**. Rio de Janeiro, 2011.

AYRES, M.; AYRES Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. BioEstat 5.3: **Aplicações estatísticas em Ciências Médicas e Biológicas**. Belém: IDSM, 2007. 364 p.

BAGANZ, D.; STAAKS, G.; PFLUGMACHER, S.; STEINBERG, C. E. W. Comparative study of microcystin-LR induced behavioral changes of two fish species, *Danio rerio* and *Leucaspilus delineatus*. **Environmental Toxicology**, v. 19, p. 564–570, 2004.

BAGANZ, D.; STAAKS, G.; STEINBERG, C. Impact of the cyanobacteria toxin, microcystin-LR on behaviour of zebrafish, *Danio rerio*. **Water Research**, v. 32, n. 3, p. 948-952, 1998.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, p. 383-392, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000**.

Disponível em:

<[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9de3d3004745874f913fd53fbc4c6735/PORTARIA\\_1469\\_2000.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9de3d3004745874f913fd53fbc4c6735/PORTARIA_1469_2000.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 15 abr. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011**.

Disponível em:

<[http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp\\_doctos/kit\\_arsesp\\_portaria2914.pdf](http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/kit_arsesp_portaria2914.pdf)>  
. Acesso em: 28 jun. 2016.

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

CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V.; BUNNER, D. L.; ELOFF, J. N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.; KRISHNAMURTHY, T.; YU, M. J.; MOORE, R. E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O. M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, n. 11, p. 971-973, 1988.

CASSINI, S. T. A.; ANTUNES, P. W. P.; KELLER, R. Validação de método analítico livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, Vitória, v. 36, n. 8, p. 1208-1213, 2013.

COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVÁ, K.; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, n. 2, p. 139-146, 1997.

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

EGAAS, E.; SANDVIK, M.; FJELD, E.; KALLQVIST, T.; GOKSOYR, A.; SVENSEN, A. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione-S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 122, p. 337-344, 1999.

ESPINA, N. G.; WEISS, P. DNA repair in fish from polluted estuaries. **Marine Environmental Research**, v. 39, p. 309-312, 1995.

ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

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

FISH, TANKS AND PONDS. *Danio rerio*. Disponível em: <<http://www.fishtanksandponds.co.uk/galleries/photo-pages-fw-tropical/cypriniformes/danio-rerio-zebra-danio.html>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

FREITAS, M. B.; FREITAS, C. M. A vigilância da qualidade da água para consumo humano – desafios e perspectivas para o Sistema Único de Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 993-1004, out./dez. 2005.

GALLAGHER, E. P.; GROSS, T. S.; SHEEHY, K. M. Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in Lake Apopka brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*). **Aquatic Toxicology**, v. 55, p. 223-237, 2001.

GALLAGHER, E. P.; SHEEHY, K. M. Altered glutathione-S-transferase catalytic activities in female brown bullheads from a contaminated central Florida lake. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 399–403, 2000.

GARCIA, A. C. A. **Aplicação de Foeleetrooxidação na Degradação de *Microcystis aeruginosa* e da Toxina Microcistina**. 2013. 89 f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Atlas de Saneamento 2011**. Rio de Janeiro, 2011. 268 p. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas\\_saneamento/default\\_zip.shtml](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtml)>. Acesso em: 13 abr. 2016.

JIANG, Y.; JI, B.; WONG, R. N. S.; WONG, M. H. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium—*Microcystis aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 7, n. 2, p. 127-136, 2008.

JOS, A.; PICHARDO, S.; PRIETO, A. I.; REPETTO, G.; VÁZQUEZ, C. M.; MORENO, I.; CAMEÁN, A. M. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce

oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 261-271, 2005.

KANG, Y. W.; CHO, M.; HWANG, K. Correction of hydrogen peroxide interference on standard chemical oxygen demand test. **Water Research**, v. 33, p. 1247-1251, 1999.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KIST, L. W. **Avaliação da toxicidade induzida pela exposição à microcistina-LR sobre as neurotransmissões colinérgica e purinérgica em zebrafish (*Danio rerio*)**. 2012. 80 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

KIST, L. W.; PIATO, A. L.; ROSA, J. G. S.; KOAKOSKI, G.; BARCELLOS, L. J. G.; YUNES, J. S.; BONAN, C. D.; BOGO, M. R. Acute Exposure to Microcystin-Producing Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Alters Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Swimming Performance Parameters. **Journal of Toxicology**, p. 1-9, 2011.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis (SC): FATMA/GTZ, 2004.

LEAL, A. C.; SOARES, M. C. P. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, supl. 2, p. 84-89, 2004.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, n.1, p. 43-64, 2003.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120, n. 1, p. 43-49, 1998.

MALBROUCK, C.; TRAUSCH, G.; DEVOS, P.; KESTEMONT, P. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 135, p. 39–48, 2003.

MARTINEZ, C. B. R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Ângela Teresa Silva-Souza. (Org.). Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Maringá: ABRAPOA, p. 43-62, 2006.

MARTINS, N. D. **Efeitos da microcistina-LR (*Microcystis aeruginosa*) sobre parâmetros cardio-respiratórios de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).** 2010. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **Journal of Biology Chemistry**, v. 263, n. 33, p. 17205-17208, 1988.

MICHELETTO, Joicy. **Avaliação da degradação de microcistina-LR por processo foto-Fenton solar.** 2016. 104f. Dissertação (Mestrado acadêmico) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016 (não disponível).

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v. 399, p. 135-147, 1998.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Germany, v.118, n. 6, p.420-424, 1992.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86-94, 1990.

OLIVEIRA, J. A. **Remoção de microcistina em águas provenientes de reservatório eutrofizado associando técnicas de clarificação, pré-oxidação com permanganato de potássio, adsorção em carvão ativado e pós-cloração.** 2009. 191 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

OLIVEIRA, L. L. D. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos**. 2014. 257 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

PAVAGADHI, S.; GONG, Z.; HANDE, M. P.; DIONYSIOU, D. D.; DE LA CRUZ, A. A.; BALASUBRAMANIAN, R. Biochemical response of diverse organs in adult *Danio rerio* (zebrafish) exposed to sub-lethal concentrations of microcystin-LR and microcystin-RR: A balneation study. **Aquatic Toxicology**, v. 109, p. 1-10, 2012.

PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; OBEREMM, A.; BEATTIE, K. A.; KRAUSE, E.; CODD, G. A.; STEINBERG, C. E. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugates of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxification. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1425, p. 527–533, 1998.

PRIETO, A. I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MORENO, I.; CAMEÁN, A. M. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 314-321, 2006.

RAMSDORF, W. **Avaliação da Toxicidade dos compostos Fipronil, Nitrato de Chumbo e Naftaleno em Peixes**. 2011. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda cangüiri – UFPR)**. 2007. 127 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SANCHES, S. M.; PRADO, E. L.; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F.; VIEIRA E. M. Presença de toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n.2, p. 181-187, 2012.

SANCHES, S. M.; VIEIRA, E. M.; PRADO, E. L.; BENETTI, F.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. **Eclética Química**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 43-48, 2007.

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

SANTOS, A. P. M. E.; HASHIMOTO, E. H.; HASEGAWA, M.; KAMOGAE, M.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; SABINO, M.; UENO, Y.; HARADA, K. I.; HIROOKA, E. Y.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Immuno-histopathology of acute microcystin contamination in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 12., 2007, Istambul. Anais... Istambul: IUPAC, 2007.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SILVA, J.; FREITAS, T.R.O.; MARINHO, J.R.; SPEIT, G.; ERDTMANN, B. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 241-245, 2000.

SILVA, R. R. P. **Avaliação da toxicidade aguda e genotoxicidade de extrato de floração de *Microcystis spp* para peixes de água doce**. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Uniservidade de Brasília, Brasília 2009.

SILVEIRA, A. L. **Avaliação do efeito inibitório de extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* Kützing**. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SOARES, R. M. **Acúmulo, Depuração e Efeitos de Microcistinas (Hepatotoxinas de Cianobactéria) em *Tilapia rendalli* (Cichlidae)**. 1999. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

SOARES, R. M.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 70, n. 1, p. 1-10, 2004.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. **Methods in Molecular Biology**, v. 291, p. 85–95, 2005.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n.12, p.1715-1733, 1996.

TORRES, Mariana de Almeida. **Avaliação da Inativação de *Microcystis aeruginosa* Kützing por Processo Foto-Fenton**. 2016. 109 f. Dissertação (Mestrado acadêmico) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VILELA, W. F. D. **Estudo da Degradação da [D-Leu]-Microcistina-LR por Fotocatálise Heterogênea Solar**. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

WENG, D.; LU, Y.; WEI, Y.; LIU, Y.; SHEN, P. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. **Toxicology**, Ireland, v. 232, n. 1-2, p.15-23, 2007.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S.; OBEREMM, A.; MEEMS, N. BEATTIE, K. A.; STEINBERG, C.; CODD, G. A. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxification enzymes of early life stages of zebra fish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 89–95, 1999.

WIESE, L. P. L. **Avaliação de Atividadeantioxidante e Antiinflamatória de Extrato e Frações de *Alternanthera tenella* Colla**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.



## APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS REALIZADOS NO ENSAIO COMETA

- 1) 15  $\mu$ L da suspensão celular (sangue + soro bovino fetal) foi misturado com 120  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) 0,5% (Anexo C), previamente preparada e aquecida a 37 °C, nos microtubos;
- 2) A mistura foi depositada sobre lâminas, cobertas uniformemente (no mínimo 24 horas antes) com agarose normal 1,5% (Anexo C);
- 3) As lâminas foram cobertas com lamínula e mantidas em geladeira durante 15 minutos. Em seguida, retirou-se a lamínula com cuidado;
- 4) As lâminas foram colocadas em solução de lise (Anexo C), dentro de cubetas, e mantidas em refrigerador (4 °C) por aproximadamente 17 horas;
- 5) Prepararou-se a cuba de eletroforese mergulhando-a em gelo (4 °C) no escuro. Em seguida, as lâminas foram dispostas na cuba horizontal de eletroforese preenchendo o máximo possível de espaços e os espaços vazios foram completados com lâminas limpas;
- 6) Adicionou-se lentamente o tampão de eletroforese (Anexo C) até cobrir as lâminas. As lâminas foram mantidas na solução de eletroforese por 30 minutos, para que o DNA fosse desnaturado no tampão alcalino;
- 7) Após 30 minutos, a corrida de eletroforese foi iniciada a 25 V e 300 mA, valores acertados com acréscimo ou retirada de tampão, e ocorreu por 25 minutos;
- 8) Ao término da eletroforese, as lâminas foram retiradas cuidadosamente e neutralizadas com 5 mL de tampão de neutralização (Anexo C) por 5 minutos. O processo de neutralização foi repetido por mais duas vezes;
- 9) As lâminas foram secas na posição inclinada e fixadas com etanol por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram mantidas em geladeira até serem analisadas;
- 10) Para a coloração, adicionou-se 20  $\mu$ L de brometo de etídio (Anexo C) em cada lâmina e cobriu-se com lamínula. As lâminas ficaram descansando por 5 minutos no escuro antes da análise.

**ANEXO A – COMPOSIÇÃO DO MEIO LÍQUIDO ASM-1 UTILIZADO NO CULTIVO  
DE *M. aeruginosa***

**Tabela A1 – Composição das soluções-estoque e o volume utilizado para o preparo de 1000 mL do meio de cultura ASM-1 (com água de osmose)**

<b>Solução-estoque</b>	<b>Nutrientes</b>	<b>Concentração (g·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume (mL)</b>
Solução A	NaNO <sub>3</sub>	8,5	20
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,45	
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2,05	
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,45	
Solução B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,7	2
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	17,8	
Solução C	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	24,8	0,1
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	13,9	
	FeCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10,8	
	ZnCl <sub>2</sub>	3,35	
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,19	
	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,014	
Solução D	EDTA tritriplex	18,6	0,4

Fonte: Oliveira (2009, p. 58).

## ANEXO B – PARECER CEUA-UTFPR (PARTE 1)



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
Câmpus Dois Vizinhos  
**Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA**



### PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

<b>Título:</b>	Avaliação da ecotoxicidade de Extratos de " <i>Microcystis aeruginosa</i> "
<b>Área Temática:</b>	2.10.07.00-4 Toxicologia
<b>Pesquisador / Professor:</b>	Adriane Martins de Freitas
<b>Instituição:</b>	UTFPR/ (campus) UTFPR-CURITIBA
<b>Financiamento:</b>	Capes e CNPQ
<b>Versão:</b>	02

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2016-024
<p><b>Apresentação do Projeto:</b> O Projeto de Pesquisa apresentado é um estudo a respeito da toxicidade de metabolitos secundários de cianobactérias e de microalgas. Conforme síntese do resumo apresentado, a eutrofização pode levar a formação de florações. Tal fenômeno se tornou uma preocupação mundial, dada a capacidade de cianobactérias em produzir metabolitos secundários que podem dar sabor e odor na água e toxicidade aos organismos vivos. Vários gêneros de Cianobactérias são capazes de produzir cianotoxinas denominadas de microcistinas, que são hepatotóxicas e podem causar formação de tumores ou levar a morte por hemorragias nas intoxicações agudas. Com o objetivo de evitar estes episódios de intoxicação e dar solução a águas contaminadas; novas metodologias de inativação do microrganismo e de suas toxinas são necessárias para o uso em águas. Deste modo, o presente estudo tem como objetivo estudar a tecnologia Foto-Fenton.</p>	
<p><b>Objetivo:</b> Avaliar a ecotoxicidade de extratos de <i>Microcystis aeruginosa</i> em peixes através de biomarcadores bioquímicos e genéticos.</p>	
<p><b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> Os benefícios se respaldam na contribuição da vigilância sanitária de águas de consumo humano e animal através da detecção de contaminantes emergentes e do desenvolvimento de técnicas que possibilitem a minimização de riscos a população.</p>	
<p><b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b> O projeto apresenta relevância científica e aplicabilidade prática de uso, o experimento consta a destinação das carcaças e o tratamento dos efluentes listados no formulário unificado. Atendendo a preocupação de destinação dos materiais que este egrégio conselho apresenta; bem como lista em seu corpo respeito a normativa NBR 15088.</p>	
<p><b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b> Foram apresentados atendendo o regimento, os listados: 1) Requerimento preenchido completamente e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto; 2) formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR/DV; 3) projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA; 4) declaração de não início do projeto, com assinatura e data e observação de início apenas após aprovação.; 4) registro de projeto junto a Diretoria responsável; 5) declaração da responsabilidade do médico veterinário (equivalente ao de ART)</p>	
<p><b>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</b> Não há.</p>	

## ANEXO B – PARECER CEUA-UTFPR (PARTE 2)



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
Câmpus Dois Vizinhos  
**Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA**



<b>Situação do Parecer:</b> <i>Aprovado.</i>
<b>Considerações Finais a Critério da CEUA:</b> Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da ecotoxicidade de Extratos de *Microcystis aeruginosa*", protocolo nº 2016/024 sob a responsabilidade de Adriane Martins de Freitas - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 11/10/2016.

<b>Vigência do projeto:</b>	01/11/2016- 30/11/2017
<b>Finalidade</b>	(    ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
<b>Espécie/linhagem:</b>	Peixes: <i>Danio rerio</i>
<b>Número de animais:</b>	Até 180 (descreve piloto preliminar para determinação de número exato).
<b>Peso/Idade:</b>	2 a 5 gramas
<b>Sexo:</b>	F/M – Fêmeas e machos.
<b>Origem:</b>	Comercial

Dois Vizinhos, 13 de outubro de 2016.

*Nédia de Castilhos Ghisi*

Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

**Nédia de Castilhos Ghisi**  
Presidente do CEUA - UTFPR  
Comissão de Ética no  
Uso de Animais

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná

## ANEXO C – PREPARO DE SOLUÇÕES PARA O ENSAIO COMETA

**Tabela C1 – Composição da solução de PBS**

Produtos	Quantidades
H <sub>2</sub> O deionizada	1000 mL
KCl	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
NaCl	8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g

Atenção: Estocar em refrigerador.

**Fonte: Speit e Hartmann (2005).**

**Tabela C2 – Composição da agarose normal 1,5 % e preparação das lâminas**

Produtos	Quantidades
Agarose normal	1,5 g
PBS	100 mL

Etapas de preparação:

- 1) Dissolver bem, agitando por 2 h;
- 2) Aquecer até a fervura e agitar a solução;
- 3) Deixar solidificar a temperatura ambiente;
- 4) Picar em pedaços, voltar a ferver e agitar a solução;
- 5) Deixar solidificar a temperatura ambiente;
- 6) Repetir a etapa 4;
- 7) Levar para banho-maria a 80 °C;
- 8) Mergulhar as lâminas (limpas com etanol) até a parte esmirilhada e deixar secar na horizontal.

**Fonte: Speit e Hartmann (2005).**

**Tabela C3 – Composição da agarose de baixo ponto de fusão (LMP) 0,5 %**

Produtos	Quantidades
Agarose de baixo ponto de fusão	0,1 g
PBS	20 mL

Etapas de preparação:

- 1) Dissolver bem;
- 2) Colocar pra aquecer até a fervura;
- 3) Agitar a solução;
- 4) Deixar em banho-maria a 37 °C.

**Fonte: Speit e Hartmann (2005).**

**Tabela C4 – Composição da solução de lise estoque e quantidades para o preparo de 1000 mL de solução**

Produtos	Quantidades
H <sub>2</sub> O destilada ou deionizada	890 mL
NaCl (2,5 M)	146,1 g
EDTA (100mM)	37,2 g
TRIS (10 mM)	1,2 g
NaOH sólido	8 g
Lauril Sarcosinato de Sódio	10 g

Atenção: Misturar lentamente a solução para evitar a formação de grumos; o pH deve ser 10 e, se necessário, ajustado com NaOH. Estocar em temperatura ambiente e no escuro.

Fonte: Speit e Hartmann (2005).

**Tabela C5 – Composição da solução de lise (uso) e quantidades para o preparo de 100 mL de solução**

Produtos	Quantidades (mL)
Solução estoque	89
DMSO	10
Triton X - 100	1

Atenção: Fazer na hora, manter no escuro e deixar a solução na cubeta por 60 min a 4 °C antes de colocar as lâminas.

Fonte: Speit e Hartmann (2005).

**Tabela C6 – Composição do tampão de eletroforese**

Soluções	Produtos	Quantidades
Solução de NaOH (300 mM)	NaOH	21,6 g
	H <sub>2</sub> O deionizada	54 mL
Solução de EDTA (200 mM)	EDTA	14,89 g
	H <sub>2</sub> O deionizada	200 mL
Solução de uso	H <sub>2</sub> O deionizada gelada (4°C)	1800 mL
	EDTA (200 mM)	9 mL
	NaOH (300 mM)	54 mL

Atenção: O pH > 13 deve ser ajustado com NaOH e a solução deve ser feita para cada corrida.

Fonte: Speit e Hartmann (2005).

**Tabela C7 – Composição do tampão de neutralização**

<b>Produtos</b>	<b>Quantidades</b>
TRIS	24,25 g
H <sub>2</sub> O deionizada	475 mL

Atenção: O pH deve ser acertado para 7,5 com HCl; estocar em temperatura ambiente.

**Fonte: Speit e Hartmann (2005).**

**Tabela C8 – Composição da solução de coloração**

<b>Soluções</b>	<b>Produtos</b>	<b>Quantidades</b>
Solução estoque	Brometo de etídio	10 mg
	H <sub>2</sub> O deionizada	50 mL
Atenção: Estocar em temperatura ambiente.		
Solução de uso	Solução estoque	1 mL
	H <sub>2</sub> O deionizada	9 mL

**Fonte: Speit e Hartmann (2005).**