

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

**Avaliação dos efeitos de cianotoxinas sobre crustáceos marinhos com  
ênfase no *Litopenaeus vannamei*.**

**Lucas Abraão Pacheco**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós Graduação  
em Oceanografia Física,  
Química e Geológica como  
requisito parcial a obtenção do  
título de mestre.

*Orientador: João Sarkis Yunes*  
*Co-orientadora: Luiza Dy Fonseca Costa*

*RIO GRANDE*  
2015

**Avaliação dos efeitos de cianotoxinas sobre crustáceos marinhos com ênfase no *Litopenaeus vannamei*.**

**Lucas Abraão Pacheco**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica como requisito parcial a obtenção do título de mestre.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Sarkis Yunes – Orientador – IO/FURG

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Grasiela Lopes Leães Pinho – IO/FURG

Dr<sup>a</sup>. Luiza Dy Fonseca Costa – Pós Doc PPGOFQG- IO/FURG

Prof. Dr. Felipe Diehl - UFPEL

RIO GRANDE  
2015

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPITULO 1 – EFEITO TOXICOLÓGICO DE SAXITOXINAS EM <i>Litopenaeus vannamei</i> e <i>Artemia salina</i>	8
1 – INTRODUÇÃO	9
1.1 - ANTECEDENTES COM SAXITOXINAS	12
1.2 - TESTES TOXICOLÓGICOS	14
1.2.1 - ORGANISMOS TESTE	14
2 – OBJETIVOS	16
2.1 - OBJETIVO GERAL	16
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 - MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 - CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA E EXTRAÇÃO DE SAXITOXINAS	17
3.1.1 - DETERMINAÇÃO DE SAXITOXINAS NAS AMOSTRAS	18
3.2 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM <i>Artemia salina</i>	20
3.2.1 - ECLOSÃO DOS CISTOS E MONTAGEM DOS TESTES	20
3.2.2 - METODOLOGIA E EXECUÇÃO DOS TESTES	21
3.3 - ENSAIO TOXICOLÓGICO AGUDO COM <i>Litopenaeus vannamei</i>	22
3.3.1 - SOLUÇÃO TESTE: PREPARO E DILUIÇÕES	22
3.3.2 - ORGANISMO TESTE: ORIGEM, CULTIVO, ALIMENTAÇÃO E MONTAGEM DO TESTE	23
3.3.3 - METODOLOGIA E EXECUÇÃO DO TESTE	23
3.4 - TESTE TOXICOLÓGICO CRÔNICO COM <i>Litopenaeus vannamei</i>	24
3.4.1 - SOLUÇÃO TESTE: PREPARO E DILUIÇÕES	24
3.4.2 - ORGANISMO TESTE: ALIMENTAÇÃO E MONTAGEM E APLICAÇÃO DO TESTE CRÔNICO	25
3.4.3 - MONTAGEM DO AQUÁRIO E FILMAGENS	26
3.4.4 - METODOLOGIA E EXECUÇÃO DOS TESTES	27
3.5 - ANÁLISE DOS DADOS	27
4 - RESULTADOS	28
4.1 - CONCENTRAÇÃO TÓXICA DAS SOLUÇÕES TESTE	28
4.2 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM <i>Artemia salina</i>	29
4.3 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM <i>Litopenaeus vannamei</i>	30
4.4 - DIFERENÇA ENTRE AS CL50 DE <i>Litopenaeus vannamei</i> e <i>Artemia Salina</i>	32
4.5 - TESTE TOXICOLÓGICO CRÔNICO COM <i>Litopenaeus vannamei</i>	32
5 – DISCUSSÃO	34
5.1 - EFEITO DE EQUIVALENTES DE SAXITOXINA NOS ORGANISMOS TESTADOS	34
5.2 - EFEITO DE EQUIVALENTES DA SAXITOXINA EM RELAÇÃO A CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS NO AMBIENTE	36
5.3 - EFEITOS CRÔNICOS NO <i>Litopenaeus vannamei</i>	37
6 – CONCLUSÃO	38
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

Capítulo 2 - EFEITO TOXICOLÓGICO DE NODULARINA EM <i>Litopenaeus vannamei</i> e <i>Artemia salina</i>	43
8 – INTRODUÇÃO	44
8.1 - ANTECEDENTES COM NODULARINA	46
8.2 - TESTES TOXICOLÓGICOS	47
8.2.1 - ORGANISMOS TESTE	47
9 – OBJETIVOS	49
9.1 - OBJETIVO GERAL	49
9.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
10 - MATERIAL E MÉTODOS	50
10.1 - COLETA, DETERMINAÇÃO DA ESPÉCIE E PROCESSAMENTO AMOSTRAL	50
10.2 - DETERMINAÇÃO DE NODULARINA PRESENTE NAS AMOSTRAS	51
10.3 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM <i>Artemia salina</i>	51
10.3.1 - ECLOSÃO DOS CISTOS E MONTAGEM DOS TESTES	51
10.3.2 - METODOLOGIA E EXECUÇÃO DOS TESTES	52
10.4 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM <i>Litopenaeus vannamei</i>	52
10.4.1 - SOLUÇÃO TESTE: PREPARO E DILUIÇÕES	52
10.4.2 - ORGANISMO TESTE: ORIGEM, CULTIVO, ALIMENTAÇÃO E MONTAGEM DO TESTE	53
10.4.3 - METODOLOGIA E EXECUÇÃO DO TESTE	53
10.5 - ANÁLISE DOS DADOS	53
11 – RESULTADOS	54
11.1 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NODULARINA PRESENTE NO PÓ LIOFILIZADO DE <i>Nodularia spumigena</i>	54
11.2 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM <i>Artemia salina</i>	55
11.3 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM <i>Litopenaeus vannamei</i>	57
11.4 - DIFERENÇA ENTRE AS CL50 DE <i>Litopenaeus vannamei</i> e <i>Artemia Salina</i>	58
12 – DISCUSSÃO	59
13 – CONCLUSÃO	61
14 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

## **AGRADECIMENTOS**

Enfim essa longa jornada tem seu fim. Talvez a maior jornada que já enfrentei, percalços, desânimos e muitos problemas seguiram lado a lado nesse desafio que foi escrever esta dissertação. Porém, muitas coisas boas também aconteceram, e inúmeras pessoas contribuíram para que todo esse processo chegasse ao fim. Quero agradecer primeiramente ao meu orientador João Sarkis Yunes por contribuir com minha formação e me dar a oportunidade de trabalhar em seu laboratório por bons anos. Quero agradecer ao professor Felipe além de ser mais que um mega ultra pesquisador disposto a sempre de elucidar sobre algo, ser um amigo, pelo menos eu acho hehehe. Quero agradecer também ao irmão Edi por me mostrar como competência e amor pelo que faz deixam as coisas mais fáceis e bonitas. Não posso esquecer de todo o pessoal que assim como eu passou pela antiga UPC e agora LCF. Pablo Giroldo, Cintia Girolda, Ju, Luki, Andressa, Nati, Juliane, Luiza vocês não só ajudaram nas horas de trabalho como deixaram muitos dias maçantes mais divertidos.

Amigos que conquistei durante esses 8 anos de Rio Grande que não posso esquecer. Tropeço, Mari, Rafa, Bruna, Chico, Coisa, Tiago, Gago, Batora e mais tantos outros. Obrigado por tudo! Vocês foram e ainda são meu porto seguro nos momentos bons e ruins!

Minha namorada e futura mulher. Lari obrigado por aguentar essa barra junto comigo. Te amo!

Por penúltimo quero agradecer a minha família: Mãe e Anna, sem vocês eu nada seria!

E por último ao PPGOFQG e a CAPES por me dar a oportunidade de realizar este mestrado com bolsa algo que sem, não seria possível.

## RESUMO

A demanda alimentícia atual tem feito com que cultivos de organismos aquáticos se intensifiquem nas últimas 3 décadas. Porém, para que isso seja possível fazendas de aquicultura tem aumentado o enriquecimento de seus viveiros com nutrientes principalmente nitrogênio e fósforo. Este enriquecimento tende a contribuir com o aparecimento de florações de cianobactérias. Dentre estas florações podem ocorrer algumas espécies produtoras de metabólitos secundários conhecidos como cianotoxinas, onde seus efeitos podem causar sérios problemas incluindo a mortalidade em massa dos organismos expostos. Por isso, um monitoramento constante destes cultivos se faz necessário, pois problemas de florações podem acarretar grandes perdas aos produtores. Uma ferramenta importante para o monitoramento destes cultivos são os testes toxicológicos, pois estes dão uma rápida resposta que antecipa as consequências das florações tóxicas, aumentando assim as chances de o produtor intervir com medidas que preservem a sua produção.

No presente trabalho foram realizados testes toxicológicos agudos onde testou-se a toxicidade saxitoxinas e nodularinas em dois organismos oriundos de fazendas de cultivo, o camarão branco *Litopenaeus vannamei* e o camarão cego *Artemia salina*. Nos experimentos com o primeiro obteve-se uma concentração letal para 50% dos organismos ( $CL_{50}$ ) de  $17,27 \mu\text{g.L}^{-1}$  com saxitoxinas e de  $2.500 \mu\text{g.L}^{-1}$  com nodularinas. Com *Artemia* foram encontrados valores de  $CL_{50}$  entre  $4,76$  e  $2,11 \mu\text{g.L}^{-1}$  para saxitoxinas e  $CL_{50}$  de  $1.941 \pm 1.110 \mu\text{g.L}^{-1}$  para nodularinas. Mostrando que este organismo é cinco vezes mais sensível a ambos podendo ser utilizado como bioensaio de rápida duração trazendo resultados de boa confiabilidade ao produtor. Nos ensaios com nodularina, os dois organismos obtiveram sensibilidade similares o que sugere semelhantes mecanismos de ação do intoxicante a ambos crustáceos. Foi realizado também um ensaio crônico com *L.vannamei* avaliando sua capacidade natatória após exposição a saxitoxinas, porém não foi encontrada diferença significativa entre o grupo tóxico e o grupo controle. O monitoramento de fazendas de produção de crustáceos através de ensaios toxicológicos apropriados é importante, para diminuir a perda de produção destes locais.

## ABSTRACT

In the last three decades the need for food has caused the aquaculture to be intensified. To reach this purpose, aquaculture farmers loads their water tanks with an extra amount of nitrogen and phosphorus nutrients. This enrichment of nutrients leads to the development of cyanobacterial blooms. Among these blooms, species producing secondary metabolites may occur. These compounds called cyanotoxins cause serious problems including mass mortality of exposed organisms. Therefore, constant monitoring of these marine farms is necessary as blooms may cause major losses to producers. Toxicological tests are an important tool for monitoring their production farms as they are a rapid response to anticipate the harmful consequences brought by toxic blooms, moreover giving the chance to the farmers protect and save their marine food crops. The present work carried out acute toxicological tests which tested the toxicity of nodularins and saxitoxins to aquaculture farm organisms, the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the brine shrimp *Artemia salina*. In experiments with the first, a lethal concentration for 50% of organisms (LC50) of 17.27  $\mu\text{g.L}^{-1}$  with saxitoxins and 2500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  with nodularins. With *Artemia* a LC50 value between 4.76 and 2.11  $\mu\text{g.L}^{-1}$  with saxitoxins and a LC50 of  $1,941 \pm 1,110 \mu\text{g.L}^{-1}$  with nodularins was obtained. The experiments showed that with saxitoxins, *A.salina* is approximately 5 times more sensitive than *L.vannamei*, thus it can be used as a short term bioassay bringing reliability to the farm producer. In the nodularin tests, both organisms tested presented similar sensitivity. These in terms suggested also a similar action of the intoxicant to both crustacean. A chronic assay with *L.vannamei* was performed evaluating their swimming capacity after exposure to saxitoxins, but there was no significant difference between the toxic group and the control group. Monitoring shrimp farms through toxicological tests is an important tool to reduce the production loss in these locals.

**Avaliação dos efeitos de cianotoxinas sobre crustáceos marinhos com ênfase no *Litopenaeus vannamei*.**

**Capítulo 1 - EFEITO TOXICOLÓGICO DE SAXITOXINAS EM *Litopenaeus vannamei* e *Artemia salina***

**Lucas Abraão Pacheco**

RIO GRANDE  
2015

## 1 - INTRODUÇÃO

A aquicultura vem se desenvolvendo de maneira acelerada nas últimas 3 décadas. Segundo o relatório mais recente da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), a produção de pescado para consumo humano foi de 136,2 milhões de toneladas, onde a produção oriunda da aquicultura representou cerca de 49% (FAO, 2014). Este aumento vem ocorrendo de maneira gradativa ano a ano devido a avanços tecnológicos implantados nestas produções. Técnicas como o cultivo em meio a bioflocos se utilizam da formação de agregados microbianos permitindo um melhor aproveitamento dos nutrientes originados da ração consumida pelos organismos (Browdy *et al.*, 2001; Burford *et al.*, 2003). Atualmente, este pacote tecnológico quando implantado em um cultivo, consegue produzir 1 kg de camarão com menos de 160 litros de água (Otoshi *et al.*, 2006). Em contrapartida, produções que utilizam sistemas convencionais utilizam cerca de 64 mil litros de água para produzir a mesma quantidade de camarão (Hopkins *et al.*, 1995).

O desenvolvimento tecnológico e consequente aumento de produção na aquicultura embora se faça necessário, tem trazido alguns problemas para as fazendas de cultivo. O enriquecimento das águas de cultivo com nitrogênio e fósforo é primordial para o aumento da produção, porém contribui para a eutrofização e consequentemente o desenvolvimento de microalgas e cianobactérias tanto nos cultivos de águas costeiras

adjacentes quanto continentais (Zimba & Grim, 2003). Estratégias de manejo da qualidade da água vem sendo empregadas com o intuito de minimizar a eutrofização. Um exemplo é a manipulação da comunidade microbiana, que contribui tanto com os fatores ambientais como econômicos (Ballester *et al.* 2007; Azim *et al.* 2008). Porém, mesmo com avanços em pesquisa, o número de casos de florações resultantes da eutrofização em produções comerciais ainda ocorre de forma incontrollável.

Cianobactérias são organismos procarióticos, aeróbicos e fotoautotróficos encontrados em forma unicelular, filamentosa ou colonial. Atualmente são conhecidas cerca de 2.000 espécies divididas em 150 gêneros (Hoek e Jahns, 2002 citado em Ernst, 2008). Encontradas em praticamente todas as regiões do planeta, são capazes de sobreviver em ambientes com condições extremas (Ricklefs, 1993). Florações de cianobactérias ocorrem em locais com altas concentrações de compostos orgânicos ricos em nitrogênio e fósforo, altas temperaturas e baixa circulação da água (van Apeldoorn

*et al.*, 2007), podendo ser encontrados com concentrações superiores a  $2 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> (Zimba & Mischke, 2005). Como características, estas florações produzem odores desagradáveis e coloração verde azulada impactante (Torgan, 1989). Dentre todas as espécies compreendidas como cianobactérias, cerca de 40 gêneros sintetizam metabólitos secundários conhecidos como cianotoxinas (Carmichael & Falconer, 1993). Não existe uma razão direta para a produção destas toxinas, porém acredita-se que cianobactérias e outras microalgas as produzam a fim de se proteger contra a herbivoria (Carmichael, 1992b). Estas ficam armazenadas no conteúdo intracelular das cianobactérias, e são liberadas no meio com a morte da célula.

As toxinas produzidas podem causar sérios danos a uma fazenda de aquicultura, pois estes metabolitos podem causar além de mortalidade, o surgimento de tumores, aumento de stress, diminuição na nutrição e conseqüente queda na taxa de crescimento dos organismos cultivados (Smith *et al.*, 2008).

As cianotoxinas são divididas em três grupos, que variam pelo mecanismo e local de ação. A divisão ocorre em hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas (Chorus e Bartram, 1999). Os dois principais grupos tóxicos, por possuírem potencial agudo e subcrônico de toxicidade em animais e humanos são as hepatotoxinas e neurotoxinas (Pitois *et al.*, 2001). A maioria dos incidentes de florações tóxicas de cianobactérias descritos ‘tanto para água salgada quanto dulcícolas são relacionados com os gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis* e menos frequente com os gêneros *Gomphosphaeria*, *Coelosphaerium*, *Gloeotrichia*, *Nodularia*, *Nostoc* (Sivonen & Jones, 1999).

Dentro do grupo de cianotoxinas com potencial neurotóxico, encontra-se a toxina e suas variantes utilizadas no presente estudo: saxitoxinas. Esta neurotoxina tem como característica atuar sobre o sistema nervoso do organismo e possuir um poder de ação extremamente rápido (Carmichael, 1992a; Carmichael, 1992b).

As saxitoxinas (figura 1) são alcaloides, que possuem mais de 22 variantes também conhecidas na literatura como PST (“*paralytic shellfish toxins*”) ou toxinas paralíticas. Suas variantes possuem toxicidades e estruturas moleculares diferentes e se distinguem entre si devido ao número de grupamentos sulfato ou decarbamoil (tabela 1) (Sivonen & Jones, 1999).

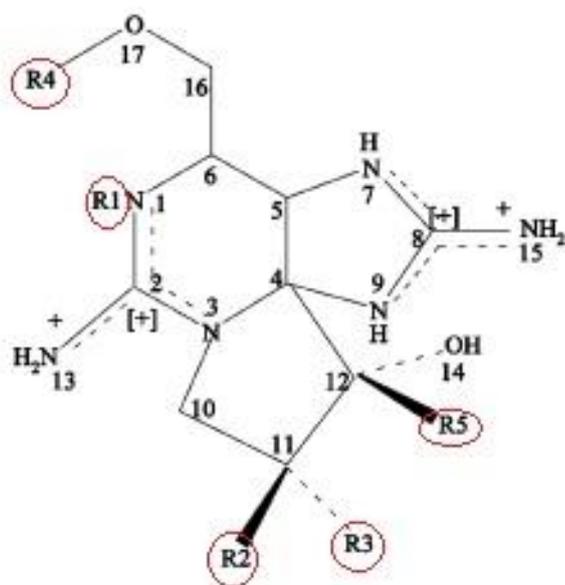


Figura 1: Estrutura molecular geral da saxitoxina. Fonte:(van Apeldoorn et al., 2007).

Tabela 1: Variantes de saxitoxina e os radicais modificados. Fonte: (Chorus e Bartram, 1999).

NOME DA GRUPOS QUÍMICOS VARIÁVEIS NAS SAXITOXINAS				
TOXINA	R1	R2	R3	R4
STX	H	H	H	CONH <sub>2</sub>
GTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>
GTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>
GTX5	H	H	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
C1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
C2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
NEO	OH	H	H	CONH <sub>2</sub>
GTX1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>
GTX4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>
GTX6	OH	H	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
DeSTX	H	H	H	H
DeGTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H
DeGTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H
LWTX1	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	COCH <sub>3</sub>
LWTX2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	COCH <sub>3</sub>
LWTX3	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	COCH <sub>3</sub>
LWTX4	H	H	H	H
LWTX5	H	H	H	COCH <sub>3</sub>
LWTX6	H	H	H	COCH <sub>3</sub>

STX: Saxitoxina  
 GTX: Goniautoxinas  
 C:C – Toxinas  
 deSTX: decarbamoilsaxitoxinas  
 deGTX: decarbamoigoniautoxinas  
 LWTX: toxinas de *Lyngbya wollei*  
 NEO: Neosaxitoxina

Estas potentes neurotoxinas agem como inibidoras da condução e da geração de potenciais de ação em células excitáveis, como neurônios e miócitos. São bloqueadores

seletivos dos canais de sódio dependentes de voltagem, podendo também diminuir a permeabilidade do potássio nas membranas nervosas quando em concentrações elevadas. O efeito toxicológico caracteriza-se por causar severa paralisia muscular e, conseqüente morte por insuficiência respiratória (Carmichael, 1994; Wang et al., 2003; Su et al., 2004; Apeldoorn et al., 2007).

Dentre as espécies identificadas como produtoras de saxitoxinas, temos alguns dinoflagelados: *Protogonyaulax*, *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium*. Assim como cianobactérias: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Lyngbya*.

Entre várias espécies produtoras das variantes de saxitoxina, *Cylindrospermopsis raciborskii* é uma das cianobactérias citadas com frequência na literatura (Chorus & Bartram, 1999). No Brasil esta espécie costuma ser encontrada em barragens e outros corpos de água doce, onde na maioria dos casos é produtora desta toxina (Lagos et al., 1999; Yunes et al., 2003).

## 1.1 - ANTECEDENTES COM SAXITOXINAS

Devido ao alto potencial tóxico e ocorrência em todo o mundo desta neurotoxina, inúmeros são os estudos tanto toxicológicos como ambientais relacionados a mesma.

Em florações ocorridas no reservatório de Taiacupeba em São Paulo, foram analisadas amostras onde encontraram-se concentrações de até  $17\mu\text{g.L}^{-1}$  de saxitoxinas (Yunes *et al.*, 2003). No estado do Paraná em 2002, o reservatório de abastecimento de Pitanguí também foi impactado com florações que foram analisadas e encontrou-se concentrações de  $8,1\mu\text{g.L}^{-1}$  de saxitoxinas naquelas amostras (Yunes *et al.*, 2010).

Em 11 lagos distintos no território dinamarquês, foram encontradas florações de cianobactérias produtoras de saxitoxinas, porém neste estudo apenas foi confirmada a presença da toxina e não quantificada como nos estudos anteriores (Kaas *et al.*, 2000). Uma floração de *Aphanizomenon flos-aquae* ocorrida na barragem de Crestuma-Lever (localizada no distrito de Porto – Portugal) foi analisada e constatou-se que se tratava de uma produtora de saxitoxinas (Ferreira *et al.*, 2000). Estes estudos demonstram que florações tóxicas de saxitoxinas ocorrem frequentemente em distintas áreas do planeta.

Diversos estudos relacionados a toxicidade das saxitoxinas foram realizados, onde esta neurotoxina já foi testada nos mais variados grupos marinhos e terrestres de diferentes táxons.

O crustáceo *Mysidopsis juniae* foi utilizado como organismo teste em ensaios agudo e crônico com saxitoxinas realizados com as mesmas cepas utilizadas no presente trabalho. Naquele trabalho, foi encontrado uma concentração letal para 50% dos organismos  $CL_{50}$  de  $2,34 \mu\text{g.L}^{-1}$  de saxitoxinas, o que comprovou a sensibilidade do organismo a toxina testada demonstrando porque o mesmo é utilizado com frequência em testes toxicológicos (Bif *et al.*, 2013).

Em testes a cladóceras *Daphnia pulex* foi exposta a uma floração *Cylindrospermopsis raciborskii* produtora de saxitoxinas por um período de 24 horas após, verificou-se que os organismos perderam o poder de locomoção (Ferrão Filho *et al.*, 2008). Isso ocorreu devido aos efeitos neurotóxicos que as saxitoxinas possuem. Após 3 horas, removida a exposição à floração, os organismos voltaram a ter capacidade de movimentação. Isso demonstra a reversibilidade da ação das saxitoxinas.

Em estudo realizado com *Mya arenaria* coletada de dois locais diferentes (Golfo St. Laurence e Baía de Fundy, ambos nos EUA), no primeiro não havia ocorrência de floração produtora de saxitoxinas e no segundo havia, avaliou-se a capacidade de enterramento dos organismos após exposição de 24 horas à células tóxicas de *Alexandrium tamarense*. Foi encontrada uma diferença significativa na capacidade de enterramento dos organismos de locais diferentes. Com isso foi observado uma capacidade de acumulação maior por parte dos organismos que eram frequentemente expostos pela toxina em seu habitat. Para comprovar isso, analisaram o genoma e a sequência de DNA dos poros dos canais de  $\text{Na}^+$  afetados nos dois grupos estudados e constataram que os organismos que eram frequentemente expostos (Baía de Fundy) possuíam uma mutação genética no domínio 2 que lhes proporcionava uma modificação significativa na absorção das saxitoxinas, tornando-os mais resistentes que organismos da mesma espécie oriundos de locais que não tinham ocorrência de florações produtoras de saxitoxinas (Bricelj *et al.*, 2005).

Em estudo realizado com *Litopenaeus vannamei* cultivados em uma fazenda de aquicultura, estes também foram submetidos a exposição de uma floração de *A. tamarense* onde novamente verificou-se acúmulo na musculatura e glândulas gástricas das saxitoxinas. Por se tratar de um organismo de cultivo discute-se se este pode ou não ser um vetor desta toxina ao consumidor final (Linares *et al.*, 2009).

Exposições a  $229 \pm 7 \mu\text{g.L}^{-1}$  de saxitoxinas foram realizadas com larvas de *Danio rerio*, após a exposição, as larvas sobreviventes tiveram má formação e deficiência senso motoras, demonstrando o efeito tóxico das saxitoxinas (Lefebvre *et al.*, 2004).

## 1.2 - TESTES TOXICOLÓGICOS

Testes toxicológicos são de extremamente aplicáveis a estudos com florações de cianobactérias, pois através destes se analisarão efeitos das cianotoxinas sobre os organismos vivos, principalmente quando provém do meio nos quais os organismos vivem (Zagatto & Bertoletti, 2008). Em fazendas de aquicultura, o teste toxicológico torna-se primordial, pois são ambientes confinados com parâmetros físico-químicos controlados e qualquer interferência (como no caso florações), será extremamente prejudicial à produção e conseqüentemente ao produtor.

### 1.2.1 - ORGANISMOS TESTE

Os dois organismos teste utilizados neste trabalho foram o camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone) e o microcústáceo *Artemia salina*. O primeiro foi escolhido, pois possui alto valor comercial e é o produto final de uma fazenda de carcinocultura. A *A. salina* foi bastante utilizada como organismo teste em ensaios toxicológicos na década de 90 (Resgalla & Laitano, 2002). Embora atualmente não seja mais utilizada com frequência, dentro de uma fazenda de aquicultura é de extrema importância, pois é alimento base dos primeiros estágios de vida do *L. vannamei*. Além do mais, pode vir a servir como um teste toxicológico preliminar rápido e fácil, servindo de parâmetro ao produtor em relação a florações que ocorram em sua fazenda.

*Artemia salina* (figura 2) é um microcústáceo da ordem Anostraca, filtrador que possui como hábitos alimentares consumir bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos dissolvidos no meio. A filtração ocorre nos toracópodos, encarregados de conduzir as partículas alimentícias em direção ao sistema digestivo. Seus cistos são de fácil eclosão e são encontrados facilmente em lojas de aquários, não precisando assim serem capturados no ambiente.



Figura 2: *Artemia salina*. Fonte: <http://sciencesediment.com/about/the-curriculum/the-units/brine-shrimp/>

O *Litopenaeus vannamei* (figura 3) é um camarão nativo do Pacífico, que se distribui da costa mexicana até o Peru. Esta espécie está entre as mais cultivadas no mundo (FAO, 2007). No Brasil começou a ser produzida com maior significância no início da década de 90 e hoje é a espécie mais produzida (Streit et al., 2002). Isso se dá por que a espécie é rapidamente adaptável a variados ambientes e tipos de cultivo.

Embora este camarão seja marinho, seu cultivo pode ser realizado sob grandes variações de salinidade. Isto é comprovado, através de diversos estudos com aclimação, sobrevivência, crescimento e cultivo desta espécie que mostraram a viabilidade do cultivo em águas continentais (Velasco et al., 1999; Rosas et al., 2001; Santos et al., 2002; Yong-Chin Lin & Jiann-Chu Chen, 2003; Mendes et al., 2006; Santos et al., 2007; Santos et al., 2009).



Figura 3: *Litopenaeus vannamei* fonte: [http://www.ictieterm.es/nombre\\_cientifico.php?nc=235](http://www.ictieterm.es/nombre_cientifico.php?nc=235)

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - OBJETIVO GERAL

- Avaliar a toxicidade de uma cepa cultivada em laboratório de *Cylindrospermopsis raciborskii* produtora de saxitoxinas sobre dois organismos cultivados em fazendas de aquicultura, o camarão branco *Litopenaeus vannamei* e o microcrustáceo *Artemia salina*.

### 2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração letal para 50% dos organismos testados (CL<sub>50</sub>) de saxitoxinas a partir de um cultivo de *C. raciborskii* em testes com pós-larvas de *L. vannamei*.
- Determinar a CL<sub>50</sub> de saxitoxinas em testes com náuplios de *A. salina*.
- Determinar se há diferença de sensibilidade nos efeitos da toxina entre os dois organismos testados, o que pode contribuir para o monitoramento e avaliação dos impactos de uma floração ocorrente em uma fazenda de aquicultura que cultive as espécies estudadas.
- Verificar se há efeito crônico sobre a capacidade natatória de juvenis de *L. vannamei* quando expostos a doses subletais de saxitoxinas.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA E EXTRAÇÃO DE SAXITOXINAS

A cianobactéria de água doce descrita como produtora de saxitoxinas *Cylindrospermopsis raciborskii* (de Souza *et al.*, 1998, citado em Wu *et al.*, 2012) foi cultivada para utilização nos testes toxicológicos. A cepa utilizada foi a T3 (Lagos *et al.*, 1999) a qual encontra-se disponível no banco de cultivos do Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas (LCF: [www.cianobacterias.furg.br](http://www.cianobacterias.furg.br)). O perfil de variantes tóxicas de saxitoxinas para esta cianobactéria já havia sido utilizado em outros trabalhos do LCF (Bif *et al.* 2013; Ramos *et al.* 2014).

O inóculo da cepa T3 foi realizada em frascos previamente autoclavados (Phoenix AV75, Brasil) contendo o meio ASM-1 para cianobactérias (Gorham *et al.*, 1964) em capela de fluxo laminar esterilizada (VECO-Brasil). Os frascos foram mantidos na sala de cultivos sob um fotoperíodo de 24 horas (fase clara) de aproximadamente  $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$  e temperatura de 20°C. Os cultivos mantiveram-se nessas condições até atingirem a biomassa celular e concentração tóxica para a realização dos testes toxicológicos. Este período de incubação teve duração de aproximadamente 40 dias.

Após atingirem a concentração pretendida, os cultivos foram concentrados a um menor volume possível. Este procedimento se deu através sucessivas centrifugações (centrifuga MLW modelo K70D-Alemanha) com capacidade de 500 mL em cada um dos 4 frascos. Cada processo de centrifugação durou cerca de 30 minutos a 3000 rpm, onde o sobrenadante foi descartado. O volume celular em forma de precipitado, foi retirado dos frascos e medido com o auxílio de uma proveta. Neste, foi adicionado HCl a fim de atingir a concentração de 0,05M e diminuir o pH da amostra, evitando a degradação da toxina. Os concentrados foram rotulados e mantidos em frascos de polietileno Nalgene® de 100 ml.

A quebra das células foi necessária para que as toxinas produzidas fossem liberadas para o meio aquoso. Para isso, utilizou-se um sonificador (Hielscher UP100H, Germany). O procedimento ocorreu a uma amplitude de 100% em três ciclos de 30

segundos intercalados com 30 segundos de pausa. Ao término, os frascos foram mantidos em refrigerador (5°C) até análise e posterior utilização nos testes.

### 3.1.1 - DETERMINAÇÃO DE SAXITOXINAS NAS AMOSTRAS

Para a determinação qualitativa e quantitativa de saxitoxinas nas amostras, uma alíquota de 5 mL foi retirada de cada frasco. Estas foram filtradas em filtros de éster de celulose de 45µm de diâmetro (Sartorius Stedim Biotech, Germany), e acondicionadas em ampolas de vidro para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando o método de Rourke *et al.*, 2008.

O preparo das soluções foi realizado utilizando somente reagentes de grau CLAE e água ultra pura tipo Milli-Q. Os padrões, material de referência certificados, foram obtidos da National Research Council Canadá (NRC), estes seguem a seguinte descrição: NRC CRM-GTX1&4-c, Lot#20080709, NRC CRM-GTX2&3-c, Lot#20081203, NRC CRM-GTX5-b, Lot#20020809, NRC CRM- NEO-c, Lot#20090218, NRC CRM-dcSTX, Lot#20011010 e NRC CRM-STX-e, Lot# 20060419. O conjunto do cromatógrafo (CLAE) Shimadzu Co. (Japan) consiste em uma controladora CBM 20A, um detector de Fluorescência RF-10Ax1 (excitação 330nm e emissão 390 nm), duas bombas binárias LC-20AD e um forno de coluna CTO-20A controlados através do software Labsolution 5.41.240. Para as reações de pós derivatização foi utilizada uma bomba quaternária LC-10AD controlada manualmente e um sistema de banho (Novatecnica, modelo NT 245), com temperatura controlada a 80°C, em que ficam imersas as mangueiras de teflon. A coluna analítica utilizada para as análises foi Zorbax Bonus-RP C8 (150 x 4,60mm, 5µm) marca Agilent®.

O software utilizado para controlar o processo foi o Labsolution 5.41.240. As condições de análise e as fases móveis utilizadas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Especificações e condições de análise segundo o método Rourke *et al.* (2008) para Saxtoxinas.

Condições cromatográficas	
<b>GTX 1–5 (Eluente A)</b>	Heptanosulfonato de sódio 11mM Ácido fosfórico 5,5mM Ajuste a pH 7,1 com Hidróxido de amônio Fluxo 1mL/min

<b>Neo-STX, dc-STX , STX (Eluente B)</b>	Heptanosulfonato de sódio 11mM Ácido fosfórico 16,5mM Acetonitrila 11,5% (v/v) em água Ajuste a pH 7,1 com Hidróxido de amônio 1M Fluxo 1mL/min	
<b>Pós Derivatização 80°C</b>	Oxidante: Ácido periódico 7mM Hidrogeno di-potássio trihidratado 10mM Ajuste a pH 9,0 com Hidróxido de potássio 1M Fluxo 0,4mL/min Ácido: Ácido acético (0,05mM) Fluxo 0,4mL/min	
<b>Tempo</b>	<b>Eluente A (%)</b>	<b>Eluente B (%)</b>
0 min	100	0
14.9 min	100	0
<b>15 min</b>	0	100
24.9 min	0	100
<b>25 min</b>	100	0
35 min	100	0
<b>Fase estacionária utilizada:</b> Coluna analítica Zorbax Bonus RP C8 (150x4,6mm, 5 µm), da Agilent® .		
<b>Temperatura do forno de coluna:</b> 35°C .		
<b>Gradiente de eluição:</b> 15 minutos.		

Quanto as variantes tóxicas de saxitoxina encontradas na cepa T-3 foram: GTX 1-5, Neo-STX, dc-STX e STX. A concentração final foi determinada com a soma de todas as variantes levando em consideração suas toxicidades relativas (tabela 3), obtendo-se, então a concentração total de STX equivalentes.

Com as amostras quantificadas e rotuladas deu-se início a realização dos testes toxicológicos.

Tabela 3: Concentração dos padrões ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) certificados e as toxinas relativas das diferentes variantes de Saxtoxinas.

Concentrações	Toxina relativa
GTX 1: 19,878848	0,9940
GTX 2: 36,1239	0,3592
GTX 3: 13,728	0,6379
GTX 4: 6,483664	0,7261
GTX 5: 19,7288	0,0644
Neo-STX: 16,3848	0,9243
dc-STX 16,328832	0,5131
STX: 19,3544	1,0000

## 3.2 – TESTE TOXICOLÓGICO AGÚDO COM *Artemia salina*

### 3.2.1 - ECLOSÃO DOS CISTOS E MONTAGEM DOS TESTES

Um meio de água salgada artificial (salinidade 28) foi preparado utilizando água destilada (destilador, Fisatom – Brasil) e sal marinho. Os cistos de *A. salina* foram colocados em um béquer contendo este meio com aeração (aerador Boyu SC-3500) e luz artificial ( $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ ) constantes durante 48 horas para que houvesse a eclosão dos mesmos. A água de diluição utilizada nos testes veio do mesmo estoque utilizado para a eclosão dos cistos.

Placas de contagem de 96 poços (COSTAR-USA) foram utilizadas para a realização dos experimentos. Cada poço da placa foi considerado um frasco de teste com volume de  $300\mu\text{L}$ . Com o auxílio de um pipetador (PV20-Gilson) os organismos (total de 10 por poço) foram passados, um a um, do frasco de cultivo aos poços. Cada pipetagem capacidade de volume de  $10 \mu\text{L}$ , contendo assim  $100 \mu\text{L}$  de volume do meio no final procedimento. Após, todos os poços foram acrescidos de mais  $100\mu\text{L}$  de água de diluição.

Os últimos  $100 \mu\text{L}$  colocados nos poços continham o concentrado tóxico de equivalentes de saxitoxina ( $\mu\text{L}$  do estoque de  $126,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em água de diluição. A diluição dos concentrados foram de  $30 \mu\text{L}$ ;  $15 \mu\text{L}$ ;  $7,5 \mu\text{L}$ ;  $3,8 \mu\text{L}$ ;  $1,9 \mu\text{L}$ ;  $0,9 \mu\text{L}$  para  $100 \mu\text{L}$  totais (concentrado + água de diluição). O controle foi realizado pelo mesmo procedimento, porém com os últimos  $100\mu\text{L}$  contendo apenas água salgada artificial.

Os poços foram registrados com suas respectivas concentrações e divididos em triplicatas: A, B e C. Foram colocados todos em estufa incubadora (BOD3476 FANEM - Brasil) com temperatura e fotoperíodo controlados. Os organismos mortos foram contados nas horas 24 e 48 do experimento. O teste foi realizado 10 vezes, isso ocorreu devido a disponibilidade e acesso aos organismos teste, a metodologia aplicada era simples e rápida, o que contribui para a realização de vários experimentos em um curto espaço de tempo, o gasto de concentrado tóxico era baixo, pois o volume dos poços para os testes era bastante reduzido e por último um maior número de testes pôde mostrar uma repetitividade dos resultados aumentando assim a confiabilidade do teste.

A fim de descartar o efeito do ácido contido nos concentrados em causar a mortalidade dos organismos pela redução do pH, um ensaio apenas utilizando ácido clorídrico (HCl) 0,05N nas mesmas proporções que continham no concentrado de saxitoxinas, foi realizado com a mesma metodologia do ensaio. Não houve mortalidade ao final do ensaio com HCl 0,05N.

### 3.2.2 - METODOLOGIA E EXECUÇÃO DOS TESTES

A metodologia utilizada nos testes foi adaptada de Meyer *et al*, 1982. As adaptações realizadas ocorreram: no tempo de duração do experimento, salinidade do meio da solução teste, número de soluções testadas, fator de diluição e volume do teste. O detalhamento dos testes realizados se encontram na tabela 4 .

Tabela 4: Condições e critérios atribuídos para a aceitabilidade dos testes agudo realizados com a *Artemia salina*.

Exigências ensaios	Execução
Sistema do teste	Estático
Duração	48 horas
Temperatura	25°C
Salinidade	28
Qualidade da luz	Ambiente (laboratório)
Fotoperíodo	12 horas C: 12 horas E
Volume do teste	300 µL
Renovação da solução	Não
Idade organismo	2 dias
Nº org./ réplica	10
Nº replica/solução	3
Nº soluções	6 mais + controle
Fator de diluição	0,5
Aeração	Não
Limpeza dos frascos	Não requerido
Água de diluição	salgada artificialmente
Efeito	Mortalidade
	Sobrevivência controle ≥
Critério de aceitação	90%

Não houve necessidade de alimentação dos organismos devido a rápida duração dos testes. Além do mais, o pouco volume utilizado nos mesmos (300 µL) somado com uma alimentação e eventuais sobras tornaria o meio bastante instável quanto a sua

qualidade (pH, oxigênio dissolvido), poderia tornar os resultados dos testes menos precisos.

Ao final das 48 horas foram calculadas a média dos organismos mortos e os organismos que permaneceram vivos foram sacrificados.

### **3.3 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM *Litopenaeus vannamei***

#### **3.3.1 - SOLUÇÃO TESTE: PREPARO E DILUIÇÕES**

Diferente dos testes realizados com *A. salina* a água de diluição utilizada neste teste foi água do mar natural previamente filtrada (filtro éster de celulose 1 µm) coletada na Estação Marinha de Aquicultura – EMA, FURG. Isso ocorreu, pois, os organismos já eram cultivados nesta água desde seus estágios larvais. Com isso, a fim de evitar um maior período de adaptação dos organismos a um meio produzido artificialmente, optou-se pela utilização desta água natural. Nos dias que foi utilizada para os experimentos, a água de diluição deste possuía salinidade 27.

Cinco concentrações de equivalentes de saxitoxinas foram pré-estabelecidas para a realização do ensaio toxicológico:

**50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg.L<sup>-1</sup>**

Além destas concentrações o grupo controle também realizou-se em triplicata, onde neste foi utilizado apenas água de diluição.

As soluções-teste (300mL) foram colocadas em frascos de 500mL, rotulados e divididos em triplicatas A, B e C. A temperatura foi controlada com auxílio de termostato (Roxin HT-1300) e fotoperíodo com luz ambiente de laboratório. A aeração (aeradores, Boyu SC-3500) ocorreu durante todo o experimento, e o pH foi medido no começo e final do experimento com auxílio de um medidor de pH (Marte MB-10, Brasil).

### 3.3.2 - ORGANISMO TESTE: ORIGEM, CULTIVO, ALIMENTAÇÃO E MONTAGEM DO TESTE

A coleta dos camarões para a realização dos testes ocorreu na EMA, onde estes eram cultivados e encontravam-se no estágio de pós-larvas de 30 dias. Os organismos foram trazidos para a LCF para aclimação antes do início dos testes.

Em um tanque com temperatura (25°C, termostado Roxin HT-1300) e aeração (aerador Boyu SC-3500) controlados constantemente, os organismos foram mantidos por 5 dias, neste período de aclimação os camarões foram alimentados diariamente com ração comercial (40J, Guabi ®).

Com as soluções teste prontas, os camarões foram transferidos com o auxílio de uma rede para os frascos teste, onde posteriormente foi inserido o tubo de aeração e os potes vedados com plástico filme. Os frascos foram mantidos em “banho-maria” em um frasco maior possuindo termostato (Roxin HT-1300), com temperatura pré-estabelecida em 25°C. Não houve renovação do meio durante o teste, sendo este considerado teste estático.

Devido estágio de vida que se encontravam os organismos durante os testes, fez-se necessário a alimentação diária dos mesmos, pois não os alimentando se induziria ao canibalismo. O convencional em um teste com alimentação dos organismos durante a exposição ao toxicante é a renovação periódica do meio (teste semi-estático), porém como não haveria estoque de composto tóxico suficiente para renovar todos os meios e suas respectivas concentrações, visto que a quantidade de toxinas necessárias era bastante alta, não foi possível renovar o meio durante o teste.

### 3.3.3 - METODOLOGIA E EXECUÇÃO DO TESTE

O *L. vannamei* não é um organismo utilizado com frequência em testes toxicológicos, por isso a metodologia foi criada. Seu detalhamento pode ser observado na tabela 5 que se encontra abaixo.

Tabela 5: Condições e critérios atribuídos para a aceitabilidade do teste agudo realizado com *Litopenaeus vannamei*.

Exigências ensaios	Execução
Sistema do teste	Estático
Duração	96 horas

Temperatura	25°C
Qualidade da luz	ambiente de laboratório
Fotoperíodo	16horas C : 8horasE
Volume do teste	300mL
Renovação da solução	Não
Idade organismo	PL 40
Nº org./ réplica	5
Nº replica/solução	3
Nº soluções	5 + controle
Fator de diluição	0,5
Aeração	Constante
Limpeza dos frascos	não requerido
Alimentação	1x ao dia
Água de diluição	natural filtrada
Efeito	Mortalidade
Critério de aceitação	sobrev. Controle $\geq$ 90%

---

A contagem de organismos mortos ocorreu a cada 24 horas, onde estes eram observados, contados e retirados dos frascos teste. Logo era verificado o funcionamento do termostato e aeradores, colocava-se alimento e os frascos novamente vedados. Ao final das 96 horas foi calculada a média dos organismos mortos. Os organismos que sobreviveram foram sacrificados.

### **3.4 - TESTE TOXICOLÓGICO CRÔNICO COM *Litopenaeus vannamei***

#### **3.4.1 - SOLUÇÃO TESTE: PREPARO E DILUIÇÕES**

Como realizado no teste agudo com *L.vannamei* a água também era de origem marinha e previamente filtrada (filtro éster de celulose 1 µm), no momento da realização dos testes a salinidade encontrava-se em 22.

A concentração pré-estabelecida para a realização do ensaio toxicológico foi de 3 µg.L<sup>-1</sup> de equivalentes de saxitoxina. A escolha desta concentração teve como base o resultado do teste toxicológico agudo com *L.vannamei*, resultado este que encontra-se no item 4.3 do presente capítulo. Como critério de escolha, foi calculada uma concentração 5 vezes menor que a concentração letal para 50% dos indivíduos (CL 50) determinada no teste agudo. Apenas uma concentração foi escolhida para a realização do teste, devido a ocupação apenas temporária do equipamento de filmagem (filmadora Sony Handycam hdr-cx 220), porém reconhece-se que o ideal para o estudo completo seria com outras concentrações testadas.

Neste ensaio, cada organismo foi contado como uma réplica, pois todos possuíam comportamento único dentro do teste, logo a concentração testada e o grupo controle continham 5 réplicas cada. Para os controles foi utilizada água salina previamente filtrada, do mesmo reservatório usado no preparo das soluções.

Na realização do ensaio, a solução-teste e controle foram colocadas em frascos de 5L rotulados. A temperatura de ambos foi controlada com termostato (Roxin HT-1300) e fotoperíodo com luz ambiente de laboratório regulado manualmente. A aeração utilizava aerador (Boyu SC-3500) ligado durante todo o experimento.

### **3.4.2 - ORGANISMO TESTE: ALIMENTAÇÃO E MONTAGEM E APLICAÇÃO DO TESTE CRÔNICO**

Foram coletados na EMA juvenis de *L. vannamei* com biometria de aproximadamente 2 gramas. Estes foram embalados e transportados para a LCF para período de aclimação. Este período teve duração de 5 dias, onde os organismos foram alimentados com ração comercial (40J, Guabi ®) uma vez ao dia. Temperatura e aeração foram controlados constantemente com os mesmos equipamentos utilizados nos outros testes. Após aclimação, deu-se início o teste toxicológico crônico.

Cinco organismos foram colocados em cada frasco teste (grupo controle e tóxico) contendo 5 L de solução teste. Temperatura em 25°C e aeração constante foram novamente controladas durante todo o experimento. Fotoperíodo foi controlado com luz artificial (500 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-2</sup>) de forma manual. No começo, final e em cada troca de

solução teste foi verificado o pH (Marte MB-10, Brasil) e corrigido se necessário com NaOH.

Embora a constante de velocidade de biodegradação das saxitoxinas varie entre  $8 \times 10^{-4}$  e  $1.3 \times 10^{-2} \times \text{Horas}^{-1}$  e a meia vida das mesmas quando exposta em corpos aquosos seja entre 2,2 e 36,1 dias (Ho *et al.*, 2012), optou-se pela renovação diária da solução teste. Isso por que a meia vida mínima encontrada em estudos anteriores era menor que a duração do teste, e a concentração tóxica necessária para a realização do mesmo era baixa, não comprometendo, portanto o estoque de toxicante da LCF. Após cada renovação da solução teste, os parâmetros físico-químicos (temperatura, pH) foram ajustados para valores semelhantes aos do dia anterior, sendo em seguida os organismos trocados de solução. Os organismos pertencentes ao grupo controle, passaram pelos mesmos procedimentos a fim de sofrer os mesmos tipos de efeitos que os organismos contaminados.

### **3.4.3 - MONTAGEM DO AQUÁRIO E FILMAGENS**

Utilizando metodologia adaptada de Cazenave *et al.*, 2008, foi avaliada a capacidade locomotora dos organismos após serem expostos a saxitoxinas por um período de tempo (120 horas). Com isso, foi confeccionado um aquário de dimensões 31x25x9cm (comprimento x altura x profundidade) para a realização das filmagens do experimento. Um fundo preto com marcações de 5 cm<sup>2</sup> foi colocado na parte traseira do aquário afim utiliza-lo como referência para a contagem de deslocamento dos organismos no teste.

Após o período de exposição, os cinco organismos foram inseridos no aquário, e deixados por 3 horas ambientando-se ao novo local. As filmagens começaram em seguida deste período.

As filmagens foram realizadas com câmera filmadora (Sony Handycam hdx-cx220), em baterias de 10 minutos. Os horários onde as baterias ocorreram foram 12:00, 14:00, 16:00, 20:00, 22:00, 00:00. Nas filmagens noturnas, utilizou-se iluminação vermelha, a fim de evitar o estresse causado pela luz nos organismos. Durante as filmagens, os organismos não receberam alimentação. Os organismos foram sacrificados após a realização das filmagens. No grupo controle o procedimento das filmagens foi realizado da mesma maneira que o do dia anterior e nos mesmos horários. Estes também foram sacrificados e descartados ao final do experimento.

Os vídeos foram transferidos a um computador apropriado para posterior análise. A contagem de deslocamento ocorreu através da análise do quinto minuto de vídeo (5:00 – 6:00). A movimentação dos camarões foi avaliada através do deslocamento destes pelos quadrados, onde cada passagem de quadrado foi considerada uma unidade de contagem.

### 3.4.4 - METODOLOGIA E EXECUÇÃO DOS TESTES

Como já mencionado, a metodologia deste experimento foi adaptada de Cazenave *et al.*,2008, sem utilizar os programas de avaliação de deslocamento utilizados pelo autor citado e nem respeitado o mesmo tempo de exposição ao toxicante. O detalhamento do teste encontra-se na tabela 6 abaixo.

Tabela 6: Condições para o teste agudo e critérios de aceitabilidade para *L. vannamei*.

Exigências ensaios	Execução
Sistema do teste	Semi-estático
Duração	120 horas
Temperatura	25°C
Qualidade da luz	Ambiente de laboratório
Fotoperíodo	16 horas C : 8 horas E
Volume do teste	5 L
Renovação da solução	A cada 24 horas
Idade organismo	Juvenis
Nº org./ concentração	5
Nº soluções	1 + controle
Aeração	Constante
Limpeza dos frascos	1x ao dia
Alimentação	1x ao dia
Água de diluição	Natural filtrada
	Alteração capacidade
Efeito	Natatória

### 3.5 - ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos com a morte dos organismos nos dois testes agudos, foram analisados através do programa Trimed Sperman Karber 1.5. Este programa faz a correlação dos dados de morte ou efeito observados em testes toxicológicos, e dá estimativas da Concentração Letal para 50% dos organismos (CL<sub>50</sub>), Concentração

Efetiva para 50% dos organismos ( $CE_{50}$ ) além de seus intervalos de confiança máximo e mínimo.

Para analisar a movimentação dos camarões no teste crônico foi realizada uma ANOVA de medidas repetidas, com fator tratamento de 2 níveis fixos (controle e tóxico) e 6 níveis variados (horários das filmagens). Com o resultado foi possível determinar se as medições de controle e grupo tóxico haviam diferenças significativas, com alfa de 0,05, ou seja, se o grupo tóxico sofreu alteração na sua capacidade de locomoção depois de ser exposto a solução contaminada com saxitoxinas.

## **4 - RESULTADOS**

### **4.1 - CONCENTRAÇÃO TÓXICA DAS SOLUÇÕES TESTE**

Foram utilizadas três soluções para a realização dos testes. A solução teste utilizada no teste toxicológico agudo com *A. salina* foi chamada de “concentrado 1”. A análise por cromatografia encontrou variantes GTX2, Neo-STX, Dc-STX e STX. Para a execução do teste toxicológico agudo com *L. vannamei*, foi utilizado a solução teste chamada de “concentrado 2”. Analisando a mesma, foram encontradas as variantes GTX2, GTX3, Neo-STX, Dc-STX e STX. No teste crônico com a mesma espécie de camarão utilizou-se a solução teste chamada de “concentrado 6”. Por cromatografia líquida foi constatado que esta última solução continha GTX2, GTX3, GTX5, Neo-STX e STX. A concentração total encontrada expressa em STX.eq nas 3 soluções teste, respectivamente, foram de 127,6 ; 154,6 e 253,6  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Na tabela 7 abaixo encontra-se discriminado as variantes encontradas nas amostras assim como suas respectivas concentrações na análise e as concentrações reais, resultado esse obtido após a multiplicação das concentrações pelas toxicidades específicas de cada variante.

Tabela 7: Variantes, concentrações na análise de CLAE e a concentração real de STX.eq em  $\mu\text{g.L}^{-1}$  encontradas em cada uma das 3 soluções teste utilizadas nos testes toxicológicos

Variantes encontradas	Concentrado 1		Concentrado 2		Concentrado 6	
	Concentração encontrada na análise $\mu\text{g.L}^{-1}$	Concentração real em STX.eq $\mu\text{g.L}^{-1}$	Concentração encontrada na análise $\mu\text{g.L}^{-1}$	Concentração real em STX.eq $\mu\text{g.L}^{-1}$	Concentração encontrada na análise $\mu\text{g.L}^{-1}$	Concentração real em STX.eq $\mu\text{g.L}^{-1}$
GTX5	0	0	0	0	10,4	0,7
GTX3	0	0	0,8	0,5	6,89	4,4
GTX2	7,65	2,8	18,73	6,7	21,13	7,6
Neo-STX	39,6	36,6	13,96	12,9	57,71	53,3
Dc-STX	62,97	32,3	90,4	46,4	0	0
STX	55,94	55,9	88,11	88,11	187,56	187,56
<b>Total STX.eq <math>\mu\text{g.L}^{-1}</math></b>		<b>127,6</b>		<b>154,6</b>		<b>253,6</b>

#### 4.2 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM *Artemia salina*

Os parâmetros temperatura e fotoperíodo foram controlados em estufa incubadora, por isso não tiveram variações entre os experimentos.

Utilizando o programa Trimmed Spermán Karber 1.5 nos 10 testes toxicológicos realizados encontraram-se  $CL_{50}$  máxima de  $4,76 \mu\text{g.L}^{-1}$  e mínima de  $2,11 \mu\text{g.L}^{-1}$  com uma  $CL_{50}$  média de  $3,02 \mu\text{g.L}^{-1}$  e desvio padrão de 0,98. Os valores de todas as  $CL_{50}$  assim como os limites de confiança máximos e mínimos estão descritos na tabela 8 abaixo.

Tabela 8: Concentração letal para morte de 50%  $CL_{50}$  da *Artemia salina* em  $\mu\text{g.L}^{-1}$  nos 10 experimentos realizados com saxitoxinas, assim como os limites de confiança máximos e mínimos dos mesmos.

Experimento	$CL_{50}$	limite de confiança	
		mínimo	máximo
#1	4,76	3,6	6,29
#2	3,99	3,68	4,33
#3	4,36	3,02	6,28
#4	3,05	2,82	3,29
#5	2,28	1,85	2,84
#6	2,48	2,05	3,00
#7	2,11	1,71	2,59
#8	2,29	1,86	2,80
#9	2,39	1,97	2,90
#10	2,48	1,99	3,08

Com os dados de  $CL_{50}$  e as mortalidades de cada concentração encontrados em cada experimento, foi possível obter uma curva dose resposta média e os respectivos erros de cada concentração, onde estes são os desvios padrões do % de mortalidade dos organismos de todos os experimentos em cada concentração testada. Segue abaixo a curva dose resposta (figura 4) para o teste toxicológico agudo com *Artemia salina*.

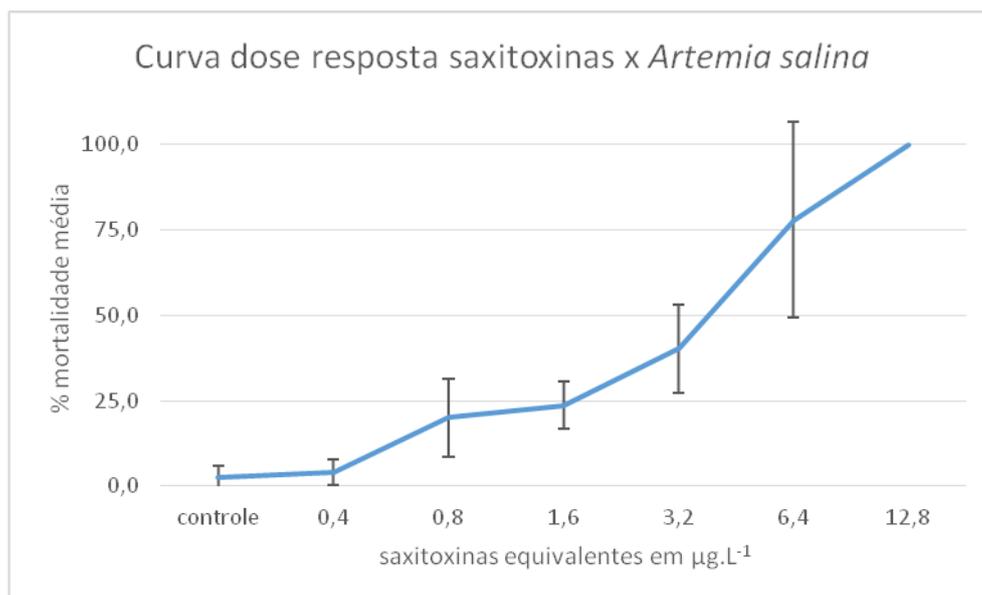


Figura 4: curva dose resposta média dos 10 testes toxicológicos agudos realizados com *Artemia salina*, onde os erros são os desvios padrões da mortalidade observada em todos os experimentos por concentração testada.

Observando a figura 4 é possível ver o aumento da mortalidade de organismos com o aumento das concentrações de saxitoxinas. Encontra-se mortalidade máxima na concentração de  $12,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ . No entanto devido ao maior desvio encontrado foi na concentração de  $6,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ , houveram mortalidades variando desde 23,33% até 100% dos indivíduos de *Artemia*.

#### 4.3 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM *Litopenaeus vannamei*

Durante a realização do teste, os parâmetros físico-químicos (temperatura, pH e salinidade) mantiveram-se praticamente constantes. Por isso, os dados destes

parâmetros são apresentados na tabela 9 abaixo em forma de médias por concentração testada.

Tabela 9: médias dos parâmetros físico-químicos temperatura, pH e salinidade observados durante o teste toxicológico agudo com *Litopenaeus vannamei*.

Concentrações de saxitoxinas equivalentes em $\mu\text{g.L}^{-1}$	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	pH	Salinidade
Controle	27,2	7,61	27
3,125	27,2	7,54	27
6,25	27,2	7,61	27
12,5	27,2	7,60	27
25	27,2	7,56	27
50	27,2	7,55	27

Como foi realizado apenas um teste agudo com *L.vannamei*, foi gerado através do programa Trimmed Spearman Karber 1.5 apenas uma  $CL_{50}$  de  $17,27 \mu\text{g.L}^{-1}$  e limites de confiança mínimo e máximo de  $12,99 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $22,98 \mu\text{g.L}^{-1}$  respectivamente. Abaixo encontra-se a curva dose resposta do experimento (figura 5), onde os erros são os desvios padrões gerados pela diferença de mortalidade ocorrida entre as triplicatas de cada concentração.

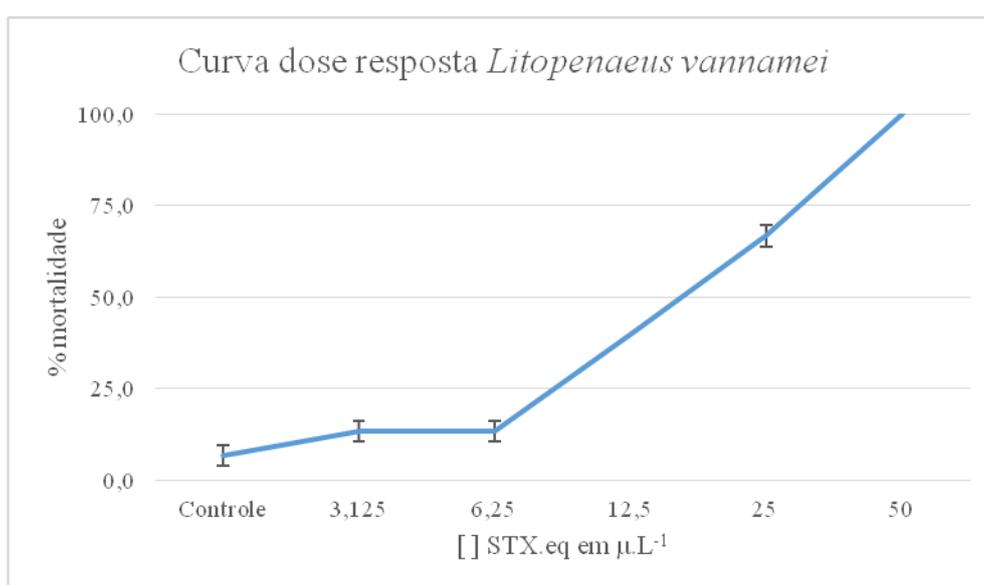


Figura 5: curva dose resposta do teste toxicológico agudo de equivalentes de saxitoxinas no *Litopenaeus vannamei*.

A curva dose resposta mostra que nas duas primeiras concentrações testadas a mortalidade foi baixa, porém a partir destas o percentual de mortalidade aumenta até atingir o máximo (100% de mortalidade) na concentração de 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

#### 4.4 - DIFERENÇA ENTRE AS $CL_{50}$ DE *Litopenaeus vannamei* e *Artemia salina*

Ao analisarmos os dois resultados de  $CL_{50}$  de *L.vannamei* e *A. salina* encontramos valores de 17,27 e 3,02  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de saxitoxinas, respectivamente. Com isso, se estabelece que a *A. salina* possui uma sensibilidade aproximadamente cinco vezes maior que o *L. vannamei* quando expostos a saxitoxinas.

#### 4.5 – TESTE TOXICOLÓGICO CRÔNICO COM *Litopenaeus vannamei*

As medições dos parâmetros físico-químicos durante o experimento são descritas na tabela 10 abaixo.

Tabela 10: Parâmetros físico-químicos do ensaio toxicológico crônico com *Litopenaeus vannamei*

Concentrações $\mu\text{g/L}$	Temperatura $^{\circ}\text{C}$					
	0H	24H	48H	72H	96H	120H
Controle 3	25	25	25	25	25	25
	25	25	26	25	25	25
	pH					
	0H	24H	48H	72H	96H	120H
Controle 3	7,70	7,62	7,64	7,58	7,50	7,68
	7,66	7,59	7,75	7,54	7,60	7,71

Os valores de temperatura permaneceram constantes durante o experimento. O pH variou nas trocas de água, porém esta variação não representou problemas durante o experimento.

Através das filmagens, obteve-se valores de deslocamento dos organismos por horário filmando. O valor da movimentação de cada organismo/horário é descrito na tabela 11 abaixo.

Tabela 11: Deslocamento em quadrantes de cada camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* por cada horário de filmagem analisado.

Deslocamento em quadrantes / minuto filmando						
Grupo	12:00	14:00	16:00	20:00	22:00	00:00
controle	12:00	14:00	16:00	20:00	22:00	00:00
Camarão 1	14	16	7	0	15	0
Camarão 2	9	0	1	0	3	0
Camarão 3	19	0	0	0	1	0
Camarão 4	1	23	15	1	0	1
Camarão 5	18	0	0	6	1	0
<b>Grupo tóxico</b>						
Grupo tóxico	12:00	14:00	16:00	20:00	22:00	00:00
Camarão 1	21	21	0	3	0	19
Camarão 2	26	19	0	3	8	25
Camarão 3	1	0	0	4	2	1
Camarão 4	1	0	2	16	1	1
Camarão 5	15	10	12	0	35	15

Com a análise de variância ANOVA de medidas repetidas com fator duplo de repetição entre o grupo tóxico e grupo controle obteve-se um p-valor de 0,104, valor esse superior ao de 0,05. Com isso, determina-se que para esse tipo de teste estatístico não existe uma diferença significativa entre a movimentação dos camarões do grupo tóxico e controle evidenciando assim, que a solução tóxica onde os camarões ficaram expostos por 120 horas não ocasionou alteração na capacidade natatória dos mesmos. Para elucidar melhor esta afirmação foi feito um gráfico de barras que encontra-se abaixo (figura 6) mostrando o deslocamento médio em quadrantes por concentração dos organismos do grupo controle e tóxico. As barras de erro neste gráfico foram geradas através do erro padrão, que é calculado a partir do desvio padrão.

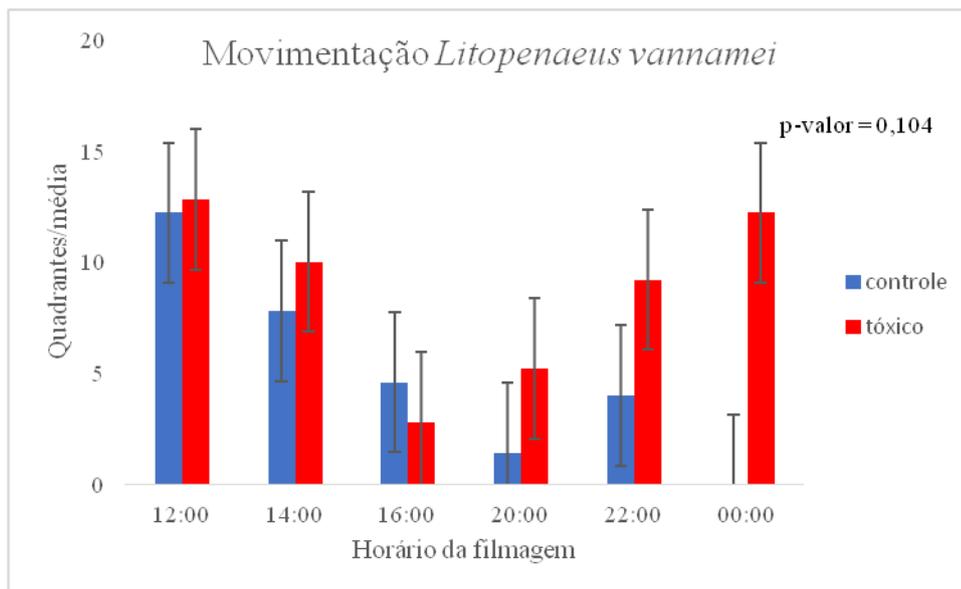


Figura 6: Número médio de quadrantes deslocados pelos grupos controle e tóxico do *Litopenaeus vannamei* em cada horário de filmagem analisado.

A barra do grupo controle não aparece na bateria da meia noite (00:00), pois no vídeo analisado deste horário não houve movimentação dos organismos.

## 5 - DISCUSSÃO

### 5.1 - EFEITO DE EQUIVALENTES DE SAXITOXINA NOS ORGANISMOS TESTADOS

Com a realização dos testes agudos no camarão branco *Litopenaeus vannamei* e no microcrustáceo *Artemia salina* se encontrou concentrações letais para 50% dos organismos testados  $CL_{50}$  de  $17,27 \mu\text{g.L}^{-1}$  de saxitoxinas e  $CL_{50}$  média de  $3,02 \mu\text{g.L}^{-1}$  de saxitoxinas respectivamente. Logo, fica comprovado a sensibilidade de ambos a saxitoxinas.

Outros invertebrados aquáticos, já foram testados quanto à sua sensibilidade a saxitoxinas onde foram encontrados resultados semelhantes.

Em teste toxicológico agudo com *Mysidopsis junia* realizado por Bif *et al.*, 2013 encontrou-se uma  $CL_{50}$  de  $2,34 \mu\text{g.L}^{-1}$  para saxitoxinas. Este resultado é de extrema importância, pois aquele trabalho foi realizado com a mesma cepa tóxica de cianobactéria utilizada no presente trabalho sendo inclusive utilizado metodologia semelhante. Assim, como *Mysidopsis Junia*, *A. salina* é sensível o suficiente para a realização de testes toxicológicos.

Com os cladóceros *Daphnia pulex*, *Daphnia gessneri* e *Moina micrura* foi testado o efeito de uma floração de *Cylindrospermopsis raciborskii* (estimada em células. $\text{mL}^{-1}$ ) na capacidade natatória. Foram encontrados efeito reversíveis entre 464 e 2000 células  $\text{mL}^{-1}$  em *D. pulex* e *M. micrura*, respectivamente. Não foi encontrado efeitos em *D. gessneri* (Ferrão-Filho *et al.*, 2008). Embora não tenha havido quantificação da concentração de saxitoxinas na amostra, foi comprovada sua presença no bioensaio, devido a ação de paralisia ocorrida nos organismos testados, característica relacionada a ação neurotóxica das saxitoxinas. Ainda por não ter sido quantificado a concentração de saxitoxinas fica impossível comparar as sensibilidades destes organismos com os testados no presente trabalho.

Em juvenis de *L. vannamei*, submetidos a injeções intraperitoneais de 1 mL contendo saxitoxinas, foi encontrado mortalidade com tempo de morte de aproximadamente 2 minutos quando estas injeções continham de  $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$  (Linares *et al.*, 2008). Estes resultados se mostraram mais sensíveis do que o testado no presente trabalho, pois trata-se de uma dose injetada no abdômen do organismo. Em outro trabalho publicado pelo mesmo autor, exemplares de *L. vannamei* expostos a florações produtoras de saxitoxinas foram analisados histologicamente. Nestas análises encontraram-se quantidades significativas de saxitoxinas retidas nos tecidos musculares e glândulas gástricas (Linares *et al.*, 2009). Seria essa uma característica intrínseca da espécie, ou característica adquirida por mutações genéticas como as que ocorreram em exemplares de *Mya arenaria* nos estudos realizados por Bricelj *et al.*, 2005. Mais estudos relacionados a este tema devem ser realizados, pois se esta característica de acumulação for intrínseca da espécie, esta pode tornar-se um sério vetor de cianotoxinas para os seres humanos.

Os resultados do presente trabalho mostraram uma diferença entre as CL<sub>50</sub> dos dois organismos testados de aproximadamente 5 vezes, sendo o *A. salina* mais sensível que o *L. vannamei*. Isso é um resultado de extrema importância para produtores desta espécie de camarão, pois podem vir a utilizar a *A. salina* como um bioensaio de rápida duração utilizado-o de maneira preliminar dentro de suas fazendas. O que pode contribuir de maneira significativa para a preservação da produção do camarão, tornando assim a *A. salina* não só um alimento para o *L. vannamei* como também organismo chave na avaliação da qualidade da água que o camarão estará exposto.

## **5.2 - EFEITO DE EQUIVALENTES DA SAXITOXINA EM RELAÇÃO A CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS NO AMBIENTE**

Florações de cianobactérias produtores de saxitoxinas em concentrações relevantes a nível ambiental são observadas pelo mundo todo, durante grande parte do ano. Estas, dependendo de sua magnitude, podem comprometer a produção de camarão no local, assim como dizima-la, o que acarretaria em grande prejuízo financeiro e nas atividades destes locais impactados.

Em áreas de maricultura localizadas em Santa Catarina, foram encontradas florações com produtores de saxitoxinas. Os organismos predominantes encontrados foram dinoflagelados do gênero *Alexandrium* e cianobactérias do gênero *Trichodesmium sp.* (Rorig *et al.*, 1998).

Entre 2005 e 2008, no rio dos Sinos, pertencente a maior bacia de água doce do Rio Grande do Sul, foram encontradas diversas florações de cianobactérias com picos nos verões de 2005 e inverno de 2006. As florações foram encontradas em concentrações de até 87.000 células.mL<sup>-1</sup> amostra. Dentre as espécies mais encontradas neste estudo estava a *C. raciborskii* conhecida por produzir saxitoxinas (Chaves *et al.*, 2009).

Em estudos realizados no México diversas florações de dinoflagelados vem causando problemas periódicos para a maricultura local, e ocasionando problemas econômicos para a grande maioria dos produtores de pescado marinho no local (Linares *et al.*, 2008).

Em reservatórios do sul e sudeste brasileiro são encontradas todos os anos grandes florações produtoras de saxitoxinas, onde nos períodos de verão estas ocorrem com maior frequência (Yunes *et al.*, 2003). Severas florações foram quantificadas em

dois reservatórios distintos. A mais severa ocorreu no reservatório de Taiapuêba, São Paulo, onde esta foi quantificada com concentrações de  $17 \mu\text{g.L}^{-1}$  de saxitoxinas. Florações ocorrem ao longo dos anos neste local. Outro reservatório foi o do município de Pitangui, onde no segundo semestre de 2002 foi encontrada concentrações de  $8,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de saxitoxinas.

Nota-se com isso, que os valores encontrados na  $CL_{50}$  do presente trabalho ( $17,27 \mu\text{g.L}^{-1}$  de saxitoxinas) com *L. vannamei* são alarmantes. Pois foram encontradas concentrações ambientais com valores próximos aos da concentração letal. Percebe-se ainda, que o cenário pode ficar mais complicado quando notamos que dentro de um cultivo a quantidade de nutrientes é por muitas vezes maior que no ambiente, o que pode propiciar florações mais intensas e com maior concentração tóxica que as encontradas no ambiente, o que acarretaria em sérios prejuízos ao produtor.

### **5.3 - EFEITOS CRÔNICOS NO *Litopenaeus vannamei***

Saxitoxinas são toxinas paralíticas descritas por serem bloqueadoras seletivas de canais de sódio dependentes de voltagem. Este bloqueio causa paralisia neuromuscular, podendo levar o organismo a morte (Aráoz *et al.*, 2010). Devido a isto, foi realizado um ensaio onde analisou-se a capacidade natatória dos camarões após um período em exposição a saxitoxina e equivalentes. Porém, como não é um organismo padronizado para ensaios toxicológicos, foi necessário criar um modelo com base no que se conhece na literatura para outros organismos. Cazenave *et al.*, em 2008 avaliou as mudanças na capacidade natatória de *Jenynsia multidentata* quando expostas a microcistina-RR.

No ensaio crônico de saxitoxinas com os camarões não foi encontrada alterações na capacidade natatória do organismo ( $p > 0,05$ ). Este resultado negativo provavelmente ocorreu devido ao pouco tempo de exposição dos organismos a toxina, assim como a baixa concentração que foi testada. Isso fica evidenciado quando analisamos resultados encontrados em outros trabalhos onde as concentrações testadas eram muito maiores.

Anormalidades neuromotoras foram encontradas em zebrafish (*Danio rerio*) expostos a concentrações entre 201 e 253  $\mu\text{g}$  de saxitoxinas (Lefebvre *et al.*, 2004). Também com zebrafish, foram testadas doses de 7,73 e 11,13  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de organismo, onde encontrou-se disfunção locomotora e deficiência na resposta a estímulo nos organismos (Zhang *et al.*, 2013).

Talvez a estratégia adotada nos experimentos crônicos não tenha sido a ideal, por falta de tempo hábil e matéria prima (entende-se toxicante) para a realização do experimento com demais concentrações a testar. Por isso, há de se ressaltar que uma continuação de experimentos nessa linha de pesquisa se faz necessário para elucidar melhor os efeitos crônicos que as saxitoxinas podem causar nos camarões de cultivo *L. vannamei*.

## 6 - CONCLUSÃO

A produção de saxitoxinas em florações de cianobactérias causam mortalidade de *Artemia salina* e nos camarões *Litopenaeus vannamei* utilizados em cultivo, ambos quando em fase de pós-larvas, visto que nesta fase ambos organismos mostraram-se mais sensíveis à ação das toxinas. Assim, florações nocivas de cianobactérias que ocorrem em ambientes hipereutrofizados como na carcinocultura, existindo a possibilidade da morte dos organismos dentro de um cultivo ou corpo d'água. Há, portanto a necessidade de monitoramento frequente destes locais para evitar a perda de produção. *A. salina* mostrou-se aproximadamente cinco vezes mais sensível que *L. vannamei* a saxitoxinas e pode ser utilizada como bioensaio de rápida identificação desta toxina para o monitoramento de uma fazenda de cultivo, devido a facilidade e agilidade de realizar o teste.

Não foram encontrados efeitos na capacidade natatória do *L. vannamei*, contudo para que esta informação seja mais precisa necessita-se de maiores estudos relacionados ao tema, assim como maior número de concentrações e tempos de exposição testados durante estes testes.

Mais estudos referentes a saxitoxinas e *L. vannamei* são necessários para elucidar melhor os efeitos da toxina nestes organismos. Experimentos para a compreensão da cinética do toxicante no organismo, exposição dos mesmos a diferentes condições, análises genéticas entre outras ficam como estudos posteriores que podem fornecer maior base de conhecimento em relação ao assunto.

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apeldoorn, M.E. van; Egmond, H.P. van; Speijers, G.J.A.; Bakker, G. J. I. 2007. Review. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51. 7–60p.

Aráoz, R; Molgo, J; Marsac, N.T. 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*. 56. 813–828p

Azim, M.E; Little, D.C. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283. 29-35p.

Ballester, L.E.C.; Wasielesky, W.J.; Cavalli, R.O.; Abreu, P.C. 2007. Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture*. 269. 355–362p.

Bif, M. B.; Yunes, J. S.; Resgalla Jr, C. 2013. Evaluation of mysids and sea urchins exposed to saxitoxins. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36. 819–825p.

Bricelj, v.; Connell, L.; Konoki, K.; MacQuarrie, S.; Sheuer, T.; Trainer, V. 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature*. 434. 763-767p.

Browdy, C.L.; Bratvold, D.; Stokes, A.D. 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: *The new wave*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. 125-144p.

Burford, M.A.; Thompson, P.J.; McIntosh, R.P. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*. 219. 393-411p.

Carmichael, W.W 1992b. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*. 72. 445-449p.

Carmichael, W.W. 1994. The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*. 270. 64-72p.

Carmichael, W.W & Falconer, I.R. 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: FALCONER, IR(ed). *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press, Cambridge. 187-209p.

Cazenave, J; Nores, ML; Miceli, M; Díaz, M; Wunderlin, DA; Bistoni MA. 2008. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Research*. 42. 1299–1307p.

Chaves, P. F.; Rocha, S.; Dutra, A.; Yunes, J.S. 2009. Ocorrência de cianobactérias produtoras de toxinas no Rio dos Sinos (RS) entre os anos de 2005 e 2008. *Oecologia Brasiliensis*, 13(2). 319-328p.

Chorus, I. & Bartram, J 1999. Water Resources In: I. Chorus & J. Bartram (eds.). Toxic cyanobacteria in water. A guide to their Public Health consequences, monitoring and management. Spon Press, New York. 211-234p.

Duy, T. N.; Lam, P. K. S.; Shaw, G.; Connell, D. W. 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 163. 113–186p.

Ernst, B. 2008. Investigations on the impact of toxic cyanobacteria on fish – as exemplified by the coregonids in Lake Ammersee. Dissertação de Mestrado. Universität Konstanz, Fachbereich Biologie, Konstanz, Alemanha. 176p.

FAO. 2014. Organización de Las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. In: Examen mundial de la pesca y la acuicultura. Roma 3-67p.

Ferrão-Filho, A.S.; Costa S.M.; Ribeiro, M.G.L.; Azevedo, S.M.F.O. 2008. Effects of a Saxitoxin Producer Strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on the Swimming Movements of Cladocerans. Environmental Toxicology. 23(2): 161-168p.

Ferreira, F. M. B., Soler, J. M. F., Fidalgo, M. L., Fernandez-Villa, P. 2000 PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Doura river, northern Portugal), Toxicon. 39. 757–761p.

Gorham, E. 1964. Litter production in forest of the world. Advances in Ecological Research 2: 101-157.

Hawser, S.P.; Codd, G.A.; Capone, D.G.; Carpenter, E.J. 1992. A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. Toxicon. 29. 277-278p.

Hopkins, J.S.; Sandifer, P.A.; Browdy, C.L. 1995. A review of water management regimes which abate the environmental impact of shrimp farming World Aquaculture Society.

Lagos, N.; Onodera, H.; Zagatto, P.A.; Andrinolo, D.; Azevedo, S.M.F.Q.; Oshima, Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. Toxicon. 37. 1359-1373p.

Lefebvre, K.A.; Trainer, V.L.; Scholz, N.L. 2004. Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin. Aquat Toxicol. 66. 159-170p.

Linares, J. P.; Ochoa, J.L.; Gago Martínez, A. 2009. Retention and tissue damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population? Toxicon. 53. 185-195p.

Linares, J. P.; Ochoa, J.L.; Gago Martínez, A. 2008. Effect of PSP Toxins in White Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. Journal of Food Science. 73(4).

Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. *Journal of Medicine Plant Research* 45. 31-34p.

Oberemm, A.; Becker, J.; Codd, G.A.; Steinberg, C.1999. Effects of Cyanobacterial toxins and Aqueous Crude Extracts of Cyanobacteria on the Development of Fish and Amphibians. *Environmental Toxicology*. 14(1): 77-88p.

Otoshi, C.A.; Tang, L.R.; Dagdaban, D. 2006 Super intensive growout of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Recent advances at the oceanic institute. *Aquaculture*. 225. 34-41p.

Pitois, S.; Jackson, M.H; Wood, B.J.B. 2001. Sources of the eutrophication problems associated with toxic algae, an over-view. *Journal of Environmental Health*. 64. 25–32p.

Ramos, P. B; Diehl, F.; Dos Santos, J. M.; Monserrat, J. M.; Yunes, J. S. 2014. Oxidative stress in rats induced by consumption of saxitoxin contaminated drink water. *Harmful Algae*. 37. 68-74p.

Resgalla Jr., C.; Laitano, K.S. 2002 Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Téc. Facimar*. 6. 153-163p.

Ricklefs, R.E. 1993. *A Economia da Natureza*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 470p.

Rourke, W.A., Murphy, C.J., Pitcher, G., van de Riet, J.M., Burns, B.G., Thomas, K.M., Quilliam, M.A., 2008. *JAOAC Int*.91. 589–597p.

Rosas, C.; Cuzon, G.; Gaxiola, G.; Le Priol, Y.; Pascual, C.; Rossignol, J.; Contreras, F.; Sanchez, A.; Van Wormhoudt, A. 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrates levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 259. 1-22p.

Santos, C.H.A.; Rocha, R.B.; Igarashi, M.A. 2002. Cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em água doce, alimentados com dietas naturais. *Revista Ciência Agronômica*. 33(1):58-63p.

Santos, C.H.A.; Lourenco, J.A.; Igarashi, M.A. 2007. Avaliação do ganho de peso de pós-larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), alimentados com peixes da fauna acompanhante do camarão marinho. *Ciência Animal Brasileira*. 8(1). 7-15p.

Santos, C.H.A.; Lourenco, J.A.; Igarashi, M.A.; Baptista, R.B. 2009. Crescimento e Sobrevivência do Camarão-Branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em diferentes salinidades. *Ciência Animal Brasileira*. 10(3). 783-789p.

Smith, J. L.; Boyer, G. K.; Zimba, P. V. 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*. 280. 5–20p.

- Sivonen, K; Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J, eds, Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management, London, Spon Press. 41–111p.
- Streit, DP; Lupchinski, E; Moreira, H.L.M.; Ribeiro, R.P.; Moraes, G.V.; Vargas, L. 2002. Perspectivas atuais da aquicultura marinha no Brasil. Revista Urutagua. 04. 32-38p.
- Su, Z.; Sheets, M.; Ishida, H.; Li, F.; Barry, W.H. 2004. Saxitoxins blocks L-type Ica. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 308. 324-329p.
- Torgan, LC. 1989. Floração de algas: composição, causas e conseqüências. Ínsula 19. 15-34p.
- Wang, J.; Salata, J.J. & Bennett, P.B. 2003. Saxitoxin is a gating modifier of hERG K+ Channels. Journal of General Physiology. 121. 583-598p.
- Wu, Z.; Zeng, B.; Li, R.; Song, L. 2012. Physiological regulation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in response to inorganic phosphorus limitation. Harmful Algae 15. 53–58p.
- Yunes, J.S.; Cunha, N.T.; Barros, L.P.; Proença, L.A.O; Monserrat, J.M. 2003. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazilian Freshwaters. Comments on Toxicology. 9. 103-115p.
- Yunes, J.S.; Leão, J.C.; Colvara, W.A.; Bif, M.; Kolb, G. 2010. *Toxin production by Cyanobacteria in South Brazilian reservoirs*. In XIII International Congress on Toxic Cyanobacteria.
- Zagatto, P.A.; Bertoletti, E. 2008. Ecotoxicologia aquática, Princípios e Aplicações. Editora Rima. 2ª Edição.
- Zhang, D. L.; Hu, C. X.; Li, H. D.; 2013. Zebrafish locomotor capacity and brain acetylcholinesterase activity is altered by *Aphanizomenon flos-aquae* DC-1aphantoxins. Aquatic Toxicology 139. 139–149p.
- Zimba, P.V.; Grimm, C.C. 2003. A synoptic survey of musty/muddy odor metabolites and microcystin toxin occurrence and concentration in southeastern USA channel catfish (*Ictalurus punctatus* Ralfinesque) production ponds. Aquaculture. 218. 81–87p.
- Zimba, P.V., Mischke, C.C., 2005. Plankton: nutrient dynamics in shrimp and catfish growout ponds. World Aquaculture. 37. 27–31p.

**Avaliação dos efeitos de cianotoxinas sobre crustáceos marinhos com ênfase no *Litopenaeus vannamei*.**

**Capítulo 2 - EFEITO TOXICOLÓGICO DE NODULARINA EM *Litopenaeus vannamei* e *Artemia salina***

**Lucas Abraão Pacheco**

RIO GRANDE  
2015

## 8 - INTRODUÇÃO

O crescimento populacional das últimas décadas e a conseqüente migração da população do interior para os grandes centros urbanos vêm causando sérios impactos no ambiente. A diminuição dos estoques de pescado nos corpos de água é um deles, e vem gerando grandes desafios, pois com o aumento populacional, a demanda de pescados como alimento torna-se cada dia maior (United Nations, 2015).

Assim, a aquicultura vem sendo uma solução para o problema de diminuição dos estoques de pescados. A produção de pescado através da aquicultura ocupava em 2012, 49% de toda a produção de proteína oriunda de pescado consumida pela humanidade (Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, 2014).

Em um sistema de produção intensiva, altas concentrações de compostos orgânicos, principalmente nitrogênio e fósforo provenientes das excretas e excesso de alimentos dos organismos se acumulam dentro dos viveiros, sendo um fator determinante para florações de microalgas e cianobactérias (Hargreaves 2013).

Em uma fazenda de cultivos de camarão, para fins de pesquisa, localizado na Costa Atlântica Sul do Brasil (Praia do Cassino, RS) tem sido empregado um pacote tecnológico extremamente eficaz para o aumento da produção. O sistema chamado de bioflocos tem como características principais, viveiros altamente aerados e enriquecidos com fontes de carbono, estimulando a produção da comunidade bacteriana heterotrófica que servirá de alimento para o crustáceo produzido (Wasielesky *et al.* 2006; Avnimelech 2009). Porém a baixa ou nenhuma recirculação destes ambientes e o acúmulo de nutrientes contribue para a floração de cianobactérias.

Cianobactérias são organismos procarióticos, aeróbicos e fotoautotróficos que se encontram em formas unicelulares, filamentosas e coloniais (Ernst, 2008). Costumam aparecer no ambiente em florações principalmente em locais com altas concentrações de nitrogênio e fósforo dissolvido, além de ambientes com características de baixa circulação de água e altas temperaturas. Quando encontrados no ambiente costumam produzir cheiro desagradável e coloração característica (Torgan, 1989).

Um grande número de espécies possui como característica sintetizarem metabólitos secundários. Onde estes metabólitos são conhecidos como cianotoxinas (Carmichael & Falconer, 1993). Estas cianotoxinas possuem efeitos tóxicos dos mais

variados tipos e costumam entrar em contato com o ambiente quando ocorre a lise celular da cianobactéria (Carmichael, 1992b).

As cianotoxinas são divididas em três grupos, pois variam pelo mecanismo e local de ação. A divisão ocorre em hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas (Chorus e Bartram, 1999).

Desde 2011, florações de *Nodularia spumigena* vem ocorrendo na fazenda localizada na Estação Marinha de Aquacultura (EMA) pertencente à Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Um episódio de grande proporção foi descrito por Costa et al., 2013, em que a floração de *N. spumigena* causou drástica diminuição na produção do camarão branco do pacífico *L. vannamei* onde a sobrevivência no tanque atingido pela cianobactéria foi de apenas 50%, onde sobrevivências acima de 90% são cotidianas quando os viveiros se encontram sem florações deste tipo.

A cianobactéria *Nodularia spumigena* tem como habitat a água salobra e como característica de ser cosmopolita. É um organismo tipicamente filamentoso, além de ser fixador de nitrogênio. Esta espécie é descrita na literatura como a única produtora de uma potente hepatotoxina chamada de nodularina (Apeldoorn et al., 2007).

Nodularina são pentapeptídeos com os dois aminoácidos terminais do peptídeo linear condensados formando um composto cíclico (figura 15). Sua estrutura se assemelha a da microcistina diferenciando apenas pelo número de peptídeos entre as duas (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) (Apeldoorn et al., 2007).

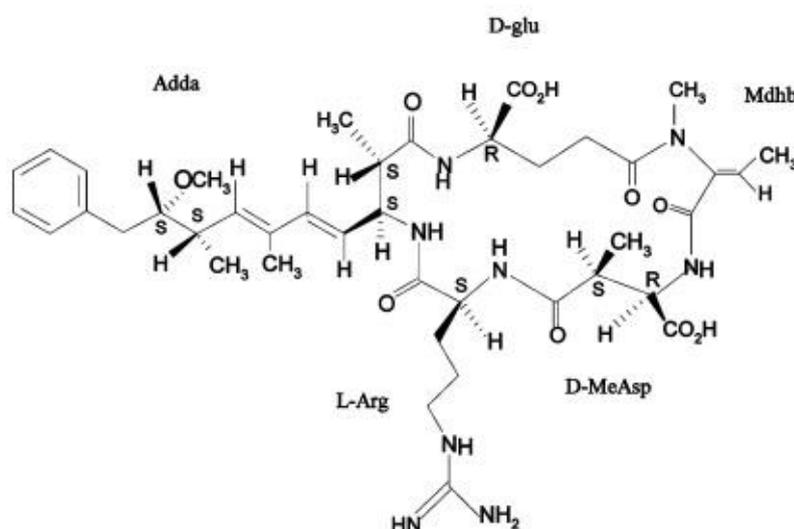


Figura 15: Estrutura química da nodularina (Duy et al., 2000).

Esta hepatotoxina atua na inibição das fosfatases proteicas nos terminais da serina e/ou treonina (PP1 e PP2A). Esta inibição causa a hiperfosforilação do citoesqueleto o que antecede a perda da estrutura celular dos hepatócitos causando assim, hemorragia intra-hepática e insuficiência hepática, podendo levar o animal a morte (Duy *et al.*, 2000; Harada *et al.*, 2004; Yoshizawa *et al.*, 2000).

## 8.1 - ANTECEDENTES COM NODULARINA

Casos com nodularina no Brasil ainda são escassos, pois estudos relacionados a esta toxina ainda são recentes em nosso país. Porém, na floração ocorrida na EMA em 2013 os tanques que continham *Nodularia spumigena* tiveram baixo rendimento de sobrevivência do camarão *Litopenaeus vannamei* (máximo de 50%), enquanto o tanque que não sofreu floração desta espécie de cianobactéria teve taxa de sobrevivência de 98% dos organismos estocados (Costa *et al.*, 2013).

Inúmeros testes toxicológicos são encontrados pelo mundo avaliando-se os efeitos da nodularina sobre organismos de diferentes táxons, porém a maioria dos estudos são sobre vertebrados e mamíferos. Um exemplo de estudo que foge ao que foi dito anteriormente foi realizado com adultos do microcrustáceo *Artemia salina*, onde estes foram expostos a concentrações de nodularina, observando-se aumento da atividade da GST (Beattie *et al.*, 2003), porém neste estudo não foi observado morte dos organismos.

Estudos em peixes também foram encontrados. Em trutas (*Salmo trutta*) alimentadas com dose única de alimento contaminado com nodularina, mostraram severa lesão hepática a uma concentração de toxina de 125 mg kg<sup>-1</sup> de alimento ofertado (Kankaanpaa *et al.*, 2003).

Porém, o maior número de estudos se deu com camundongos. Saito *et al* (2001) relataram que injeções intraperitoneais contendo nodularina foram aplicadas em camundongos e doses letais entre 30 e 50 µg.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo. Outro estudo com camundongos com doses contendo 10 e 15 µg.kg<sup>-1</sup> foram ministradas e verificou-se aumento do fígado dos organismos e diminuição das atividades da superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase (Lankoff *et al.*, 2002). Em um teste *in vitro*

utilizando hepatócitos de camundongos expostos a nodularina, foi encontrado uma  $CL_{50}$  de  $62 \text{ ng.mL}^{-1}$  de nodularina onde concentrações abaixo de  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ , não foi encontrado toxicidade ( Park *et al.*, 2002).

Portanto, muitas são as evidências dos efeitos hepáticos ocasionados pela nodularina em organismos dos mais diferentes táxons.

## **8.2 - TESTES TOXICOLÓGICOS**

Como ocorrido no capítulo 1, o presente capítulo faz uso de testes toxicológicos para realizar estudos dos efeitos de florações de cianobactérias. Estes contribuem para analisar efeitos das toxinas produzidas sobre os organismos vivos, incluindo a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem (Zagatto & Bertoletti, 2006).

### **8.2.1 - ORGANISMOS TESTE**

Os dois organismos teste utilizados neste trabalho foram o camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone) e o microcústáceo *Artemia salina*. O primeiro foi escolhido, pois possui alto valor comercial e é o produto final de uma fazenda de carcinocultura. A *A. salina* foi bastante utilizada como organismo teste em ensaios toxicológicos na década de 90 (Resgalla & Laitano, 2002). Embora atualmente não seja mais utilizada com frequência, dentro de uma fazenda de aquicultura é de extrema importância, pois é alimento base dos primeiros estágios de vida do *L. vannamei*. Além do mais, pode vir a servir como um teste toxicológico preliminar rápido e fácil, servindo de parâmetro ao produtor em relação a florações que ocorram em sua fazenda.

*Artemia salina* (figura 16) é um microcústáceo da ordem Anostraca, filtrador que possui como hábitos alimentares consumir bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos dissolvidos no meio. A filtração ocorre nos toracópodos, encarregados de conduzir as partículas alimentícias em direção ao sistema digestivo. Seus cistos são de fácil eclosão e são encontrados facilmente em lojas de aquários, não precisando assim serem capturados no ambiente.



Figura 16: *Artemia salina*. Fonte: [https://c1.staticflickr.com/5/4049/4451152486\\_298af267f8\\_z.jpg?zz=1](https://c1.staticflickr.com/5/4049/4451152486_298af267f8_z.jpg?zz=1)

O *Litopenaeus vannamei* (figura 17) é um camarão nativo do Pacífico, que se distribui da costa mexicana até o Peru. Esta espécie está entre as mais cultivadas no mundo (FAO, 2007). No Brasil começou a ser produzida com mais evidência no início da década de 90 e hoje é a espécie mais produzida (Streit *et al.*, 2002; Lotz, 1997). Isso se dá por que a espécie é rapidamente adaptável a variados ambientes e tipos de cultivo, e ainda possui ótima aceitabilidade no mercado consumidor atual.

Embora este camarão seja marinho, seu cultivo pode ser realizado, sob grandes variações de salinidade. Isto é comprovado, através de diversos estudos com aclimação, sobrevivência, crescimento e cultivo desta espécie que mostraram a viabilidade do cultivo em águas continentais (Velasco *et al.*, 1999; Rosas *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2002; Yong-Chin Lin & Jiann-Chu Chen, 2003; Mendes *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009).



Figura 17: *Litopenaeus vannamei* fonte:

[http://www.sharkseafoods.com/components/Fck/userfiles/image/Shrimps/q6\(1\).png](http://www.sharkseafoods.com/components/Fck/userfiles/image/Shrimps/q6(1).png)

## **9 – OBJETIVOS**

### **9.1 - OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a toxicidade de uma floração ambiental de *Nodularia spumigena* produtora de nodularina sobre dois organismos cultivados em fazendas de aquicultura, sendo eles o camarão branco *Litopenaeus vannamei* e o microcrustáceo *Artemia salina*.

### **9.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a concentração letal para 50% dos organismos testados (CL<sub>50</sub>) de nodularina a partir de uma amostra de *N. spumigena* coletada em uma fazenda de aquicultura em testes com pós-larvas de *L. vannamei*.
- Determinar a CL<sub>50</sub> da mesma amostra contendo nodularina em testes com náuplios de *A. salina*.
- Determinar se há diferença de sensibilidade nos efeitos da toxina entre os dois organismos testados, o que pode contribuir para o monitoramento e avaliação dos impactos de uma floração ocorrente em uma fazenda de aquicultura que cultive as espécies estudadas.

## 10 - MATERIAL E MÉTODOS

### 10.1 - COLETA, DETERMINAÇÃO DA ESPÉCIE E PROCESSAMENTO AMOSTRAL

Uma floração fitoplantônica ocorreu na Estação Marinha de Aquicultura, EMA – FURG, no verão 2013-2014. Com isso, foi coletada uma amostra da água dos viveiros deste local e levada para o Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas (LCF: [www.cianobacterias.furg.br](http://www.cianobacterias.furg.br)) afim de determinar espécies dominantes. Para esta determinação utilizou-se um microscópio invertido (Zeiss, Axiovert-Alemanha), onde constatou-se a dominância da cianobactéria *Nodularia spumigena*, esta determinação levou em consideração as características morfológicas da espécie descritas por Komarék, 1993.

Embora *N. spumigena* fosse a espécie dominante na amostra coletada, havia a necessidade de purificação da mesma para utilização nos testes toxicológicos, visto que outras espécies como diatomáceas, clorofíceas e protozoários encontravam-se na mesma. Com isso, utilizou-se uma característica morfológica da espécie dominante: as vesículas de gás. Estas vesículas permitem a suspensão das células na água contribuindo assim para uma otimização da fotossíntese (Sivonen *et al.*, 1989). Utilizando essa característica, inicialmente foi realizado centrifugações (MLW modelo K70D) com potência de 2.000 rpm em baterias de 30 minutos onde as células saudáveis da *N. spumigena* foram separadas das de outras algas pois, após o procedimento, as células de *N. spumigena* permaneciam flutuando no sobrenadante, diferentemente das células das outras espécies. Após, colocou-se o sobrenadante em buretas deixando-o em repouso pelo período de um dia. Ao final deste período, com o auxílio de uma rede fitoplantônica (50 µm) recolheu-se as células flutuantes concentrando-as e posteriormente descartando o resto da amostra. Este concentrado foi então lavado com meio de cultura F/2 (Guillard, 1975) por três vezes, obtendo-se uma amostra contendo apenas células saudáveis de *Nodularia spumigena*.

Para preservar estas amostras e evitar a degradação da toxina que possivelmente encontrava-se presente, o concentrado foi passado para frascos rotulados e levado a congelamento em freezer convencional e posteriormente liofilizado a -30°C

(Micromodulyo-Edwards, Inglaterra). Com a amostra liofilizada, retirou-se uma alíquota da mesma para uma análise quantitativa de nodularina presente.

## **10.2 - DETERMINAÇÃO DE NODULARINA PRESENTE NAS AMOSTRAS**

Análises qualitativas e quantitativas para nodularina foram realizadas nas amostras. Utilizou-se uma alíquota do pó liofilizada e foi extraído com metanol e água (1:1) com duração de 24 horas a frio. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 6.000 rpm por 20 minutos (Hermle Labnet-centrifuga-USA), o sobrenadante foi então levado a concentração em um evaporador rotatório. Após, uma alíquota de 1 mL de água milli Q foi utilizada para resuspending o concentrado, onde este foi levado para análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A CLAE foi realizada com o mesmo equipamento descrito no capítulo 1, porém nesta análise acoplou-se um detector UV-DAD. Os padrões utilizados nesta análise foram padrões comerciais para detecção de nodularina (Sigma-Aldrich® e Abraxis®).

Os valores finais de concentração encontrados na análise foram calculados com a integração das áreas e tempos de retenção dos picos encontrados (238 nm) em comparação com as áreas e tempos de retenção dos picos (238 nm) encontrados nos padrões de Nodularina utilizados.

## **10.3 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM *Artemia salina***

### **10.3.1 - ECLOSÃO DOS CISTOS E MONTAGEM DOS TESTES**

A metodologia empregada na produção da água de diluição, eclosão dos cistos e montagem dos testes foi idêntica a realizada nos testes com saxitoxinas que se encontram descritas no item 3.2.1 do capítulo 1. Porém, as concentrações testadas foram diferentes. Como não se sabia até o momento da realização dos testes a real concentração de nodularina nas amostras, optou-se por utilizar concentrações de pó liofilizado por litro ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) para a realização dos mesmos.

Placas de contagem de 96 poços (COSTAR-USA) foram utilizadas para a realização do experimento. Os experimentos foram realizados com 6 concentrações

mais controle em triplicatas A,B e C. As 6 concentrações pré-estabelecidas foram as seguintes:

**5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 e 0,16 mg.L<sup>-1</sup> de pó liofilizado.**

Os testes ocorreram com temperatura e fotoperíodo controlados em incubadora (BOD3476 FANEM-Brasil). A contagem dos organismos mortos foi realizada nos tempos 24 e 48 horas de experimento. Como o teste realizado com *A. salina* no capítulo 1, este também foi repetido 10 vezes. Isto explica-se pela fácil disponibilidade e acesso aos organismos, metodologia simples e rápida de ser aplicada, e possuir uma baixa utilização de amostra para a realização dos mesmos. Além disso, um maior número de testes pode mostrar uma repetitividade dos resultados aumentando assim a confiabilidade do teste.

### **10.3.2 - METODOLOGIA E EXECUÇÃO DOS TESTES**

Metodologia, adaptações do método de Meyer *et al*, 1982 e detalhamento dos testes incluindo a tabela 4 foram idênticos aos mostrados no item 3.2.2 do capítulo I.

## **10.4 – TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM *Litopenaeus vannamei***

### **10.4.1 - SOLUÇÃO TESTE: PREPARO E DILUIÇÕES**

A metodologia de preparo das soluções teste foram idênticas as realizadas no item 3.3.1 do capítulo 1. Porém, a água coletada na EMA possuía para este teste salinidade 25, além do mais, as concentrações testadas também foram definidas pelas concentrações de pó liofilizado por litro (mg.L<sup>-1</sup>). As concentrações estabelecidas para este teste foram:

**5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 e 0,16 mg.L<sup>-1</sup> de pó liofilizado.**

O controle foi realizado apenas com água de diluição. As soluções teste com volume de 300 mL foram colocadas em frascos de 500 mL em triplicatas A, B e C. Os parâmetros físico-químicos controlados durante o teste foram a temperatura (termostato

Roxin HT-1300), aeração (aeradores Boyu SC-3500) e pH (pHmetro Marte MB-10, Brasil), este último parâmetro foi medido apenas no começo e final do experimento.

#### **10.4.2 - ORGANISMO TESTE: ORIGEM, CULTIVO, ALIMENTAÇÃO E MONTAGEM DO TESTE**

Observar item 3.3.2 do capítulo 1.

#### **10.4.3 - METODOLOGIA E EXECUÇÃO DO TESTE**

Observar item 3.3.3 do capítulo 1.

#### **10.5 - ANÁLISE DOS DADOS**

Assim como nos resultados dos testes toxicológicos agudos realizados no capítulo 1, os testes realizados neste capítulo foram tratados pelo método Trimed Sperman Karber. Este dá estimativas da concentração letal para 50% dos organismos ( $CL_{50}$ ) e a concentração de efeito para 50% dos organismos ( $CE_{50}$ ) através da correlação dos dados de morte ou efeito observados nos ensaios toxicológicos.

## 11 - RESULTADOS

### 11.1 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NODULARINA PRESENTE NO PÓ LIOFILIZADO DE *Nodularia spumigena*

A amostra de pó liofilizado submetida à análise de cromatografia líquida pelo CLAE identificou a presença de nodularina (NOD) na amostra. O tempo de retenção do pico gerado no cromatograma foi entre 6,1 e 6,3 (figura 18), tempo este também identificado para esta toxina pelo equipamento quando o Padrão de Referência Certificado (figura 19) foi analisado. A concentração de NOD encontrada pela análise em CLAE foi de 1,88 $\mu\text{g}$  por mg de pó liofilizado ( $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$  dw).

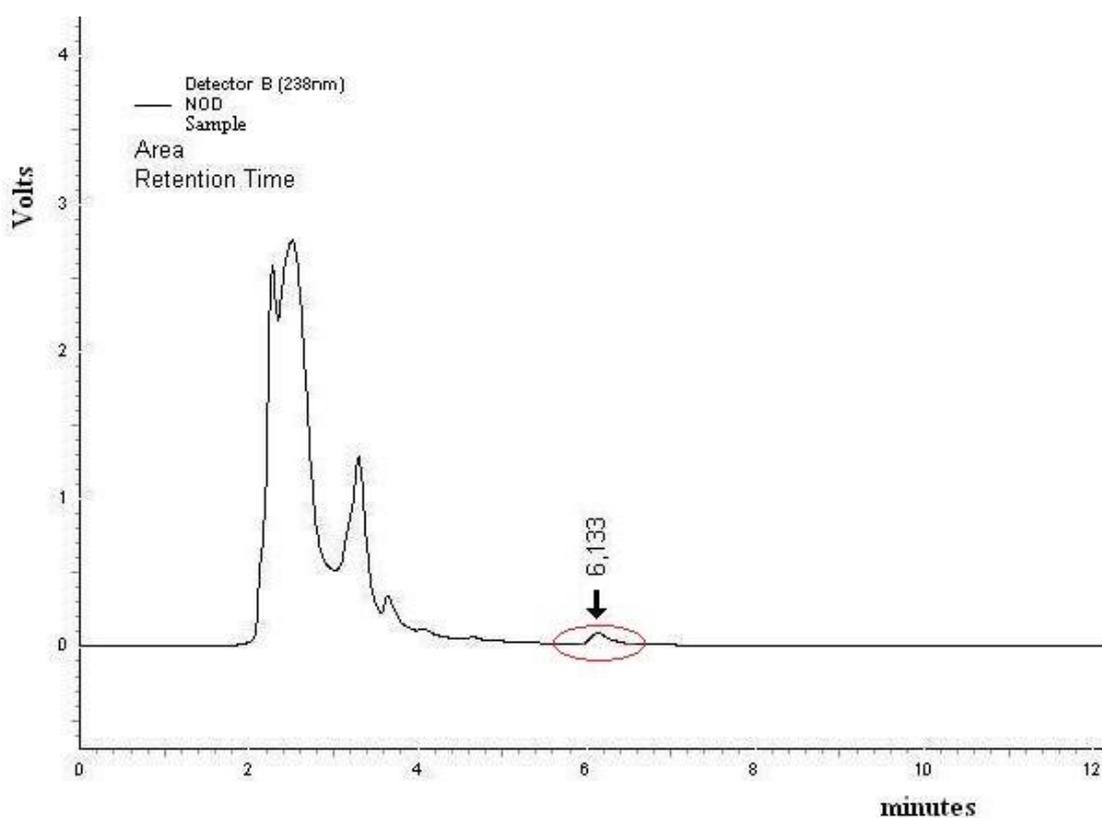


Figura 18: Pico gerado na cromatografia (circulado em vermelho) com tempo de retenção em 6,1 minutos identificando a presença de nodularina na amostra ambiental analisada.

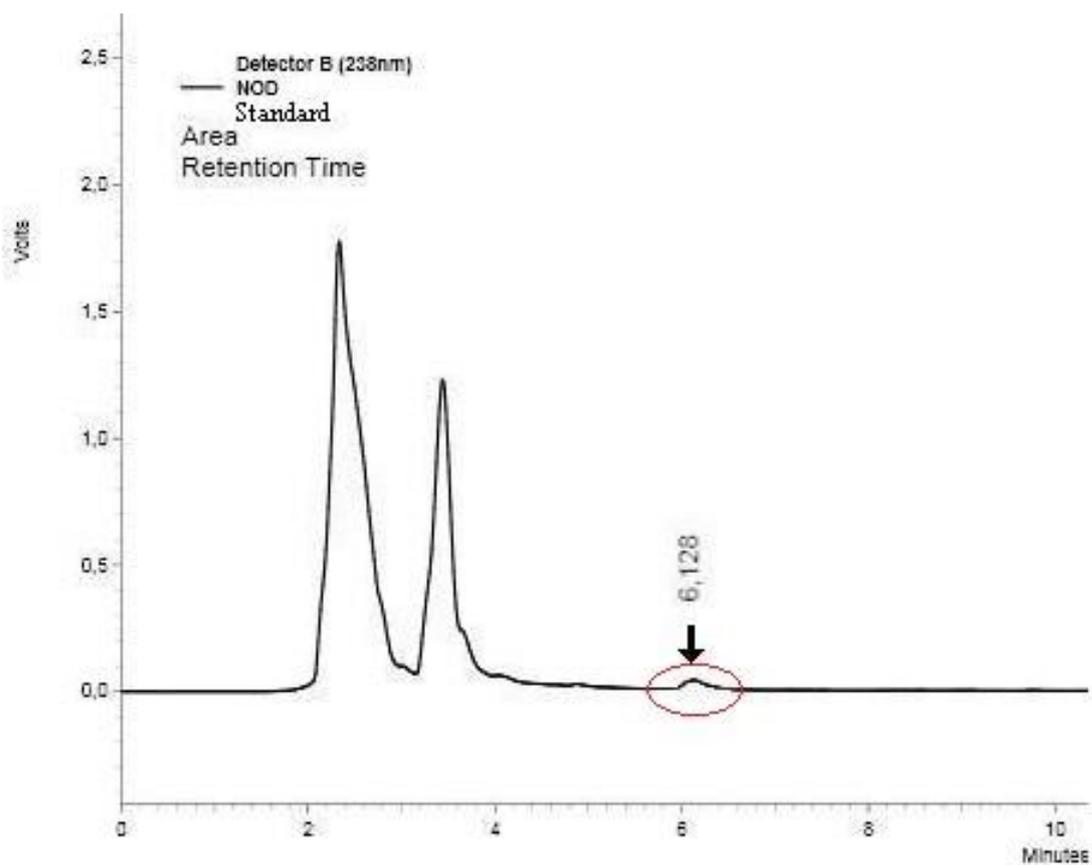


Figura 19: Pico do padrão de nodularina certificado Sigma-Aldrich (circulado em vermelho), com tempo de retenção aos 6,1 minutos.

## 11.2 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM *Artemia salina*

Os parâmetros temperatura e fotoperíodo foram controlados em estufa incubadora, por isso não tiveram variações entre os experimentos.

Como as concentrações testadas foram expressas anteriormente em  $\text{mg.mL}^{-1}$  de pó liofilizado, após a análise do CLAE determinar uma concentração para esse mesmo pó, foi calculado as concentrações utilizadas nos testes toxicológicos com *A. salina*, onde estas foram expressas em  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de nodularina. As concentrações testadas foram as seguintes: 300,8; 582,8; 1.184,4; 2.350; 4.700; 9.400.

Nos 10 testes toxicológicos realizados encontraram-se  $\text{CL}_{50}$  máxima de 4.906,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e mínima de 1.222  $\mu\text{g.L}^{-1}$  com uma  $\text{CL}_{50}$  média de 1940,16  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e desvio padrão de 1106,41. Os valores de todas as  $\text{CL}_{50}$  assim como os limites de confiança máximos e mínimos estão descritos na tabela 12 abaixo.

Tabela 12: Concentração letal para morte de 50% CL<sub>50</sub> da *Artemia salina* em  $\mu\text{g.L}^{-1}$  nos 10 experimentos realizados com nodularina, assim como os limites de confiança máximos e mínimos dos mesmos.

Experimento	CL <sub>50</sub>	limite de confiança	
		mínimo	máximo
#1	4.906,8	3.722,4	6.448,4
#2	2.556,8	1.823,6	3.572
#3	1222	902,4	1.635,6
#4	1692	1128	2.425,2
#5	1.560,4	1.240,8	1974
#6	1.522,8	1.109,2	2.105,6
#7	1504	1.052,8	2.124,4
#8	1.729,6	1.240,8	2.387,6
#9	1.259,6	996,4	1.579,2
#10	1.447,6	977,6	2.124,4

Com os dados de CL<sub>50</sub> e as mortalidades de cada concentração encontrados em cada experimento, foi possível obter uma curva dose resposta média e os respectivos erros de cada concentração, onde estes são os desvios padrões do % de mortalidade dos organismos de todos os experimentos em cada concentração testada. Segue abaixo a curva dose resposta (figura 20) para o teste toxicológico agudo com *Artemia salina*.

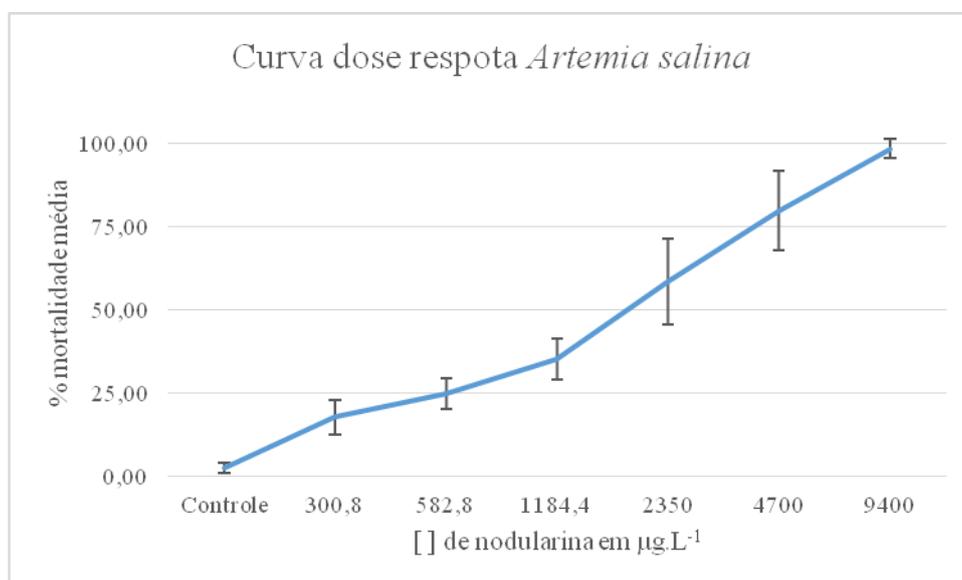


Figura 20: curva dose resposta média dos 10 testes toxicológicos agudos realizados com *Artemia salina*, onde os erros são os desvios padrões da mortalidade observada em todos os experimentos por concentração testada.

O aumento da mortalidade de organismos ocorreu com o aumento das concentrações de nodularina testadas, onde encontra-se mortalidade máxima na concentração de  $9400 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Diferentemente dos testes toxicológicos realizados com *A.*

*salina* descritos no capítulo 1, não houve uma concentração que o desvio padrão foi discrepante dos demais, apenas duas concentrações com um desvio um pouco maior (2.350 e 4.700  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), porém as variações entre os experimentos, não foi grande.

### 11.3 - TESTE TOXICOLÓGICO AGUDO COM *Litopenaeus vannamei*

Como ocorrido no teste toxicológico agudo com *L. vannamei* realizado no capítulo 1 (item 4.3), os parâmetros físico-químicos (temperatura, pH e salinidade) mantiveram-se praticamente constantes. Com isso, os dados destes parâmetros são apresentados na tabela 13 abaixo em forma de médias por concentração testada.

Nos experimentos realizados com *L.vannamei*, também foram realizados os cálculos necessários para transformar as concentrações de  $\text{mg.mL}^{-1}$  de pó liofilizado em  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de nodularina, assim neste caso as concentrações testadas foram: 582,8; 1.184,4; 2.350; 4.700; 9.400.

Tabela 13: médias dos parâmetros físico-químicos temperatura, pH e salinidade observados durante o teste toxicológico agudo com *Litopenaeus vannamei*.

Concentrações de nodularina em $\mu\text{g.L}^{-1}$	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	pH	Salinidade
Controle	25	7,7	25
582,8	25	7,5	25
1184,4	25	7,3	25
2350	25	7,4	25
4700	25	7,4	25
9400	25	7,2	25

No único teste toxicológico realizado com *L.vannamei* deste capítulo, gerou-se uma  $\text{CL}_{50}$  de 2.500,4  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de nodularina e limites de confiança mínimo e máximo de 2.049,2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 3.064,4  $\mu\text{g.L}^{-1}$  respectivamente. A curva dose resposta gerada neste experimento (figura 21) encontra-se abaixo. Os erros expressos tomaram como dados os desvios padrões gerados pela diferença de mortalidade ocorrida entre as triplicatas de cada concentração.

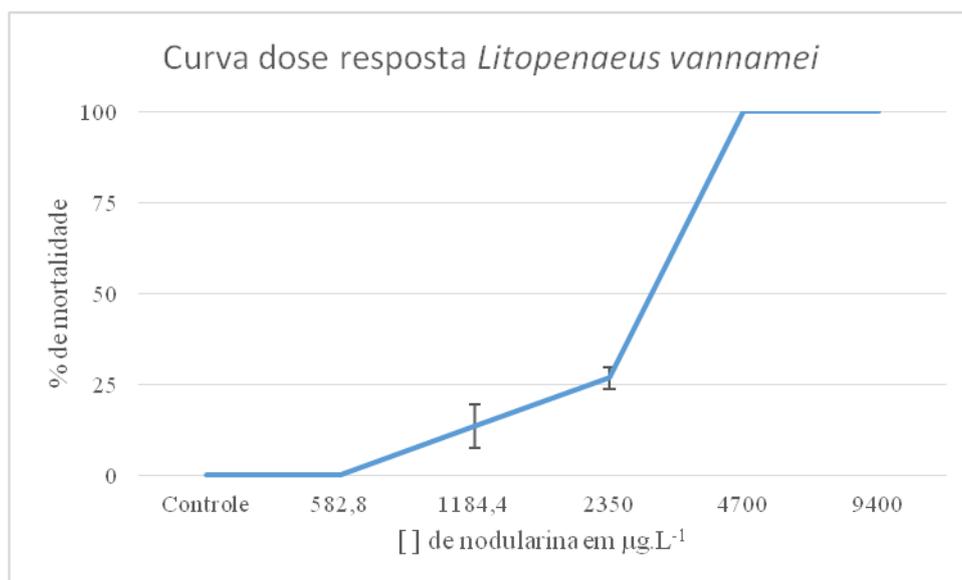


Figura 21: curva dose resposta do teste toxicológico agudo do *Litopenaeus vannamei*.

Observando a curva dose resposta se percebe baixa mortalidade (menores que 30%) nas três primeiras concentrações testadas (582,8; 1.184,4 e 2.350µg.L<sup>-1</sup>) e máxima (100%) nas duas últimas concentrações testadas (4.700; 9.400µg.L<sup>-1</sup>).

#### 11.4 - DIFERENÇA ENTRE AS CL<sub>50</sub> DE *Litopenaeus vannamei* e *Artemia salina*

Ao analisarmos os dois resultados de CL<sub>50</sub> de *L.vannamei* e *A. salina* encontramos valores de 2500,4 e 1940,16 µg.L<sup>-1</sup> de nodularina respectivamente. Com isso, se estabelece que a *A. salina* possui uma sensibilidade aproximadamente 1,3 vezes maior que o *L. vannamei* quando expostos a saxitoxinas.

## 12 - DISCUSSÃO

No presente trabalho foi registrada e quantificada a primeira floração tóxica de *Nodularia spumigena* descrita, com ênfase em uma fazenda de produção do camarão branco *Litopenaeus vannamei* ocorrida no Brasil. A análise da amostra contendo *N. spumigena* recolhida em um dos viveiros da Estação Marinha de Aquicultura – EMA - FURG, obteve concentração 1,88µg por mg de pó liofilizado.

Nos testes agudo realizados com *L. vannamei* e *A. salina* foram obtidas concentrações letais para 50% dos organismos expostos ao toxicante de 2.500,4 µg.L<sup>-1</sup> e 1940,16 µg.L<sup>-1</sup> (valor médio) de nodularina respectivamente. Com isso fica comprovado o potencial tóxico desta floração sobre estes organismos estudados. Esta hepatotoxina é descrita como um pentapeptídeo com possui locais de ação e toxicidade similar as da microcistina (Carmichael, 1989, Yoshizawa *et al.*, 1990).

Concentrações letais (CL<sub>50</sub>-48h) entre 11.200 e 18.000µg.L<sup>-1</sup> foram encontradas em *Daphnia pulicaria*, enquanto em *Daphnia hyalina* a CL<sub>50</sub>-48H ficou entre 2.200 e 6.900 µg.L<sup>-1</sup> de nodularinas (DeMott *et al.*, 1991). Em copépodos a CL<sub>50</sub> encontrada foi de 2.000 µg.L<sup>-1</sup> de nodularinas (Reinikainen *et al.*, 2002). Carmichael, 1989 encontrou CL<sub>50</sub>-18h de 4.790µg.L<sup>-1</sup> para nodularinas em *A. salina*.

Observando estes resultados, é possível perceber que tanto os resultados de *L. vannamei* quanto de *A. salina* são semelhantes ao de outros autores, demonstrando a sensibilidade destes organismos ao composto estudado, e abrindo duas outras opções de organismos que possam ser utilizados em futuros estudos com esta toxina.

Comparando os dois organismos estudados neste trabalho, não houve uma diferença significativa de sensibilidade entre os mesmos por isso, no caso de florações de *N. spumigena*, o produtor não deve utilizar o bioensaio com *A. salina* como dado preliminar de toxicidade, pois se a floração estiver intensa o suficiente para ocasionar mortalidade em massa na *A. salina*, provavelmente ocasionará com *L. vannamei* também, o que traria sérios prejuízos financeiros ao produtor.

Experimentos com camundongos também são frequentes para testar a toxicidade destas florações. Experimentos com camundongos encontraram dose letal de nodularinas para 50% dos organismos (DL<sub>50</sub>) de 60 µg. Kg<sup>-1</sup> de camundongo

(Carmichael, 1989). Porém, como são organismos completamente distintos, torna-se bastante complicado a comparação de efeitos entre os mesmos.

Diversas florações de *N. spumigena* são reportadas em trabalhos científicos. Locais de água salobra típicos para crescimento de cianobactérias da espécie *N. spumigena*, são descritos como impactantes da biota de áreas costeiras do Golfo da Finlândia (Kankaanpää *et al.*, 2001) e em fazendas marinhas no sul da Austrália (Stewart *et al.*, 2012). Florações com dimensões consideradas “excepcionais” foram encontradas no Golfo de Gdansk (Polônia) entre os anos de 2001 e 2002, onde a espécie majoritária foi *N. spumigena*. Posteriormente confirmou-se que aquela floração produzia grandes quantidades de nodularina (Mazur *et al.*, 2003). A juzante do rio Murray (Austrália), florações de *N.spumigena* foram encontrados com frequência. Análises encontraram concentrações entre 1 e 1,72  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de nodularina naquelas florações com densidades entre 50.000 – 80.000 células por mL (Fitzgerald *et al.*, 1999). No lago de Kentucky (USA) em 2002 foi encontrado concentrações menores que 0,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de nodularina, após uma floração de *Nodularia* (Oehrle *et al.*, 2002). Mazur-Marzec *et al.*, 2003 encontraram concentrações de 2,8  $\mu\text{g}$  de nodularina. $\text{mg}^{-1}$  de pó liofilizado. Porém, neste caso nenhuma floração foi tão drástica a ponto de conseguir chegar a  $\text{CL}_{50}$  encontradas neste trabalho. No entanto, vale ressaltar que ambientes de cultivo são confinados e possuem quantidades maiores de nutrientes que o ambiente, podendo então ocorrer florações com magnitudes maiores do que as que são reportadas no ambiente.

Outro problema que ocorre com florações de *N. spumigena* é que diferentemente da neurotoxina estudada no capítulo anterior, esta toxina age em outro sítio de ação, onde não vai levar o organismo a morte rapidamente, porém, ocasionará diversos danos na saúde do mesmo, o que pode gerar perda de produção mesmo quando florações ocorrerem em baixas concentrações.

Logo deve-se ressaltar que embora, não há reportagem sobre florações de *N. spumigena* produtora de nodularina com concentrações semelhantes as  $\text{CL}_{50}$  encontradas no trabalho, estas devem ser monitoradas de maneira minuciosa, pois mesmo florações de pequena magnitude podem vir a causar problemas sérios dentro de uma fazenda de aquicultura.

### 13 - CONCLUSÃO

Difícilmente florações de *Nodularia spumigena*, causam altas taxas de mortalidade de maneira imediata em fazendas de cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*, pois o valor encontrado na CL<sub>50</sub> é alto se comparado com concentrações de nodularina encontradas no ambiente. Porém, como o efeito desta toxina é hepatotóxico esta pode vir a causar danos a longo prazo nos organismos, o que pode acarretar em prejuízo na produção. Portanto, se faz necessário monitoramento constante destas produções além de, mais estudos relacionados ao assunto, para elucidar melhor o comportamento da toxina dentro do organismo.

*L.vannamei* e *Artemia salina* possuem sensibilidade semelhante a esta toxina, portanto a utilização do microcrustáceo em bioensaios para avaliação da qualidade de água dentro de um cultivo, não é tão interessante como no caso de florações de outras espécies de cianobactérias.

Outras técnicas de manejo devem ser criadas e empregadas em fazendas deste tipo, na tentativa de diminuir o aparecimento de florações de *N. spumigena*.

## 14 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apeldoorn, M.E. van; Egmond, H.P. van; Speijers, G.J.A.; Bakker, G. J. I. 2007. Review. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51. 7–60p.

Avnimelech, Y. 2009a. *Biofloc technology - A practical guide book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.

Beattie, K. A., Ressler, J., Wiegand, C., Krause, E. et al. 2003. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquat. Toxicol.* 62. 219–226p.

Câmara, M. R. 2004. Biomassa de *Artêmia* na carcinicultura: repercussões ambientais, econômicas e sociais. *Panorama da Aquicultura*. 14(82). 40-45p.

Carmichael, W. W. 1989. Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. In *Natural toxins: characterization, pharmacology and therapeutics* (Ownby, C. L., and Odell, G. V., Eds.) Pergamon Press, Oxford. 3-16p.

Costa, C.; Wasielesky, W; Odebrecht, C., 2013. Impacto da presença da cianobactéria *Nodularia spumigena* em cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos. Reunião Latina Americana Sobre Algas Nocivas, 7-9 outubro de 2013. Florianópolis, SC, Brazil.

DeMott WR, Zhang QX, Carmichael WW. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol Oceanogr.* 36. 1346–1357p.

Duy, T. N., Lam, P. K. S., Shaw, G., Connell, D. W. 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 163. 113–186p.

FAO 2009. Shrimp fisheries under scrutiny. Disponível em: [www.fao.org](http://www.fao.org).

Fitzgerald, D. J., Cunliffe, D. A., Burch, M. D. 1999. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South Australia. *Environ. Toxicol.* 14. 203–209p.

Gorokhova, E.; 2009. Toxic cyanobacteria *Nodularia spumigena* in the diet of Baltic mysids: Evidence from molecular diet analysis. *Harmful Algae* 8. 264–272p.

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates in “Culture of Marine Invertebrate Animals.” (eds: Smith W.L. and Chanley M.H.) Plenum Press, New York, USA. 26-60p.

- Harada, K.-i., 2004. Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria. *Chem. Pharm. Bull.* 52. 889–899p.
- Hargreaves, J. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquaculture. Eng.*, 34. 344–363p.
- Hargreaves, J.A. 2013. *Biofloc Production Systems for Aquaculture*, 4503: 1–12p.
- Igarashi, M. A.; Sugita, H.; Deguchi, Y. 1989. Microflora associated with eggs and nauplii of *Artemia salina*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55(11). 2045p.
- Kankaanpaa, H., Vuorinen, P. J., Sipi, V., Keinnen, M. 2002. Acute effects and bioaccumulation of nodularin in sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) exposed orally to *Nodularia spumigena* under laboratory conditions, *Aquat. Toxicol.*
- Kankaanpaa HT, Sipi VO, Kuparinen JS, Ott JL, Carmichael WW. 2001. Nodularin analyses toxicity of a *Nodularia spumigena* (Nostocales, Cyanobacteria) water-bloom in the western Gulf of Finland, Baltic Sea, in August 1999. *Phycologia*. 40. 268–74p.
- Komarek, J., Hübel, M., Hübel, H., Smarda, J., 1993. The *Nodularia* studies. 2. Taxonomy. *Algological Studies* 68. 1–25p.
- Lankoff, A., Basanik, A., Nowak, M. 2002. Protective effect of melatonin against nodularin induced oxidative stress in mouse liver. *Arch. Toxicol.* 76. 158–165p.
- Mazur, H., Plinski, M. 2003. *Nodularia spumigena* blooms and the occurrence of hepatotoxin in the Gulf of Gdansk. *Oceanologia*. 45. 305–316p.
- Oehrle SA, Westrick J. 2002. Analysis of Various Cyanobacterial Toxins by LC-MS. LC. GC Europe. 1–6p.
- Park, T. J., Song, K. Y., Sohn, S. H., Lim, I. K. 2002. Marked Inhibition of testosterone biosynthesis by the hepatotoxin nodularin due to apoptosis of leydig cells. *Mol. Carcinog.* 34: 151–163.
- Saito, K., Konno, A., Ishii, H., Saito, H. 2001. Nodularin-Har, a new nodularin from *Nodularia*. *J. Nat. Prod.* 64: 139–141.
- Seale, A. 1933. Brine shrimp (*Artemia*) as satisfactory live food for fishes. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 63. 129-130p.
- Stewart, I.; Eaglesham, G. K.; McGregor, G. B.; Chong, R.; Graham, G. 2012 . First Report of a Toxic *Nodularia spumigena* (Nostocales/ Cyanobacteria) Bloom in Sub-Tropical Australia. II. Bioaccumulation of Nodularin in Isolated Populations of Mullet (*Mugilidae*). *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 9(7). 2412-2443p.
- Reinikainen M, Lindvall F, Meriluoto J. 2002. Effects of dissolved cyanobacterial toxins on the survival and egg hatching of estuarine calanoid copepods. *Mar Biol.* 140. 577–583p.
- Resgalla Jr., C.; Laitano, K.S. 2002 Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Téc. Facimar.* 6. 153-163p.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2015. World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP.241.

WHO 2007. <http://www.euro.who.int/document/fos/news57e.pdf>.

Wasielesky, W.J.; Hatwood; Browdy, C. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 258. 396-403p.

Yoshizawa, S. 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 116. 609-614p.

Yunes, J.S.; Leão, J.C.; Colvara, W.A.; Bif, M.; Kolb, G. 2010. Toxin production by Cyanobacteria in South Brazilian reservoirs. In XIII International Congress on Toxic Cyanobacteria.