



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CLEITON INÁCIO RAMOS

**TERATOGENESE E HISTOPATOLOGIA EM LARVAS DE  
TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS À  
AFLATOXINA B<sub>1</sub>, MICROCISTINA E GLIFOSATO**

---

Londrina  
2010

CLEITON INÁCIO RAMOS

**TERATOGENESE E HISTOPATOLOGIA EM LARVAS DE  
TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS À  
AFLATOXINA B<sub>1</sub>, MICROCISTINA E GLIFOSATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisa Yoko Hirooka

Londrina  
2010

CLEITON INÁCIO RAMOS

**TERATOGENESE E HISTOPATOLOGIA EM LARVAS DE TILÁPIA  
(*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS À AFLATOXINA B<sub>1</sub>,  
MICROCISTINA E GLIFOSATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka  
UEL - Londrina - PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Odete Rocha  
UFSCAR – São Carlos - SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Emília Kiyomi Kuroda  
UEL - Londrina - PR

Londrina, 24 de Março de 2010.

Dedico este trabalho a Deus, à minha família e aos meus amigos

“O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano. Mas sem ela, o oceano será menor.”

Madre Teresa de Calcutá

*Agradeço muito,*

*À minha orientadora Dr.<sup>a</sup> Elisa Yoko Hirooka por todas as oportunidades, pela formação e pela paciência.*

*Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.*

*A todos os professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos especialmente a Sandra Garcia, Sandra Rezende, Patrícia, Neusa e Nelson.*

*Ao Dr. Paulo Cesar Meletti por toda a ajuda, treinamento e amizade. À Dr.<sup>a</sup> Ilce Collus pela paciência e disponibilidade. À Dr.<sup>a</sup> Maria José Sparça Salles pelo encaminhamento e encorajamento. À Dr.<sup>a</sup> Claudia Martinez por disponibilizar o laboratório e pelas orientações. À Dr.<sup>a</sup> Ivone Mizubuti pela ajuda no planejamento da experimentação animal. Ao Dr. Ken-Ichi Harada por disponibilizar o laboratório para análises de microcistina.*

*À Dr.<sup>a</sup> Isabelle Oswald por me receber em seu laboratório em Toulouse, FR. À Dr.<sup>a</sup> Emília pela formação, ensinamentos, exemplos, paciência e pela amizade.*

*Aos colegas do CCB que tanto me ajudaram, a Mari, Pry, Cylene, Kaka e Lili.*

*À Luciana pela valiosa ajuda nas análises de micotoxinas*

*Aos "irmãos científicos" por estarem sempre dispostos a ajudar, Cássia, Bete, Joice, Lu Bernd, Dani, Lu Hayashi, Tatiane, Vagner e Leandro.*

*Aos tão queridos amigos do DCTA Lu Lobato, Alexandre Kuati, Carol Calliari, Nádia, Agnês, Daryne, Ana Augusta, Michele.*

*À Anié Francabandiera por ter me dado a chance e o incentivo para entrar no mestrado.*

*A Luly e a Mari por terem estado sempre ao meu lado e por serem meus aboos.*

*À Lara, Letícia, Carina e Thales pela amizade e carinho.*

*À Juliana, Wanessa, Alex, Aline, Stephanie e Claudia pela amizade de tanto*

*tempo.*

*À Grazi MA por me acolher e me fazer sentir em casa.*

*Aos amigos do laboratório de saneamento, Francine, Karla, Elson, Gisselma, Marcos, Aline e a tantos estagiários.*

*Aos meus estagiários, Heitor e Lívia que chegaram no final e ajudaram muito .*

*Aos técnicos e funcionários da Estação de Piscicultura-CCB pelo fornecimento dos ovos de tilápia.*

*Aos amigos que tanto amo e que por vários motivos estão longe, Pri Hashimine, Yuri Domeniconi e Gustavo Otake.*

*A minha mãe, meu pai e meus irmãos que me deram mais oportunidades do que eles mesmos tiveram.*

*À tantos outros amigos que fizeram e fazem parte da minha vida.*

*À Deus.*

RAMOS, Cleiton Inácio. **Teratogênese e histopatologia em larvas de tilápia (*Oreochromis niloticus*) expostas à aflatoxina B<sub>1</sub>, microcistina e glifosato.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) -Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

## RESUMO

O aumento universal na demanda por produtos de pescado requer implementação de práticas capazes de assegurar a qualidade do produto final, sendo prioritário o manejo adequado aliado ao rigoroso controle de qualidade d'água. A adição de ração eleva o teor de nutrientes da água e pode resultar na eutrofização, morte de peixes e proliferação de cianofíceas produtoras de microcistinas (MCs). O acúmulo tecidual de MCs em peixes pode potencializar o efeito de aflatoxinas (AFs) ingeridas através do consumo de ração. Em adição, o uso de herbicidas a base de glifosato é comum na agricultura, com efeito mutagênico e hepatotóxico demonstrado. Considerando que AF seja potente iniciador de câncer hepático, aliado ao efeito promotor de MCs e uso contínuo de glifosato, a co-ocorrência de contaminantes representaria um perigo em potencial na qualidade dos pescados e na saúde humana. O objetivo do trabalho foi investigar efeito teratogênico e histológico (fígado e rim) de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), extrato celular de *Microcystis* sp. TAC 95 produtora de MC-LR em grande concentração e herbicida comercial Roundup® (princípio ativo glifosato) de forma isolada e combinada destes compostos em ovos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e em respectivo desenvolvimento larval. A exposição aos contaminantes foi iniciada em ovos (placas de Petri, 5ng/mL de AFB<sub>1</sub> por 1 hora), seguida de MC (5jg de microcistina/L) e/ou GF (5jL de produto comercial/L) em placas de cultura celular. Malformações como megalocardia, desvio da cauda e da coluna, foram registradas em fase larval, porém esses efeitos reverteram antes da fase pós-larval, decorrente de baixo nível de exposição, independentemente do contaminante. De acordo com o sistema de escore estabelecido, a MC-LR afetou em maior intensidade os animais, enquanto a AFB<sub>1</sub> não demonstrou efeito detectável sob as larvas, provavelmente devido à concentração utilizada no ensaio. Embora ocorreram alterações teciduais, como diminuição da frequência de núcleos e presença de núcleos vacuolizados, somente as alterações hepáticas diferiram estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do tratamento controle. Em relação a histologia, os resultados mais significantes foram atribuídos ao GF, e não se observando efeito da AFB<sub>1</sub>. Os resultados mostraram que MC e GF, mesmo em doses consideradas baixas e sem efeito tóxico agudo, podem desencadear alterações nos tecidos hepático e renal durante a ontogênese de tilápia e induzindo a leve teratogênese.

**Palavras-chave:** *Microcystis*. Micotoxina. Histologia. Roundup®. Larva. Peixe.

RAMOS, Cleiton Inácio. **Teratogenesis and histopathology of tilapia larvae (*Oreochromis niloticus*) exposed to aflatoxin b1, microcystin and glyphosate**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

## ABSTRACT

The increased demand of fish products worldwide requires the implementation of practices to ensure final product quality, and proper management coupled with the appropriate rigorous control of water quality. The addition of feeding increases the nutrient content in water, which can cause eutrophication, fish death and growth of microcystins (MCs) producing cyanobacteria. The tissue accumulation of MC in fish can potentialize the effect of aflatoxins (AFs) ingested through the intake. In addition, the application of the herbicide glyphosate is common in agriculture, with mutagenic and hepatotoxic demonstrated effects. Whereas AF is potent initiator of hepatocancer, coupled with the promoter effect of MC and glyphosate (GF), the co-occurrence of these substances pose a potential danger in fish and human health. The objective of this experiment was to investigate teratogenic and histological (liver and kidney) effects of aflatoxin Bi (AFBi), cell extract of *Microcystis* sp. TAC 95, MC producer and of commercial herbicide Roundup® (active ingredient glyphosate) and possible combined effect of these compounds in eggs of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and their larval development. Exposure to contaminants was initiated with eggs (Petri dishes, 5 ng /ml of AFB 1 for 1 hour), followed by MC (5ug of microcistina / L) and / or GF (5uL / L) in cell culture inserts. Malformations as megalocardia, deviation of the tail and spine, were recorded in the larval stage but reversed before the post-larval stage, due to low level of exposure, regardless of the contaminant. The MC, according to the established scoring system, affected the fishes at higher intensity, while AFB<sub>1</sub> showed no detectable effect on the larvae, probably due to the concentration used for testing. There were changes in the tissues analyzed, but only the liver differed statistically ( $P < 0.01$ ) from the control treatment. Histologically, the most significant treatment were assigned to the GF, and again the AFB<sub>1</sub> showed no effect. The results showed that MC and GF, even in doses considered to be low and having no acute toxic effect, can trigger changes in the tissues of liver and kidney during ontogeny of tilapia and induce relatively light teratogenesis.

**Keywords:** Microcystis. Mycotoxin. Histology. Roundup®. Larvae. Fish.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental.....	39
Figura 2 - Curva de crescimento da <i>Microcystis</i> sp. TAC95 .....	53
Figura 3 - Espectro de MC-LR por LC-MS/MS .....	54
Figura 4 - Eclodibilidade dos ovos de tilápia.....	55
Figura 5 - Proporção da mandíbula em relação à cabeça das larvas.....	58
Figura 6 - Larva de tilapia diafanizada.....	59
Figura 7 - Escore de malformação macroscópica.....	60
Figura 8 - Malformações de tilápia.....	61
Figura 9 - Simulação da interação microcistina-LR-Glifosato .....	62
Figura 10 - Porcentagem de sobrevivência das larvas .....	63
Figura 11 - Corte longitudinal de larva de tilápia.....	67
Figura 12 - Fígado e rim de larva de tilápia .....	68
Figura 13 - Índice de Alterações Histológicas e Valor Médio de Alterações.....	70
Figura 14 - Fígado de tilapia com alterações histológica .....	72
Figura 15 - Quantidade de túbulos renais no corte central .....	76
Figura 16 – A e B: análise de fumonisinas por CLAE .....	78
Figura 17 - Escore médio de cometa.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Água reconstituída ISO.....	33
Tabela 2 - Composição química do meio ASM1 .....	35
Tabela 3 - Escore para malformações .....	41
Tabela 4 - Alterações histológicas observadas em larvas de tilápia1 .....	45
Tabela 5 - Valores de IAH.....	45
Tabela 6 - Comprimento padrão das larvas de tilápia .....	56
Tabela 7 -Anormalidades na proporção mandíbula/cabeça3.....	57
Tabela 8 - Ocorrência de alterações hepáticas .....	73
Tabela 9- Ocorrência de alterações renais.....	74
Tabela 10 - Médias de índice hepatossomático.....	75
Tabela 11 - Níveis de danos genéticos.....	79

## ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas	h	Hora(s)
Adda	3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadienoic acid	IAH	Índice de Alterações Histológicas
AF	Aflatoxina	IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
AFB-i	Aflatoxina B <sub>1</sub>	IC-ELIS	Indirect Competitive - Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Ala	Alanina	A	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ANOVA	Analysis of variance	kg	Quilograma
APHA	American Public Health Association	Km	Quilômetros
Arg	Arginina	L	Litro
C-ELIS	Competitive Enzyme-linked immunosorbent assay	LC	Liquid chromatography
A	Enzyme-linked immunosorbent assay	Leu	Leucina
CCA	Centro de Ciências Agrárias	LPS	Lipopolissacarídeos
CCB	Centro de ciências Biológicas	M	Metros
CCE	Centro de Ciências Exatas	mA	mili-amper
CIA	Coluna de Imuno-Afinidade	MCs	Microcistinas totais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência	MC	Extrato celular de <i>Microcystis</i> sp. TAC95
CTU	Centro de Tecnologia e Urbanismo	MC-LR	Microcistina -LR
DCTA	Departamento de ciência e tecnologia de alimentos	MC-YR	Microcistina-YR
DNA	Ácido Desoxirribonucléico	Mdha	D-erythro-beta-methylaspartic acid
Emater	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural	MeAsp	Ácido metilaspártico
EPUEL	Estação de piscicultura da Universidade Estadual de Londrina	mg	Miligrama
FAO	Food and Agriculture Organization	min	Minuto(s)
FDA	Food and Drug Administration	mL	Mililitro
g	Gramas	mM	mili-molar
GF	Roundup Original®	MS	Mass Spectrometry
Glu	Ácido Glutâmico	n.d.	Não Detectável
		ng	nanograma
		OD	Oxigênio dissolvido
		OPA	o-ftaldialdeído
		PAS	Periodic acid - Schiff
		pCO <sub>2</sub>	Potencial de dióxido de carbono
		pH	Potencial hidrogeniônico
		pK	Ponto isoelétrico
		POEA	Polioxietileno Amina
		PP1	Proteína Fosfatase 1

PP2A	Proteína Fosfatase 2A	UEL	Universidade Estadual de Londrina
rpm	Rotações por Minuto	v / v	volume / volume
SEAP	Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca	VMA	Valor Médio de Alterações
seg	Segundo (s)	uL	Micrograma
sp.	espécie	%	Microlitro
T	Tratamento	° C	Porcentagem
t	Tempo (dia)		Graus Celsius

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1.	Aspectos da piscicultura brasileira .....	17
2.2.	Micotoxinas em rações para peixe e seus efeitos.....	19
2.3.	Microcistinas e Piscicultura.....	21
2.4.	Herbicida comercial a base de glifosato .....	25
2.5.	Associação de micotoxinas, MC e Glifosato.....	28
3.	JUSTIFICATIVA .....	30
4.	OBJETIVOS.....	31
4.1.	Objetivo geral .....	31
4.2.	Objetivos específicos .....	31
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1.	Local e Instalação Experimental .....	32
5.2.	Animal experimental .....	32
5.3.	Aflatoxina B <sub>1</sub> .....	34
5.4.	Herbicida comercial a base de glifosato .....	34
5.5.	Cultivo de <i>Microcystis sp.</i> TAC95 .....	34
5.5.1.	Cultivo de <i>Microcystis sp.</i> TAC95 .....	34
5.5.2.	Curva de Crescimento de <i>Microcystis sp.</i> TAC95 .....	36
5.5.3.	Preparo do extrato celular de <i>Microcystis sp.</i> TAC95 .....	37
5.6.	Delineamento Experimental.....	37
5.7.	Análise de Perfil Reprodutivo e Citogenética .....	39
5.7.1.	Análise de fecundação .....	39
5.7.2.	Análise da taxa de eclosão.....	40
5.7.3.	Análises citogenéticas.....	40
5.7.4.	Análises teratogênicas .....	41
5.8.	Biometria e captura de imagem.....	42
5.9.	Histologia.....	43
5.10.	Parâmetros Físico-Químicos da Água .....	46
5.11.	Controle de Micotoxinas na Ração Experimental.....	46
5.12.	Metodologia Analítica .....	46
5.12.1.	Determinação de Aflatoxinas .....	46
5.12.2.	Determinação de Fumonisina .....	47

5.12.3.Determinação de microcistina .....	48
5.12.3.1.c-ELISA.....	48
5.12.3.2.Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectometria de Massa.....	48
5.13. Análise Estatística.....	49
6.CAPÍTULO 1: Teratogênese em tilápia-do-nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) por co-exposição à <i>Microcystis</i> sp., aflatoxina B <sub>1</sub> e herbicida à base de glifosato .....	50
6.1.Introdução .....	50
6.2.Material e métodos.....	51
6.3.Resultados e discussão .....	52
6.3.1.Qualidade da água .....	52
6.3.2.Produção e caracterização de microcistina .....	53
6.3.3. Eclodibilidade .....	54
6.3.4.Comprimento .....	56
6.3.5. Proporcionalidade da mandíbula.....	57
6.3.6. Malformação óssea .....	58
6.3.7. Escore de teratogênese .....	59
6.3.8. Sobrevivência .....	62
6.4. Conclusão .....	63
7.CAPÍTULO 2: Histopatologia em larvas de tilápia-do-nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) expostas à aflatoxina B <sub>1</sub> , <i>Microcystis</i> sp., e herbicida à base de glifosato.....	64
7.1.Introdução .....	64
7.2.Material e métodos.....	65
7.3. Resultados e discussão .....	66
Alterações histológicas mais freqüentes observadas nos peixes expostos à estrato de <i>Microcystis</i> sp. TAC95 contendo microcistina, herbicida a base de glifosato e aflatoxina B <sub>1</sub> .....	70
Índice Hepatosomático e Proporção do saco vitelínico.....	74
Conclusão .....	77
8. Notas de pesquisa.....	78
8.1. Análise de Micotoxinas.....	78
Considerações finais .....	82
REFERÊNCIAS.....	84

## 1. INTRODUÇÃO

A aqüicultura mundial vem apresentando índices médios anuais de crescimento de 9,2 % desde 1970, se comparado a apenas 1,4 % na pesca extrativa e 2,8 na produção de animais terrestres. Assim, a produção brasileira de aproximadamente 200.000 toneladas em 2001, atingiu 250.000 em 2002 (FAO, 2003, apud SEAP, 2008).

A piscicultura nacional expressiva concentra-se nas regiões Sul e Sudeste, com destaque aos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Goiás. São Paulo e Paraná contribuem com 60 % da produção nacional, sendo que o primeiro Estado representa mais de 45 % da produção de peixe de água doce (COELHO, 1997). A demanda nacional dos produtos de pescado vem aumentando, sendo assunto prioritário implementar técnicas que assegurem a sustentabilidade e qualidade do produto final através das práticas de manejo, rigoroso controle de qualidade e sanitário de água e insumos, desde o processamento à comercialização de ração.

A fase crítica de produção com maior mortalidade ocorre na larvicultura, reduzindo a taxa de sobrevivência em habitat para 35 % em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e, 36 % em tilápia (*Oreochromis niloticus*) no final de um mês (TESSER, 2006). Fatores intrínsecos e extrínsecos envolvidos com alta mortalidade são desnutrição, manejo inadequado, predação, falta de melhoramento genético, enfatizando a importância de uso de larvas saudáveis e resistentes, aliado ao manejo sustentável.

O uso de herbicidas a base de glifosato é comum, principalmente na produção de soja, algodão e milho, bem como em áreas industriais, comerciais e florestais não relacionadas à prática agrícola. Acredita-se que o composto ativo do glifosato seja seguro para utilização ambiental devido à decomposição rápida. O glifosato caracteriza-se como glicina substituída, capaz de afetar o ciclo do ácido shiquímico bloqueando a síntese de aminoácidos aromáticos levando a planta a morte, mas não afetaria o humano por não apresentar esta rota metabólica, já que

estes tratam-se de aminoácidos essenciais. Porém, pesquisas demonstram que a exposição a herbicida a base de glifosato pode causar efeito mutagênico em camundongo e hepatotóxico em carpa.

A eutrofização artificial pode resultar do manejo inadequado na piscicultura, principalmente de arraçoamento demasiado, aumentando o teor de nutrientes, com ênfase ao fósforo e nitrogênio. A alteração das características físicas e químicas d'água pode causar redução na qualidade sensorial e mortandade de peixe e aumento de cianobactérias como *Microcystis* produtora potencial de microcistinas (MCs) promotoras de câncer hepático.

A fase de larvicultura, a mais frágil devido ao alto índice de mortalidade, esta pode ser causada pela alta susceptibilidade a contaminantes e merece atenção especial. No aspecto da cadeia produtiva de alimento, a co-ocorrência de aflatoxina (AF), um potente iniciador de hepato-câncer, oriunda da possível ingestão de ração contaminada, combinada com contaminantes ambientais na água, a exemplo de microcistina e glifosato, representariam um risco potencial na reprodução e sobrevivência de peixe, principalmente na fase inicial de criação. Aliado a isso, o contínuo arraçoamento pode repercutir na qualidade do pescado, assim como na segurança alimentar devido ao acúmulo de microcistinas nos tecidos de peixe, cujo efeito pode ser potencializado pela aflatoxina (AF) de difícil eliminação tecidual, afetando indiretamente a saúde do consumidor humano.

Tendo como base o perigo da co-ocorrência de compostos indutores cancerígenos e de genotoxicidade em níveis considerados permissíveis em ambiente aquático destinado à produção de peixe, a pesquisa visou avaliar o efeito combinado dos fatores no desenvolvimento embrionário e larval de tilápia. O trabalho trata-se de estudo em continuidade à meta inicial desenvolvida, visando avaliar o impacto do setor produtivo agro-industrial na cadeia produtiva de peixe como alimento saudável para o consumo humano (KAMOGAE, 2007; HASHIMOTO, 2007; FRANCOBANDIERA, 2007).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Aspectos da piscicultura brasileira

O imenso potencial brasileiro perante desenvolvimento da aquicultura se deve a 8.400 km de costa marítima, em adição a 5.500.000 hectares de reservatórios correspondentes a 12 % da água doce disponível no planeta. Aliado a isso, o clima extremamente favorável ao crescimento de peixe cultivado favorece a competitividade comercial, com produção sob custo quatro vezes inferior aos países de clima temperado (MEDRI, 1997), disponibilidade de terra, mão-de-obra abundante e crescente demanda no mercado interno (SEAP, 2008).

A produção de peixe fluvial de 6,6 mil toneladas em 1995 elevou-se para 17,5 mil em 2001, sendo 62 % destinada ao pesque-pague, 26 % às indústrias, 10 % diretamente consumido e 2 % comercializadas em feira (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural – EMATER, 2001). A comercialização através de pesque-pague quadruplicou no Estado do Paraná, com incremento anual de 1,1 mil em 1995 para 4,3 mil toneladas em 2001 (ARAGÃO, 2002). De acordo com a Estatística da Pesca de 2006 realizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais, IBAMA (2009), a Região Sul apresenta a maior produção aquícola continental com 62.823,5 toneladas de peixe, sendo 16.687 toneladas no Estado do Paraná, composta com mais de 70 % de tilápia (*Oreochromis niloticus*).

A produção de tilápia é superada apenas pela de carpas e salmonídeos, respondendo por 5,7% da produção mundial. A produção brasileira de tilápias atingiu um valor superior a 200.000 toneladas (COSTA *et al*, 2009 *apud* IBAMA, 2006). O cultivo intensivo de tilápias demanda o uso de rações nutricionalmente completas e balanceadas, que representa entre 65 e 75% dos custos totais de produção (COSTA *et al*, 2009).

Anteriormente, a aquicultura predominante consistia de cultivo extensivo sem adição de alimento suplementar, cuja produtividade natural sustentava uma baixa densidade de indivíduos e baixa eficiência de produção. Recentemente, o advento de técnicas modernas de aquicultura estimulou a progressiva transformação para

cultivos semi-intensivos ou intensivos, numa evolução essencial para garantir a viabilização econômica da piscicultura (TAKAHASHI, 2005).

A piscicultura brasileira é tradicionalmente praticada em tanques escavados. Contudo nos últimos anos, observa-se uma crescente tendência de amplificação da criação de peixes em tanques rede (SIQUEIRA E RODRIGUES, 2009) aumentando a possibilidade de exposição dos peixes à contaminantes, pois não é possível controlar a qualidade da água.

A crescente produção nacional e a necessidade de maior disponibilidade de juvenis tornam a larvicultura um desafio para pesquisadores e produtores, que vem tentando aumentar a produção de animais saudáveis para a subsequente fase do ciclo de criação (LUZ, 2007).

Os requisitos básicos para o cultivo aquático dependem da perfeita interação entre oxigênio disponível, temperatura, matéria orgânica (fecal, restos alimentares e organismos mortos), nutrientes, espécie e densidade mantida no sistema, cujo equilíbrio colabora para o sucesso da atividade. O arraçoamento eleva o teor de nutrientes, com ênfase ao fósforo e nitrogênio, resultando na eutrofização artificial. As alterações físico-químicas da água devido a eutrofização reduzem o teor de oxigênio dissolvido (OD), causando perda na qualidade cênica, elevação de custo, morte de peixe e aumento de cianobactérias como *Microcystis* sp. potencialmente produtores de microcistinas (PÁDUA, 2002).

No geral, os primeiros estágios de desenvolvimento animal são mais sensíveis a agentes tóxicos, não sendo exceção em relação a peixe (WESTERNHAGEN VON, 1988). Após a eclosão, as larvas com saco vitelínico são móveis, porém são receptoras passivas de contaminantes na água, tornando a larvicultura, a fase mais crítica da criação de peixe, com maior índice de mortalidade, indiferentemente da espécie (FINN, 2006). Assim, é de fundamental importância a realização de estudos que melhorem as condições de criação de larvas e apontem os causadores desses altos índices indesejáveis no desenvolvimento da cadeia produtiva.

A sobrevivência das larvas de tilápia em produções comerciais encontra-se em torno de 70%, pois nesta fase são sensíveis a diversas doenças, baixa qualidade da água, nutrição-alimentação e manejo inadequado. O manejo na piscicultura é um dos itens mais importantes no processo produtivo, pois a adoção da metodologia errada pode inviabilizar o empreendimento. A diferença entre tamanho e a desuniformidade dos animais pode ser devido ao isolamento de cada animal, pois quando tilápias nesta fase do desenvolvimento, são mantidas em alta densidade, ocorre quebra de dominância, permitindo que os peixes cresçam de forma uniforme (TACHIBANA *et al*, 2008)

Em adição aos prejuízos econômicos na piscicultura, outro problema se refere à bioacumulação na cadeia alimentar, afetando a qualidade da carne. O acúmulo de microcistina tecidual em peixe pode indiretamente potencializar o efeito de aflatoxinas (AFs) ingeridas pelo peixe através da ração. Considerando que AF seja um potente iniciador de câncer e, que experimentos demonstraram efeito promotor de MCs, a co-ocorrência representaria risco potencial na qualidade dos pescados e saúde humana.

## **2.2. Micotoxinas em rações para peixe e seus efeitos**

O aprimoramento na elaboração de dieta para peixe visando formulação devidamente equilibradas em energia e proteína, por outro lado, pode aumentar o perigo de exposição a contaminantes naturais. Salienta-se a importância de contaminantes como micotoxinas oriundas de diversas matérias-primas incorporadas na ração, que podem acarretar perdas consideráveis na criação de peixe. Determinadas micotoxinas podem apresentar manifestações toxicológicas e efeitos sobre o sistema imunológico, associados a diversas doenças crônicas e agudas em animais domésticos, seja ave, suíno ou peixe (LOPES *et al.*, 2005).

As rações comerciais para peixes apresentam valores de 24 a 56% de proteína bruta para as fases que compreendem a larvicultura e a terminação. A grande variação dos níveis protéicos está relacionada com o valor biológico da proteína, o custo dos alimentos e a fase de criação. Desta forma a utilização de

rações comerciais em sistemas intensivos de criação necessita de maior atenção em função da quantidade de alimento utilizada e do meio em que os peixes estão, pois a emissão de poluentes ao meio ambiente está também associada à intensificação da aquicultura (GONÇALVES *et al*,2009).

Fungos micotoxigênicos crescem sob condições favoráveis nos mais variados substratos de origem vegetal, afetando a colheita, armazenamento e industrialização. A contaminação por micotoxinas atinge 25 % do suprimento alimentar mundial, constituindo-se no grupo de compostos tóxicos mais freqüentes em cereais e sementes oleaginosas utilizados como ingrediente principal em ração animal (EPPLEY, 1968). Os principais ingredientes na dieta de peixe derivam de matéria-prima constituída de milho, soja, arroz, trigo e triguilho. Em termos práticos, o fato desencadearia dois aspectos indesejáveis causado pelas micotoxinas, metabólitos secundários fúngicos: a perda econômica e o perigo potencial à saúde humana pela contaminação indireta.

Aflatoxinas - AF são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *A.parasiticus* e *A. nomius* isolados frequentemente em cereais e produtos derivados em regiões tropicais e subtropicais, sendo o principal contaminante dos produtos à base de milho e amendoim (NAKAI *et al*, 2008). AF apresenta estrutura química policíclica derivada de cumarina, com bisfurano ligado a uma pentanona (aflatoxinas B), ou lactona (aflatoxinas G), nomeados conforme fluorescência emitida sob luz ultravioleta em B (fluorescência azul do inglês *Blue*) e G (verde, *Green*). Dezoito análogos são reconhecidos, sendo as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> as mais frequentes na natureza (JAIMEZ *et al*, 2000).

AFB<sub>1</sub> é a aflatoxina mais produzida, é altamente mutagênica, tóxica, carcinogênica e teratogênica para humanos e animais. Contaminação por aflatoxina em alimentos e produtos alimentícios é responsável por perdas econômicas significativas (100 milhões de dólares nos EUA em 2004). Em algumas partes da África, China e sudeste da Ásia, contaminação por aflatoxina é correlacionado com a incidência de câncer hepático (ALBERTS *et al*, 2009).

Entre os análogos, a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) caracteriza-se por ser hepatocarcinógeno mais potente, sendo alocado no grupo 1, i.e. carcinógeno a humano (*International Agency For Research on Cancer - IARC, 1993*). Os análogos AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> derivam de AFB<sub>1</sub> e caracterizam-se pela menor toxicidade, porém acarretam sinergismo tóxico (SMITH e MOSS, 1985)

A hepatocarcinogenicidade de AFB<sub>1</sub> foi demonstrada em peixe (SINNHUBER *et al.*, 1977; HENDRICKS, 1982), observando-se ampla variação perante toxicidade e potencial carcinogênico entre as espécies (PLAKAS *et al.*, 1996). Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a exposição prolongada em 0,4 µg/g de AFB<sub>1</sub> causou neoplasma hepático, necrose de hepatócitos e degeneração em tecido pancreático e renal (HALVER, 1969). Em contraste, o bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) requereu DL<sub>50</sub> intraperitoneal de 11,5 mg/Kg de AFB<sub>1</sub> durante 10 dias, sendo mais resistente do que tilápia (JANTRAROTAI & LOVELL, 1990).

### **2.3. Microcistinas e Piscicultura**

Cianobactérias são microorganismos oxigênicos, fototrópicas e procarióticas, existindo simbioticamente com outros organismos em ambiente natural. As cianobactérias tiveram um importante papel no desenvolvimento da vida no planeta Terra com a formação da atmosfera com oxigênio porém atualmente elas apresentaram risco a saúde humana, de animais e do ecossistema. Blooms de cianobactérias podem alterar as propriedades da água (cor, gosto, odor), mas principalmente, elas podem produzir e liberar compostos altamente tóxicos (ANTONIOU *et al*, 2008).

A ecologia das comunidades de microalgas em viveiros de aquicultura é complexa e a maioria das tentativas para manejar as comunidades de fitoplâncton tem encontrado dificuldades (PEREIRA NETO *et al*, 2008). A deterioração da água pela piscicultura associa-se diretamente à eutrofização que favorece a floração (*bloom*), causando morte de peixe pela redução do teor de oxigênio dissolvido ou liberação de cianotoxinas (GOWEN, 1994; TAVARES, 2000). As cianotoxinas predominantes em florescimentos em água doce pertencem ao grupo de peptídeos

cíclicos da família de microcistinas e nodularinas, causadores de falência hepática e morte dentro de poucas horas sob dose aguda em camundongo (SIVONEN e JONES, 1999).

O desenvolvimento acelerado da piscicultura brasileira atraiu criadores inexperientes, gerando impactos negativos na biota aquática e no ecossistema como um todo. A implementação dos sistemas de cultivo sem devido planejamento afetou as condições ambientais, seja pela alteração da flora, fauna ou sedimentos, inclusive alterando moderadamente o clima local. A ração excedente resulta em desequilíbrio ecológico, alterando diretamente o parâmetro físico-químico aquático (PROENÇA & BITTENCOURT, 1994).

Dentre os gêneros de cianobactérias toxigênicas, destaca-se a *Microcystis*, de distribuição universal, cuja produção de MCs ocorrem em “blooms” nos meses favorecidos pela temperatura de 22° C ou acima desta (REYNOLDS *et al.*, 1981).

As microcistinas são heptapeptídeos monocíclicos, compostos de três resíduos de D-aminoácidos na porção invariável e constante da molécula, em adição a dois L-aminoácidos e dois aminoácidos raros. Os resíduos de D-aminoácidos são constituídos de  $D\text{-Ala}^1\text{-R}^2\text{-D-MeAsp}^3\text{-R}^4\text{-Adda}^5\text{-D-Glu}^6\text{-Mdha}^7$ , sendo a MC-LR a variante mais comum encontrada entre as microcistinas, onde os dois L-aminoácidos são a leucina no R<sup>2</sup> e a arginina no R<sup>4</sup> (MAYUMI *et al.*, 2006). A característica marcante de MC consiste de grupamento hidrofóbico Adda (3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico) com papel destaque na hepatotoxicidade, já que remoção ou saturação reduz drasticamente a toxicidade de MC-LR (KONDO *et al.*, 1995). Isômeros geométricos no C<sub>7</sub> de Adda em MC-LR e RR são essencialmente atóxicos (HARADA *et al.*, 1990). A análise por cromatografia líquida associada a espectrometria de massa possui um papel crucial na caracterização de cianotoxinas. Várias técnicas com baixa ou alta energia de dissociação por colisão induzida (CID – collision-induced dissociation) tem sido utilizadas não apenas para identificação de estruturas de cianotoxinas, mas também para possíveis variantes do mesmo grupo (MC-LR vs. MC-LA) e derivados estruturais de um mesmo análogo (MC-LR vs. [MeSer<sup>7</sup>]MC-LR) (ANTONIOU *et al.*, 2008).

A letalidade da MC se atribui ao choque hipovolêmico devido, em parte ao seqüestro de sangue pelo fígado (LeCLAIRE, PARKER, & FRANZ, 1995). A toxina é transportada preferencialmente para hepatócitos e atua nos microfilamentos de actina, com agregação densa de microfilamentos próximos ao centro da célula e consequente perda do suporte celular com destruição de sinusóides endoteliais, ocorrendo hemorragia intrahepática (após horas) e/ou insuficiência hepática (após dias) (RUNNEGAR & FALCONER, 1986; ERICKSSON *et al.*, 1990; HOOSER *et al.*, 1991). A MC ativa a fosfolipase A<sub>2</sub> e cicloxigenase em hepatócitos; em macrófagos induz a produção de TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) e interleucina-1 (IL-1). As microcistinas provavelmente estimulam a via da ciclooxigenase do metabolismo de ácido araquidônico em hepatócito (NASEEN, HINES & CREASIA, 1990). Comparada a promotores de tumor como fenobarbital, hexaclorociclohexano, acetato de ciproterona e ácido chenodeoxicólico, a microcistina é o mais potente promotor de tumor hepático até então conhecido (NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992; MACÍAS-SILVA & GARCIA-SAINZ, 1994).

A intoxicação direta por microcistina decorre da ingestão de água contaminada com cianobactérias tóxicas, enquanto que a modalidade indireta, pelo consumo de animais intoxicados. A bioacumulação de MCs é fenômeno comum em invertebrados e vertebrados aquáticos, incluindo peixes (CARBIS *et al.*, 1997, BEATTIE *et al.*, 1998), moluscos (ERIKSSON *et al.*, 1990) e zooplâncton (WATANABE *et al.*, 1992). A ingestão indireta capaz de afetar a saúde humana dependerá da toxicidade da floração na área de coleta de peixe (PFLUGMACHER *et al.*, 1998).

As microcistinas apresentam toxicidade em peixe (MALYAVEUSKAYA, 1983; PHILIPS *et al.*, 1985), com LD<sub>50</sub> intraperitoneal de 550  $\mu$ g/Kg de peso corpóreo em carpa (*Cyprinus carpio*) (RABERGH *et al.*, 1991) e 2,6mg/Kg em kinguio (*Carassius auratus*) (SUGAYA, YASUNO & TANAI, 1990). A mortalidade repentina e em massa se atribui à inibição da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase e Ca<sup>2+</sup> ATPase Mg<sup>2+</sup> dependente nas brânquias, devido a fosforilação de proteína celular alterada pela inibição de fosfatase PP1 e PP2A (GAETE *et al.*, 1994). As lesões em brânquias de peixe por MC-LR foram observadas em tilápia, truta (GARCIA, 1989) e carpa, com necrose e

estrutura vacuolar, ponta lamelar dobrada e esfoliação do epitélio lamelar (CARBIS *et al.*, 1997).

Em vários estudos, MC-LR tem demonstrado efeito inibidor de proteína fosfatase 1 e 2A e atividade promotora de tumor em fígado de ratos. MC-LR causou efeitos adversos em mamíferos, aves e peixes e é reconhecida por ser um potencial indutor de estresse ambiental, uma ameaça a saúde humana via água e cadeia alimentar (DJEDIAT *et al.*, 2010).

Em carpa, preparações de lipopolissacarídeo - LPS de cianobactéria (*Microcystis aeruginosa* CYA43, floração de *Microcystis* spp. e *Glotrichia* spp.) reduziram significativamente a atividade de Glutathione-S-transferase microsomal (GSTm) e solúvel (GSTs). A redução da atividade GST compromete severamente a capacidade de detoxicação, aumentando a susceptibilidade a outras toxinas de cianobactérias, seja de MCs e/ou outros contaminantes de corpos d'água (BEST *et al.*, 2002).

MAGALHÃES *et al.* (2001) analisaram o nível de MC acumulada em tilápia (*Tilapia rendalli*) durante três anos na Lagoa de Jacarepaguá-RJ, cujo nível máximo de MCs na água atingiu 980 µg/L. MCs foram detectadas em 75 % dos peixes analisados, seja no fígado (nd- 31,1 µg/g), vísceras (nd- 67,8µg/g) e tecido muscular (nd- 26,4 ng/g), embora não ocorresse mortalidade de peixes no período. Não obstante, estes resultados devem ser analisados com cautela, já que os autores utilizaram *kit* comercial de imunoenensaio ELISA, onde existe alta possibilidade de reação falso-positiva, superestimando a concentração de toxina nos tecidos.

Embora tilápia seja resistente à intoxicação aguda, neste peixe não existe evidências demonstrando sistema de biotransformação capaz de metabolizar microcistinas em compostos menos tóxicos. Outrossim, 16,2 ng/g de microcistinas em tecido muscular representa a ingestão de 0,081µg/Kg de microcistinas considerando ingestão de 300g de peixe por indivíduo de 60 Kg (MAGALHÃES *et al.*, 2001), ou seja dobro da dose diária tolerável para humano, calculada em 0,04µg/Kg de peso corpóreo para MC-LR (WHO,2002). Por outro lado, desconhece-se o efeito destas ficotoxinas na reprodução e desenvolvimento larval de peixe. Não

obstante, a mídia tem relatado e advertido os problemas de redução / desaparecimento de determinadas espécies de peixe em áreas poluídas, podendo-se inferir sobre efeito crônico destes contaminantes na reprodução e desenvolvimento embrionário.

A resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA determina que água destinada à criação natural e/ou intensiva na aquicultura para alimentação humana deve preencher requisitos para água de classe 2, estabelecendo limites de nutrientes e características físico-químicas. O limite permitido de MCs em água potável é de 1 µg/L, (portaria 518/2004 CONAMA, 2005).

#### **2.4. Herbicida comercial a base de glifosato**

Os defensivos agrícolas químicos são utilizados na agricultura para o controle de insetos, microrganismos e ervas daninhas, cujos resíduos tóxicos remanescentes causam prejuízo à saúde humana. Cerca de 3 bilhões de toneladas de pesticidas são usados todo ano, em plantações no mundo inteiro (GEORGE, 2010). Embora os defensivos possam ter um efeito benéfico sobre a produtividade agrícola, deve-se considerar o perigo potencial desses compostos químicos no ambiente (SANINO et al, 1999).

O recente avanço biotecnológico resultou no desenvolvimento de plantas resistentes a herbicidas não seletivos. Entre as principais culturas, a soja resistente ao glifosato se destaca e, tem sido cultivado em grande escala em vários países. No Brasil, a soja ocupa mais de 13,6 milhões de hectares, representando a maior área cultivada do país. Esta cultura é a maior consumidora de herbicida, estimando-se que praticamente 100 % da área plantada no Brasil seja tratada com glifosato (SANTOS, 2005).

Atualmente, o glifosato, dentre várias versões comerciais, é registrado em mais de 100 países. Contrariando pesquisas anteriores, este herbicida parece ser relativamente estável e persistente em meio aquático (MAÑAS, 2009).

O herbicida não-seletivo pós-emergente glifosato (N-(fosfometil)glicina) é o pesticida mais utilizado no mundo. Ele é utilizado para controle de ervas-daninhas, por exemplo: na agricultura, em áreas de reflorestamento, áreas urbanas e até mesmo na aquicultura. O glifosato é normalmente formulado como sal de isopropilamina e no caso da formulação mais comum, Roundup®, combinado com o surfactante polioxietileno. Devido ao cultivo de culturas geneticamente modificadas para serem resistentes ao glifosato, seu uso tem-se intensificado durante os últimos anos, aumentando-se os riscos em relação ao impacto ambiental deste herbicida (CONTARDO-JARA *et al*, 2009).

George (2010) observou no Roundup® propriedade promotora de tumor em contato crônico (32 semanas) com a pele de camundongo porém, necessitou a utilização de um iniciador (DMBA), os resultados do ensaio de carcinogênese mostrou-se que a aplicação tópica de glifosato foi capaz de promover o crescimento celular iniciadas com DMBA. No entanto o glifosato não obteve sucesso em provocar a tumorigenese quando testado para iniciação e carcinogênese completa em pele de camundongo.

Os ambientes aquáticos estão sendo continuamente contaminados com produtos químicos tóxicos advindos de atividades industriais, agrícolas e doméstica. Becker (2009) relatou que cerca de 20% dos pesticidas utilizados de forma profilática para plantações, podem ser drenados para rios e outros e outros reservatórios de água. Esta contaminação aquática pode ocorrer em/ao redor de áreas agrícolas e pode afetar negativamente a fauna aquática.

A presença de herbicidas na água é conseqüente ao controle de plantas invasoras em ecossistemas terrestres e aquáticos (ANTON *et al.*, 1994, HERRCHEN *et al.*, 1993) e seu efeito depende da profundidade da reserva, fluxo de água, densidade e composição do peixes (GOLDSBOROUGH e BECK, 1989), além de dureza da água, pH e temperatura (MITCHEL *et al.*, 1987).

O glifosato é considerado como tendo baixo potencial de contaminação de corpos d'água devido a sua alta tendência de adsorção no solo e a sua rápida degradação por microorganismos. No entanto, foi possível identificar glifosato e seu

produto de degradação, AMPA (*amino-methyl-phosphonic acid*) até um metro de profundidade em condições laboratoriais, sugerindo risco potencial para ambientes aquáticos. Devido a alta solubilidade do glifosato em água ( $10\text{g L}^{-1}$ ) e sua crescente ocorrência em ambiente aquático, o herbicida e sua formulação possuem importância significativa na ecotoxicologia aquática (CONTARDO-JARA *et al.*, 2009).

Revisões sobre a segurança do glifosato e do RoundUp® foram realizadas por várias agências reguladoras e foi concluído que não há nenhuma indicação de que se deva existir alguma preocupação sobre saúde humana. Apesar dessas informações e do uso extensivo deste herbicida, não há nenhuma definição objetiva sobre sua capacidade genotóxica, pois a literatura apresenta resultados controversos. (KOLPIN *et al.*, 2006).

A toxicidade aguda do glifosato tem sido considerada baixa. De acordo com o fabricante do RoundUp®, Monsanto Ltda. o  $LD_{50}$  é de 5600 mg/kg. No entanto, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009 (2004)) é de 4230 mg/kg. Quando o glifosato é administrado intraperitonealmente em ratos, observa-se a diminuição de atividade de algumas enzimas, porém não é específico em animais (SANTOS, 2005).

De acordo com AMARANTE Jr. *et al.*, 2002, a meia-vida do produto no solo pode ultrapassar 40 dias, no entanto improvável de ser lixiviado. (RICHARDSON e GANGOLLI, 1994).

O Glifosato inibe a síntese de enzimas responsáveis pela produção de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). A falta da síntese destes aminoácidos pode ser a razão da ação tóxica deste herbicida em microorganismos e animais.

Além do glifosato, o RoundUp® apresenta na composição os surfactantes, uma classe especial de adjuvantes, que podem aumentar os efeitos do herbicida, por diminuir ou remover a camada de cera foliar (KISSMANN, 1997). Através desta remoção de cera, diminui-se a tensão superficial, a penetração é facilitada e o herbicida atinge o sistema da planta. (MALKONES, 2000).

Sugere-se que o surfactante polioxietileno amina - POEA interaja com a membrana plasmática e aumenta o potencial de permeabilidade do glifosato. Efeitos adversos do glifosato são conhecidos como: alteração da atividade da acetilcolinesterase do perfil endócrino de peixe (GLUSEZAK *et al*, 2006, SOSO *et al*, 2007), aumenta o estresse oxidativo em girinos (COSTA *et al*, 2008) ou mudanças na atividade de enzimas citosólicas em ratas gestantes (DARVICH *et al*, 2001).

Estudos investigaram efeitos de formulações de glifosato em larvas de anfíbios e os resultados indicaram que o surfactante, mais que o ingrediente ativo, foi o responsável pela mortalidade. Surfactantes não iônicos, como o POEA, demonstram seu efeito negativo principalmente por danificar as superfícies respiratórias de animais aquáticos (DINEHART, 2009).

## **2.5. Associação de micotoxinas, MC e Glifosato**

Em ratos iniciados com AFB<sub>1</sub>, a exposição com nivalenol e fumonisinas aumentaram a expressão de glutathione S-transferase placentar (GST-P), sugerindo que a co-exposição de um iniciador potente com promotores fúngicos poderiam aumentar a incidência de câncer hepático primário (UENO *et al.*, 1993).

A inibição de proteínas fosfatases em ratos evidenciaram atividade promotora de tumores de MC-LR (NISHIWAKI-MATSUSHIMA, 1992). A MC-LR aumentou sinergicamente o desenvolvimento de focos positivos de GST-P em ratos iniciados com AFB<sub>1</sub>, indicando capacidade de induzir hepatocarcinogenicidade modulada por AFB<sub>1</sub> (SEKIJIMA *et al.*, 1999).

Essa interação mostrou causar danos no material genético em peixes jovens, tilápia do Nilo mostrou ser susceptível a essa interação a nível celular. A genotoxicidade induzida por exposição subcrônica à AFB<sub>1</sub>, *M. aeruginosa* e Roundup® em tilápia foi demonstrada pelos testes do micronúcleo e cometa conduzidos em sangue, não sendo observada diferença estatística nos tratamentos que utilizaram associação como em Roundup+*M. aeruginosa* 262, AFB<sub>1</sub>+Roundup+*M. aeruginosa* 262 e AFB<sub>1</sub>+Roundup+*M. aeruginosa* 262/47, em

relação aos tratamentos com cada contaminante isolado (FRANCABANDIERA, 2007).

### 3. JUSTIFICATIVA

A demanda crescente dos produtos de pescado deve-se associar à aplicação positiva de pesquisa e técnicas capazes de assegurar a qualidade e quantidade de alimento ao consumidor humano. Considerando que a AF seja um potente iniciador de câncer hepático, aliado ao efeito promotor de câncer de microcistinas e, que doses crescentes de herbicidas a base de glifosato vem sendo aplicado no campo, causando provável lixiviação na água, a co-ocorrência representaria um risco potencial na sobrevivência e desenvolvimento de peixe, na qualidade dos pescados e saúde humana. Os estudos atuais sobre teratogênese em peixe são desenvolvidos até a fase larval, não havendo dados perante exposição a xenobióticos durante as fases seguintes assim como pós-desenvolvimento completo (alevinos e peixes jovens). O trabalho visou contribuir, investigando o efeito da co-contaminação ambiental na reprodução, taxa de mortalidade em peixe recém-fecundado, teratogênese, as possíveis reversões, genotoxicidade, que poderiam causar impacto nas pisciculturas, acarretando prejuízo econômico na produção de alevinos, ou danos ecológicos diminuindo a população nativa.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Investigar o efeito da co-ocorrência de aflatoxina B<sub>1</sub> (micotoxina), *Microcystis* sp. produtora de microcistinas (cianotoxinas) e herbicida comercial Roundup® (princípio ativo glifosato) em ovo e respectivo desenvolvimento larval empregando tilápia (*Oreochromis niloticus*).

### 4.2. Objetivos específicos

- Expor os ovos de tilápia aos contaminantes, iniciada com 5ng/mL de AFB<sub>1</sub> por 1 hora em placa de Petri; seguida de exposição isolada e simultânea a Roundup® (glifosato) e microcistina (extrato celular do cultivo de *Microcystis* sp. TAC 95);
- Investigar alteração macroscópica *in vivo* dos ovos de tilápia, assim como a eclodibilidade de ovos fecundados mantidos em placas de cultura celular;
- Monitorar a viabilidade e efeito teratogênico em larvas até absorção de saco vitelínico (placas de cultura celular);
- Prosseguir a observação do desenvolvimento da fase de alevino até aproximadamente 5,0 g (aquário) para análise de efeito genotóxico por teste de cometa;
- Controlar os parâmetros físico-químicos da água do bioensaio (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e alcalinidade), bem como a contaminação da ração empregada para alimentação de matrizes e alevinos quanto à presença de aflatoxinas e fumonisinas;
- Quantificar concentração de microcistinas aplicadas no bioensaio empregando ic-ELISA e aflatoxinas e fumonisinas por cromatografia de camada delgada (CCD) e/ou CLAE-Fluorescência.
- Avaliar possíveis efeitos sobre desenvolvimento das larvas por meio de análises histopatológicas.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Local e Instalação Experimental**

A Estação de Piscicultura (EPUEL) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), localizada na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina ovos fecundados e rastreados perante alimentação de matrizes. O bioensaio, assim como as análises laboratoriais foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA), Laboratório de Saneamento do Centro de Tecnologia em Urbanismo (CTU), Laboratório de Toxicologia de Desenvolvimento, Laboratório de Genotoxicologia e Laboratório de Ecofisiologia Animal (Lefa - CCB), Laboratório de Biotecnologia do Centro de Ciências Exatas (CCE) da UEL-PR. O período de realização dos bioensaios foi de setembro/2008 a julho/2009

### **5.2. Animal experimental**

O alojamento das matrizes de tilápia (*O. niloticus*), assim como a fecundação foram realizadas na Estação de Piscicultura (EPUEL), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina – UEL.

Os ovos fecundados foram previamente homogeneizados para minimizar a diferença entre genótipos e, 24 (em triplicata, resultando um total de 72) ovos foram aleatoriamente coletados e distribuídos por tratamento. A unidade de tratamento consistiu de um ovo alocado no poço (microplaca para cultivo celular com 24 poços de 2,5 mL, Corning Incorporated 3524, NY, EUA). As microplacas foram mantidas à 25° C durante 12 dias (BOD Tecnal, modelo TE-391), com reposição diária de meio, para impedir o acúmulo de metabólitos tóxicos, principalmente de CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub> (BOURRACHOT, 2008).

O meio básico para a manutenção de ovos foi composto por água reconstituída de acordo com ABNT-NBR 15088,2004 para ensaio toxicológico em peixes (tabela 1). Os contaminantes foram acrescentados de acordo com o protocolo de tratamento.

Tabela 1: Água reconstituída ISO (ABNT-NBR 15088,2004).

Constituintes	Concentração (mg)	Volume de solução estoque para 1L de meio água reconstituída (mL)
<b>Solução estoque A</b>		<b>20</b>
CaSO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1500	
<b>Solução estoque B</b>		<b>10</b>
KCl	200	
NaHCO <sub>3</sub>	4.800	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6.100	
<b>Completar para 1 L com água ultra-pura</b>		

Após a fase larval, os peixes mantidos em aquário foram alimentados duas vezes ao dia em quantidade suficiente para ser consumida em até 5 min, com ração comercial para peixes ornamentais (Alcon Colours - Composição em anexo 1).

**Sacrifício humanitário:** Após o ensaio, os peixes foram sacrificados por insensibilização por imersão em água com gelo e benzocaína (5 mg / L, Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2002; aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina-PR).

### **5.3. Aflatoxina B<sub>1</sub>**

Aflatoxina (AFB<sub>1</sub>, 1mg, Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) foi dissolvida em metanol e dividida em 100 µg cada frasco. A concentração de AFB<sub>1</sub> em metanol foi averiguada a 360 nm (espectrofotômetro UV-VIS Cintra 20, GMB, Melbourne, Australia). Para bioensaio, no momento de uso, 1 µg de AFB<sub>1</sub> foi redissolvida em 0,5 mL de metanol sob sonicação por 15 min (HENDRIKS, 1982) e transferida para frasco âmbar para volume final de 200 mL (concentração final de 5 ng / mL de AFB<sub>1</sub> em água reconstituída). Para o ensaio de exposição, os ovos de peixe foram imersos por 1 hora em 20 mL de água reconstituída contendo 5 ng / mL de AFB<sub>1</sub> em placas de Petri.

### **5.4. Herbicida comercial a base de glifosato**

O herbicida comercial à base de glifosato utilizado foi o Roundup® Original (Monsanto, St, Louis, EUA) sob forma de solução para imersão contendo 5 µL de Roundup® (1,8 mg de glifosato) por litro de água reconstituída, de acordo com ensaios prévios realizados por Hashimoto (2007) e Francabandiera (2007). O Roundup Original, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob n.º 00898793, é um herbicida sistêmico de ação total para aplicação em pós-emergência, derivado de glicina e concentrado solúvel; é composto de sal de isopropilamina de N-(fosfometil) glicina (480g/L), equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (*GLYPHOSATE*) (360 g/L) e ingredientes inertes (684 g/L).

### **5.5.Cultivo de *Microcystis* sp. TAC95**

#### **5.5.1.Cultivo de *Microcystis* sp. TAC95**

A cepa toxigênica de *Microcystis* sp. TAC95 utilizada no bioensaio foi fornecida pelo Prof. Dr. Ken-ichi Harada do Laboratório de Ciências Ambientais,

Faculty of Pharmacy, University of Meijo, Nagoya – Aichi, Japão. A cepa caracteriza-se pela produção predominante de microcistina-LR (MC-LR) em elevadas concentrações.

**Tabela 2:** Composição química do meio ASM1 e respectivo preparo (GORHAN *et al.*, 1964).

Constituintes	Concentração (g/100 mL)	Volume de solução estoque para 1L de meio ASM1 (mL)
<b>Solução estoque A</b>		<b>20</b>
NaNO <sub>3</sub>	0,85	
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,205	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,245	
CaCl.2H <sub>2</sub> O	0,145	
<b>Solução estoque B</b>		<b>2</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ou	0,87	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	1,14	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O ou	1,78	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,33	
<b>Solução estoque C</b>		<b>0,1</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,48	
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,39	
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,08	
ZnCl <sub>2</sub>	0,335	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,019	
CuCl ou	0,0014	
CuCl.2H <sub>2</sub> O	0,0013	
<b>Solução estoque D</b>		<b>0,4</b>
Na <sub>2</sub> EDTA	1,86	
<b>Ajustar pH para 8,0</b>		

Para obter o inóculo, 2,0 mL do cultivo de 10 mL em ASM1 (tabela 2, GORHAN *et al.*, 1964) em tubo foi transferido para 20 mL do mesmo meio em erlenmeyer de 25 mL e incubado a 25° C por 15 dias em fotoperíodo de 12 horas sob intensidade luminosa de 470 Lux (lâmpada branca fluorescente acoplado na incubadora BOD Tecnal, modelo TE-391, LABSAN/CTU/UEL). A seguir, 30 mL deste cultivo foi transferido para 270 mL de meio ASM1 e mantido sob mesmas condições.

Para a obtenção do extrato celular, a cultura de 300 mL de *Microcystis* sp. TAC95 foi utilizado como inóculo em 2700 mL de meio ASM1 em erlenmeyer de 3 L (obtenção total de 12 L), incubado a 25° C em fotoperíodo de 12 horas sob intensidade luminosa de 470 Lux (lâmpada branca fluorescente acoplado na incubadora BOD Tecnal, modelo TE-391 e aeração contínua). Após tempo de incubação determinado no item 5.5.2, a cultura foi centrifugada a 3000xg por 10 min e, o pellet obtido foi congelado a -20° C e liofilizado (Liotop L101 da Liobras, São Carlos, SP, Brasil). O material liofilizado foi mantido a -20° até a preparação do extrato de *Microcystis* sp. TAC95, procedendo a análise de microcistina anteriormente à contaminação de ovos.

### **5.5.2. Curva de Crescimento de *Microcystis* sp. TAC95**

O cultivo em erlenmeyer de 3 litros sob as mesmas condições acima descritas para a produção do extrato foi monitorado por 22 dias a 25° C com agitação manual diária até o início da senescência (amarelamento do cultivo). Coletas diárias de amostra (10 mL para análise de clorofila, 1,0 mL cada para contagem celular e quantificação de microcistina total) foram realizadas durante este período. A microcistina extracelular foi determinada utilizou-se uma alíquota da amostra filtrada para determinação de clorofila-a.

A quantificação de microcistina em microplaca foi realizada empregando *kits* de imunoensaio ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), seguindo a metodologia preconizada pelo fabricante (*Beacon Analytical Systems Inc.*, Portland, Maine, EUA).

A contagem celular foi realizada por microscopia ótica em câmara de Neubauer (microscópio BA 210, Motic, British Columbia, Canadá). A clorofila foi quantificada por espectrofotometria (Espectrofotômetro SMZ-1B, Nikon, Tokyo, Japão), conforme metodologia preconizada por *American Public Health Association* (APHA – AWWA – WEF, 2005).

### **5.5.3. Preparo do extrato celular de *Microcystis* sp. TAC95**

O extrato concentrado de *Microcystis* sp. TAC95 toxigênica foi ressuspendido e congelado/descongelado por 3 (três) vezes consecutivas, a fim de promover lise celular e liberação de microcistinas.

A quantificação de microcistinas totais foi realizada utilizando-se o *kit* comercial para teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) de *Beacon Analytical Systems Inc.* (Laboratório de Microbiologia/ DCTA/ UEL) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector *Photodiode Array* (CLAE-PDA). A exposição destas toxinas em ovos de peixe foi realizada através de imersão em solução aquosa contendo 5 µg / L.

### **5.6. Delineamento Experimental**

O período para realização de ensaio *in vivo* com ovos de tilápia, iniciado em setembro de 2008 (padronização de ensaio com ovos, eclosão e definição de número de unidade por tratamento), seguida de delineamento final, prosseguiu até julho de 2009.

Os tratamentos delineados no bioensaio foram preconizados, simulando-se uma provável rota de multi-contaminação ambiental no decorrer da cadeia produtiva de peixe. Assim, a experiência foi iniciada, expondo-se os ovos de tilápia ao contaminante inicial, provavelmente advinda de ração ingerida pela matriz (5 ng / mL de AFB<sub>1</sub> por 1 hora em placa de Petri), seguida de exposição isolada e simultânea a Roundup® (glifosato) e microcistina (extrato celular concentrado e liofilizado de

*Microcystis* sp. TAC 95, item 5.5.1) em microplaca para cultura de célula. No ensaio de imersão em mistura de solução de glifosato e MC, cada unidade de tratamento constituiu-se de 1 ovo mantido num poço em placa de cultura com água reconstituída e solução teste, com renovação do meio a cada 24 horas.

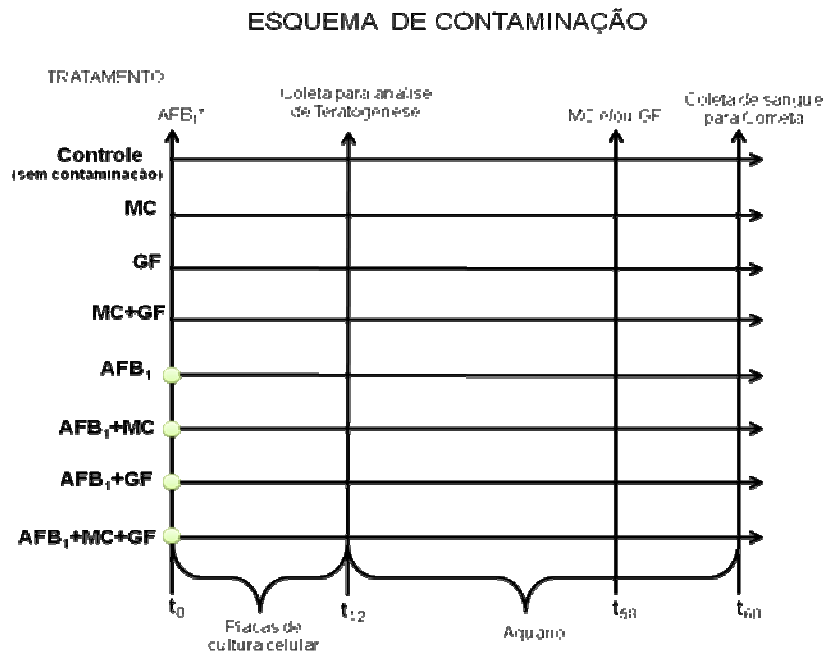
Oito tratamentos foram formulados seguindo-se o protocolo descrito na figura 1, sendo um destes tratamentos o controle negativo (sem contaminação). Cada tratamento foi realizado com 48 unidades experimentais sem contato entre si, mas sob as mesmas condições de ensaio e, sob concentração de contaminantes aplicada de acordo com os estudos anteriores preconizados por Kamogae (2007), Hashimoto (2007) e Francabandiera (2007), para toxicidade crônica e subcrônica em tilápia.

Após exposição a 5ng/mL de AFB<sub>1</sub> por 1 hora em placa de Petri, os ovos foram transferido para poço da placa de cultivo celular para o ensaio de exposição isolada e simultânea a glifosato e MC (controle, MC, GF, MC+GF, AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>+MC, AFB<sub>1</sub>+GF e AFB<sub>1</sub>+MC+GF). A análise iniciou-se investigando a alteração macroscópica *in vivo* dos ovos de tilápia, assim como a eclodibilidade. O monitoramento diário da viabilidade e efeito teratogênico em larvas até absorção de saco vitelínico teve a duração de 12 dias, quando a maioria das larvas já estava apta à alimentação exógena, portanto aumentando também o contato com outros contaminantes ambientais.

Em seguida as larvas foram transferidas para o aquário de 180 L contendo 100 L de água reconstituída (nesta etapa, água ultra-pura foi substituída pela água destilada e deionizada) com troca parcial de 20 % do volume a cada 5 dias, sendo que cada tratamento foi mantido em hapas de 10x30x40 cm, largura x comprimento x altura (sombrite 70 %).

Prosseguiu-se a manutenção diária do desenvolvimento da fase de alevino até atingir aproximadamente 5,0 g (correspondente a em torno de 2 meses de criação). A seguir, os peixes foram expostos novamente a MC e GF para análise de efeito genotóxico por teste de cometa.

O controle dos parâmetros físico-químicos da água do aquário (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e alcalinidade) foi realizado semanal, enquanto a qualidade da ração quanto à presença de aflatoxinas e fumonisinas foi analisada por lote.



AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>

MC: microcistina em extrato celular de *Microcystis sp.* TAC 95 contendo microcistinas

GF:Roundup® (princípio ativo: glifosato)

\* : 1 h em AFB<sub>1</sub> (5 ng / mL), seguido de exposição a MC (5 ng / mL) e/ ou GF (5uL / mL)

**Figura 1:** Delineamento experimental com esquema de exposição dos ovos de tilápia a contaminantes, biometria e coleta de amostras.

## 5.7. Análise de Perfil Reprodutivo e Citogenética

### 5.7.1. Análise de fecundação

Ovos foram observados através de microscópio estereoscópico para a diferenciação de ovos e óvulos não fecundados. Óvulos não fecundados se diferem dos fecundados por se apresentarem esbranquiçados e opacos, enquanto os ovos viáveis são amarelados e brilhantes. Foram incluídos no experimento somente os ovos viáveis e fecundados.

### 5.7.2. Análise da taxa de eclosão

Ovos foram observados através de um microscópio estereoscópico para a contagem de ovos eclodidos, sendo considerados como “eclodido” as larvas já eclodidas e as larvas vivas dentro dos ovos, e considerado com “não eclodido” os ovos mortos.

### 5.7.3. Análises citogenéticas

Análises de genotoxicidade foram realizadas no laboratório de Mutagênese do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, incluindo o Teste de Cometa segundo Singh *et al.* (1998) com modificações de Speit & Hartmann (1999).

Lâminas de microscópio cobertas com 1,5 % de agarose a 60° C foram secas à temperatura ambiente por 24 h e armazenadas à 4° C. Volume de 0,2 ml de sangue por peixe foi coletado por punção cardíaca (OKAMURA, 2007) e diluído (1:100 v/v) em solução salina (17 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). A seguir, 15 µL de suspensão celular foi homogeneizado com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão – LMP a 0,5 % à 37° C. A suspensão foi espalhada homogeneamente na superfície de lâmina previamente preparada com agarose, coberta com lamínula e mantida à 4° C por 20 min para solidificação.

A lamínula foi retirada e as lâminas foram imersas em solução de lise a 4° C por 1h, sempre protegido contra luz (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque – solução estoque: 146,1 g de NaCl 2,5 M, 37,2 g de EDTA 100 mM, 1,2 g de Tris 10 mM, 8,0 g de NaOH sólido, 10 g de lauril sarcosinato de sódio para 1 litro). As lâminas foram mantidas na cuba de eletroforese em tampão de eletroforese alcalino (NaOH 300 mM, EDTA 200 mM, pH > 13.0) por 20 min para desenovelar o DNA, aplicando-se a seguir, uma corrente de 25 V (1.0 V/cm; 300 mA) por 20 min. Após lavagem com tampão de neutralização (Tris 0,4 M – HCl, pH 7,5), as lâminas foram fixadas em etanol 100 %, secas à temperatura ambiente e mantidas a 4° C até análise citológica. Lâminas foram coradas com GelRed (Biotium, Hayward, Canadá) e analisadas por microscopia de fluorescência a 1000 x acoplado com um filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de

590 nm (Nikon EX 420-490, BA 520, Melville, NY, USA). Lâminas foram codificadas e analisadas por ensaio cego e a migração do DNA foi determinada em 100 células por animal. Os danos ao DNA foram classificados em quatro classes de acordo com o comprimento da cauda do cometa, sendo 0, sem danos; 1, danos mínimos; 2, danos medianos; 3, danos máximos, de acordo com Kobayashi *et al.*, 1995.

O escore de danos no DNA foi calculado pelo número de nucleóides observados em cada classe multiplicados pela classe de dano (0, 1, 2 ou 3) e os valores foram expressados como médias do escore de dano, sendo 0 a ausência de dano e 300 indicando o maior escore de danos.

#### 5.7.4. Análises teratogênicas

As larvas foram analisadas perante malformações ou qualquer outro defeito no decorrer do desenvolvimento embrionário. As malformações macroscópicas em animais vivos foram quantificadas estabelecendo-se sistema de escore, conforme gravidade de alteração, sendo dado pontos baixos para alterações leves e reversíveis e, pontos altos para alterações graves e definitivas (tabela 3).

**Tabela 3:** Escore para malformações e respectivas definições.

ESCORE PARA MALFORMAÇÕES	
Escore	Alteração*
0	Nenhuma, animal normal
1	Cauda desviada, saco vitelínico desuniforme
2	Coluna vertebral desviada, causando movimentos natatórios erráticos
3	Eclosão tardia, megalocardia

\* Observadas através de microscópio estereoscópico (3,5 x).

Após a classificação da alteração, procedeu-se a somatória do total atribuído para cada tratamento.

Nos animais já fixados, os parâmetros a serem analisados foram baseados em comprimento total, proporcionalidade cabeça/mandíbula, *stumped body*, nanismo e formação óssea. Para a análise da formação óssea por diafanização, os animais foram fixados em formol a 10 % por 3 dias, lavados em água destilada por 3 dias, sendo a água substituída 8 vezes por dia e mantidos em solução de *Alcian Blue* (10 mg Alcian Blue, 80 ml álcool etílico e 20 mL ácido acético glacial) por 48 h (tubo falcon). Os animais foram transferidos para álcool etílico 95 %, procedendo-se trocas constantes por 3 horas até a transparência da solução. Os peixes foram reidratados imergindo em concentração decrescente de álcool etílico (75, 40, 15 e 0 %, sendo 3 horas em cada etapa). Após hidratação, os animais foram submetidos à digestão enzimática (70 mL água destilada, 30 mL de borato de sódio aquoso saturado e 1 g de pancreatina) por 5 dias, até a perda de cor azulada no músculo e visualização de ossos. Os peixes foram transferidos para solução de alizarina (corante adicionado em solução aquosa de KOH 0,5 % até atingir cor púrpura) por 24 h, para coloração de material com cálcio. Para armazenamento, os animais foram transferidos diariamente numa série de soluções de KOH + Glicerina (3:1, 1:1, 1:3, glicerina pura) e armazenados a 4° C até a análise. A musculatura torna clara e transparente, a cartilagem azul (*Alcian Blue* é específico para mucopolissacarídeos) e os ossos vermelhos.

### **5.8. Biometria e captura de imagem**

As medidas referentes ao comprimento padrão (distância cabeça – início de cauda), comprimento da cabeça e da mandíbula das larvas foram obtidos em microscópio estereoscópico (Nikon, Tokyo, Japão) com câmera acoplada (Motic 2300, Richmond, Canadá) e os resultados analisados empregando programa Motic Image Plus 2.0 (Motic, Richmond, Canadá).

O corte mediano longitudinal da larva fixada em lâmina foi analisada procedendo captura de imagem (microscópio DM2500, Leica, Solms, Alemanha acoplado a câmera DFC 280, Leica, Solms, Alemanha). A área de fígado foi

mensurada utilizando os programas IMSO e Leica Qwin, ambos desenvolvidos pela Leica (Solms, Alemanha).

### 5.9. Histologia

As larvas foram fixadas em Bouin por 24 h e mantidas em álcool até o processamento. As amostras foram desidratadas seqüencialmente por imersão em solução alcoólica de concentração crescente, diafanizadas em xilol e inclusas em parafina histológica a 60 °C e emblocadas em parafina à temperatura ambiente.

Após emblocadas, as larvas foram cortadas longitudinalmente por micrótomo em secções de 5-7 µm de espessura, aderidas à lâmina de microscopia e coradas pelo método de hematoxilina-eosina ou PAS (ácido periódico-*Schiff*).

Cinco animais de cada tratamento foram processados, obtendo-se aproximadamente 5 lâminas de cada animal, sendo que cada lâmina conteve 5 a 6 cortes alternados, para que a primeira lâmina seja mais similar possível com a seguinte. Três lâminas foram coradas com H.E. e duas com PAS, sendo que para as análises considerou-se as alterações apresentadas na tabela 4 (MELETTI, 2003). Os dois índices utilizados para a quantificação de alterações consistiram de VMA (valor médio de avaliação) proposto por SCHWAIGER *et al.* (1997) e índice de alterações histológicas (IAH) preconizado por POLEKSIC & MITROVIC-TUTUNDZIC (1994).

O VMA foi calculado a partir de uma análise semi-quantitativa baseado em escala de severidade e ocorrência de alterações abaixo descritas:

Grau 1 = sem alterações patológicas;

Grau 2 = alterações pontuais brandas a moderadas;

Grau 3= alterações patológicas severas e amplamente distribuídas.

O IAH preconizado por POLEKSIC & MITROVIC-TUTUNDZIC (1994) e modificado por MELETTI (2003) avalia alterações branquiais, mas no trabalho foi

empregado para avaliar as alterações hepáticas e renais, devido a insuficiência de material branquial em animais ainda em desenvolvimento. O IAH classifica a severidade de lesões em:

Estágio I: Cinética de evolução  $10^0$  - alterações leves, passíveis de recuperação caso haja melhoria de condições ambientais. “Sob condições ambientais inalteradas tais lesões devem persistir e, no caso de exposições a longo prazo, as alterações provavelmente progredirão para o segundo estágio”.

Estágio II: Cinética de evolução  $10^1$  - alterações mais severas que do estágio anterior, podendo comprometer a função do tecido, são reparáveis caso haja melhoria do ambiente, porém em situação crônica pode conduzir ao estágio seguinte.

Estágio III: A cinética de evolução  $10^2$  - alterações severas sem possibilidade de regeneração da estrutura. “Mesmo com a melhoria da qualidade da água, ou com o fim da exposição aos agentes tóxicos, as alterações desse estágio levarão, mais cedo ou mais tarde, ao dano das funções branquiais (no caso do trabalho em específico) vitais e até a morte”.

O IAH foi calculado empregando a seguinte equação:

$$IAH = \frac{\sum_{i=1}^{na} a_i + 10 \sum_{i=1}^{nb} b_i + 10^2 \sum_{i=1}^{nc} c_i}{N}$$

Sendo: a: primeiro estágio de alterações.

b: segundo estágio de alterações.

c: terceiro estágio de alterações.

na: número total de alterações consideradas do estágio I.

nb: número total de alterações consideradas do estágio II.

nc: número total de alterações consideradas do estágio III.

N: número de peixes analisados por tratamento.

Tabela 4: Alterações histológicas observadas em larvas de tilápia do Nilo

Alterações histológicas*	Estágio
<b>Alterações no fígado</b>	
Perda ou atipia do contorno de hepatócito	I
Perda ou atipia do contorno de núcleo de hepatócito	I
Aumento de volume celular	I
Aumento de volume nuclear	I
Diminuição da frequência relativa de núcleos	I
Estagnação biliar	I
Hiperemia	II
Ruptura de vasos	II
Vacuolização nuclear	II
Degeneração nuclear	II
Atrofia nuclear	II
Rompimento celular	II
Necrose	III
<b>Alterações do rim</b>	
Perda do contorno ou contorno atípico das céls do tecido linfóide	I
Degeneração hialina leve	I
Hipertrofia das células tubulares	I
Presença de material pas-positivo nas céls tubulares	I
Degeneração hialina severa	II
Necrose	III

\* - baseado essencialmente em Meletti (2003).

**Tabela 5:** apresenta os valores de IAH estabelecidos por POLEKSIC & MITROVIC-TUTUNDZIC (1994) adaptado por Meletti (2003).

Valores de IAH	Efeitos
0-10	órgão funcionalmente normal
11-20	órgão com alterações de leves a moderadas
21-50	órgão com alterações de moderadas a graves
>100	órgão com danos irreversíveis

## **5.10. Parâmetros Físico-Químicos da Água**

A água reconstituída foi preparada de acordo com as características estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (ABNT, 2004). As análises em água consistiram de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e alcalinidade, seguindo-se as metodologias descritas nas normas do APHA/ AWWA/ WEF (2005).

## **5.11. Controle de Micotoxinas na Ração Experimental**

A ração empregada para alimentação das dos animais experimentais foi analisada perante contaminação por fumonisina e aflatoxinas (CLAE e CIA+CLAE).

## **5.12. Metodologia Analítica**

### **5.12.1. Determinação de Aflatoxinas**

A ração fornecida aos alevinos foi analisada perante contaminação por aflatoxina B<sub>1</sub>, procedendo a limpeza através da coluna de imunoafinidade - CIA Aflatest®, seguida de quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE preconizado por Blandino, Reyneri e Vanara (2008). Em 10 g de amostra macerada adicionou-se 1 g de NaCl, 20 mL de metanol:água (80:20 v/v) e agitou-se vigorosamente por 1 min. Após filtração, 10 mL de extrato coletado em duplicata foi diluído na proporção 1:5 (10 mL de extrato + 40 mL de água purificada). O extrato foi novamente filtrado (membrana de microfibras Whatman GF/C) e submetido lentamente em CIA comercial (1 a 2 gotas / seg). A coluna foi lavada com 10 mL de água ultra-pura e a toxina eluída com 1 mL de metanol grau CLAE e seco em fluxo de nitrogênio a 40°C. A película seca foi derivatizada com 100 µL de ácido trifluoroacético – TFA segundo Miyamoto, Hamada e Kawamura (2008). A suspensão foi agitada por 30 seg, sonicada por 5 min e mantida a temperatura ambiente por 15 min sob ausência de luz. Após adição de 900 µL de metanol:água (55 : 45, v / v), a suspensão foi agitada por 15 seg e, 20 µL injetada em CLAE,

sistema isocrático de fase reversa, constituído de uma bomba Shimadzu LC-10AT, detector de fluorescência Shimadzu RF-10A XL e coluna Luna C-18 (250 x 4,6 mm, Phenomenex). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 360 nm e 435 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol:água (55 : 45, v / v), sendo eluído sob fluxo de 1 mL / min a 25° C.

### **5.12.2.Determinação de Fumonisina**

Dez gramas de ração triturada (50 mesh) foi adicionada com 30 mL de metanol:água (3:1, v / v) e homogeneizada a 180 rpm por 1 hora a 10° C (incubadora refrigerada, Marconi® Brasil), seguido de filtração (Whatman n° IV). O filtrado foi limpo empregando mini-coluna de troca aniônica Sep-Pak accel plus QMA (Waters Co. Milford, USA), previamente acondicionada com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de metanol:água (3:1). Após aplicação de 1 mL de amostra, a coluna foi lavada com 6 mL metanol:água (3:1), seguida de 3 mL de metanol e a fumonisina eluída com 10 mL da solução de ácido acético a 0,5 % em metanol. O eluato foi seco sob fluxo de nitrogênio gasoso a 40° C e o resíduo solubilizado em acetonitrila:água (1:1, v / v), derivatizado com 200 µL de o-ftaldialdeído (OPA) (40mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio a 0,1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol). A seguir o material foi injetado dentro de 1 min e analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) sistema isocrático de fase reversa. Cromatógrafo constituído de uma bomba Shimadzu LC-10AT, detector de fluorescência Shimadzu RF-10A XL e coluna Luna C-18 (250 x 4,6 mm, Phenomenex). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel constituiu-se de metanol: fosfato de sódio 0,1 M (80:20, v / v) pH 3,3 (ácido orto-fosfórico); ajustado para pata p fluxo de 1,0 mL / min. Os limites de detecção para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foram 50 ng / g e 80 ng / g, respectivamente.

### **5.12.3.Determinação de microcistina**

#### **5.12.3.1.c-ELISA**

Teste de ELISA competitivo (c-ELISA) foi realizado empregando *kit* comercial (Beacon Analytical Systems Inc., Saco, USA). microplaca de reação contém 96 poços, sensibilizado com anticorpo de cabra anti-coelho.

As amostras foram previamente filtradas em filtro tipo GF/C ou similar e em seguida, diluídas com água deionizada em proporções variadas,

Um volume de 50 µL de conjugado microcistina-enzima e sequencialmente de amostra por poço. O conjugado compete com as microcistinas da amostra pelos mesmos sítios de ligação de anticorpos. O substrato é adicionado e incubado por 30 min.

A curva padrão foi elaborada empregando os padrões fornecidos pelo fabricante na faixa entre 0 e 2,0 µg / L de MCs totais. e o tempo médio gasto no processo para análise após preparação das amostras foi da ordem de 90 min. O limite de detecção do método é de 0,16 µg / L (conforme o fabricante).

O Kit Beacon Microcistina - Placa não difere entre microcistina -LR (usado como calibrador do kit) e outras variantes de microcistina, porém detecta sua presença em vários graus. As reações cruzadas podem ocorrer por MC-RR em 87%, MC-YR em 48% e 31% para nodularina.

#### **5.12.3.2.Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massa**

O procedimento para extração e purificação de MCs foi baseado em Krishnamurthy *et. al* (1986), Environment Agency (1998), Lawton *et. al* (1994), Tsuji *et. al* (1994) e Harada *et. al* (1996). Uma alíquota de 100 mg do extrato celular liofilizado de *Microcystis* sp. TAC95 (item 5.5) foi adicionada de 15 mL de ácido acético a 5 % em água ultra-pura e agitada por 30 min (barra magnética, agitação rápida). O material foi centrifugado (1300 xg / 10 min) e o sobrenadante desprezado. O *pellet* obtido foi ressuspenso em ácido acético a 5 %; o processo foi repetido três

vezes e o extrato sobrenadante combinado. Este extrato foi filtrado (papel filtro Whatman GF/A Ø 55 mm) e submetido à coluna de limpeza C18 (Waters Sep-Pack Vac 6cc - C18-500 mg, Milford, USA) pré-condicionada com 5 mL de metanol e 5 mL de água ultra-pura. A seguir, a coluna foi lavada com 5 mL de água ultra-pura e 5 mL de metanol 20 % grau cromatográfico e a MC eluída com 5 mL de metanol 90 % seguida de 5 mL de metanol pa. em frascos de 5 mL (*vials*) e o extrato seco a 35°C (rotavapor).

O extrato seco foi ressuspenso em 10 mL de metanol e 5 µL aplicado em CLAE – PDA (Agilente 1100, Palo Alto, USA) passando por coluna de separação (TSK-Gel Super-ODS, 2 µm, 2,0 x 100 mm, Tosoh, Japão). A fase móvel constituiu-se de ácido fórmico a 0,1%, fluxo de 0,070 mL / min, bomba A e metanol com 0.1 % de ácido fórmico (na proporção de 40 % ), fluxo de 0,128 mL / min na bomba B, mantendo-se a pressão em 12.3 MPa, tendo a duração de 25 min cada corrida, com detector PDA em 238 nm e confirmação por MS (Finnigan LCQ Deca XP ligados pela interface ESI (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA). A fase móvel utilizada foi a mesma descrita a cima para a CLAE e o tempo de corrida foi de 30 min.

### **5.13. Análise Estatística**

Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey determinaram se há diferenças entre os resultados do teste de Cometa e também sobre os parâmetros zootécnicos (taxa de fecundação, eclosão, biometria e histologia) dos diferentes tratamentos. As análises foram realizadas considerando diferenças ao nível de 1 % de significância, e serão realizadas no programa Sisvar.

## **6.CAPÍTULO 1: Teratogênese em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) por co-exposição à *Microcystis* sp., aflatoxina B<sub>1</sub> e herbicida à base de glifosato.**

### **6.1.Introdução**

A demanda por produtos de pescado vem aumentando universalmente se fazendo necessária a implementação de práticas que assegurem a qualidade do produto final, sendo prioritárias as práticas adequadas de manejo aliado ao rigoroso controle de qualidade d'água, aspectos sanitários de matérias-primas, composição, processamento e comercialização de ração.

O manejo inadequado associado com a produção intensiva na piscicultura, pode levar à eutrofização de corpos d'água e ocorrência de floração de cianobactérias. Floração de espécies tóxicas de cianobactérias tem sido associada com a morte de peixes, principalmente em água doce, mas também em ambiente marinho. Microcistinas são heptapeptídeos produzidos por algas azuis, sendo a variação LR a mais comum e mais tóxica (FISCHER e DIETRICH, 2000). Em vários estudos, MC-LR tem demonstrado efeito inibidor de proteína fosfatase 1 e 2 A e atividade promotora de tumor em fígado de rato. MC-LR causa efeitos adversos em mamíferos, aves e peixes e é reconhecida por ser um potencial indutor de estresse ambiental, uma ameaça a saúde humana via água e cadeia alimentícia (DJEDIAT, 2010).

Com o advento da de organismos geneticamente modificados e culturas resistentes a herbicida no ano de 2009, o uso de pesticidas chegou a 3 bilhões de toneladas por ano (GEORGE, 2010). Glifosato (N-fosfometilglicina) é um herbicida pós-emergente e não seletivo, é o herbicida mais utilizado no mundo devido a sua baixa toxicidade a mamíferos, no entanto estudos têm descrito efeitos colaterais em animais, como disfunções reprodutivas (MALLAT E BARCELÓ, 1998). O glifosato é considerado como tendo baixo potencial de contaminação de corpos d'água devido a sua alta tendência de adsorção no solo e sua rápida degradação por microorganismos, no entanto, foi possível identificar glifosato e seu produto de degradação AMPA (*amino-methyl-phosphonic acid*) até 1 metro de profundidade em condições laboratoriais, sugerindo risco potencial para ambientes aquáticos (CONTARDO-JARA *et al.*, 2009).

Rações comerciais para peixes são formuladas a base de grãos e desde a cultura até o armazenamento da ração já pronta, os grãos estão sob constante risco de contaminação fúngica. Aflatoxinas são produzidas por fungos como o *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e são consideradas pela *Food and Drug Administration* - FDA como sendo contaminantes de alimentos e passíveis de serem evitados. AFB<sub>1</sub> é a mais prevalente e mais potente variante entre as aflatoxinas (GÜRBAY *et al.*, 2010). AFB<sub>1</sub> é a aflatoxina mais comum, é altamente mutagênica, tóxica, carcinogênica e teratogênica para humanos e animais. Contaminação de aflatoxina de alimentos e produtos alimentícios é responsável por perdas econômicas significativas – U\$100 milhões nos EUA em 2004. Em algumas partes da África, China e sudeste da Ásia, contaminações de aflatoxina são correlacionadas com incidência de câncer hepático (ALBERTS *et al.*, 2009)

No geral, os primeiros estágios do desenvolvimento animal são mais sensíveis a agentes tóxicos que os adultos (WESTERNHAGEN VON, 1988). Este estudo visa uma investigação sobre os efeitos teratogênicos causado por uma possível multi-contaminação ambiental nos primeiros estágios de vida da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*).

## **6.2. Material e métodos**

**6.2.1. Animal experimental:** o modelo animal para os ensaios consistiu de larvas de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), obtidas e mantidas conforme item 5.2.

**6.2.2. Aflatoxina B<sub>1</sub>:** Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA, diluída em metanol (item 5.3).

**6.2.3. Herbicida a base de glifosato:** herbicida comercial à base de glifosato utilizado foi o Roundup® Original (Monsanto, St. Louis, EUA) em solução aquosa para imersão dos animais (item 5.4).

**6.2.4. Extrato celular de *Microcystis* sp.:** a cepa TAC95 cultivada (item 5.5) foi centrifugada e o *pellet* celular foi liofilizado e diluído para o uso. A microcistina foi analisada inicialmente por c-ELISA (item 5.10.3.1) e caracterizada por LC-MS/MS (item 5.10.3.2).

**6.2.5. Delineamento experimental:** definido no item 5.6.

**6.2.6. Análise de eclosão:** ovos foram observados através de um microscópio estereoscópico (item 5.7.2).

**6.2.7. Análise teratogênica:** um sistema de escore foi desenvolvido para avaliar as malformações observadas em larvas. Em paralelo, também foram avaliadas malformações ósseas (item 5.7.4).

**6.2.8. Biometria:** o comprimento das larvas foi medido empregando microscópio estereoscópico acoplado a câmera e programa Motic Image Plus 2.0 (item 5.8).

**6.2.9. Sobrevivência:** A taxa de sobrevivência foi calculada em porcentagem de animais vivos, com ou sem alteração macroscópica, até o 12º dia do experimento.

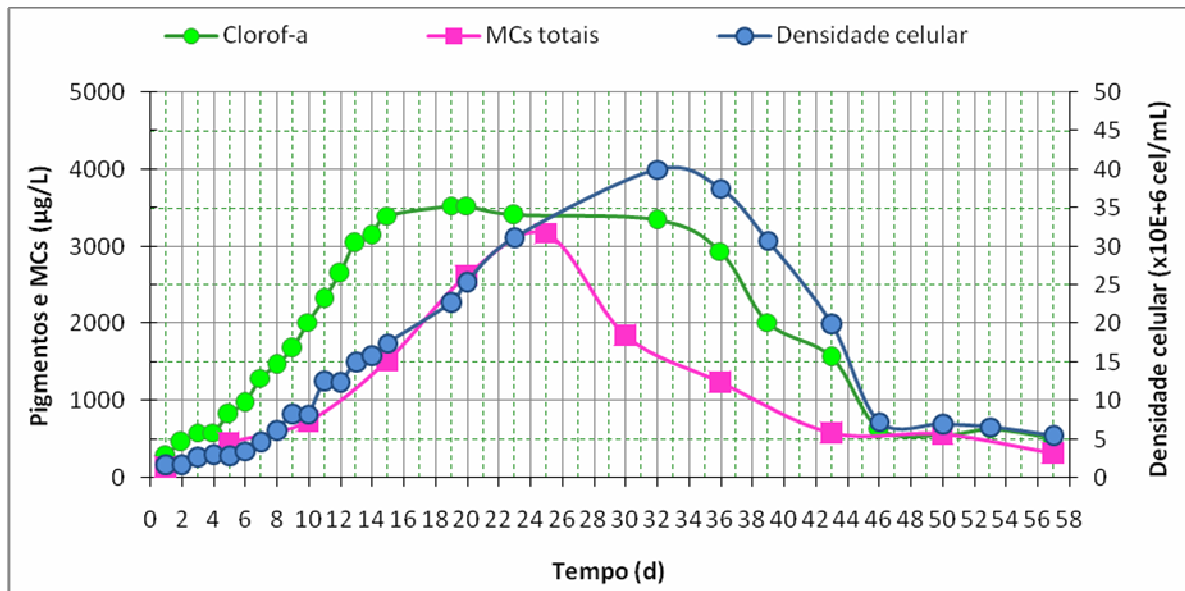
## **6.3. Resultados e discussão**

### **6.3.1. Qualidade da água**

As características físico-químicas da água foram pré-estabelecidas de acordo com (ABNT-NBR 15088/2004), com substituição completa e diária em placa de cultura celular. Os parâmetros mantidos em pH 7,0 a 7,6; dureza total entre 40 e 48 mg CaCO<sub>3</sub> / L; nitrogênio total a nível não-detectável pela metodologia segundo APHA/ AWWA/ WEF (2005), permitiram o desenvolvimento adequado da espécie.

### 6.3.2. Produção e caracterização de microcistina

A curva de crescimento de *Microcystis* sp. TAC95 em mesocosmo mostra o início de senescência após 30º dia (figura 2). Portanto, estabeleceu-se o período de 20 dias para a produção de microcistina destinado a ensaios, sendo o extrato celular preparado pós-liofilização do *pellet* o material foi alicotado em *vials* contendo 100 mg de extrato celular.

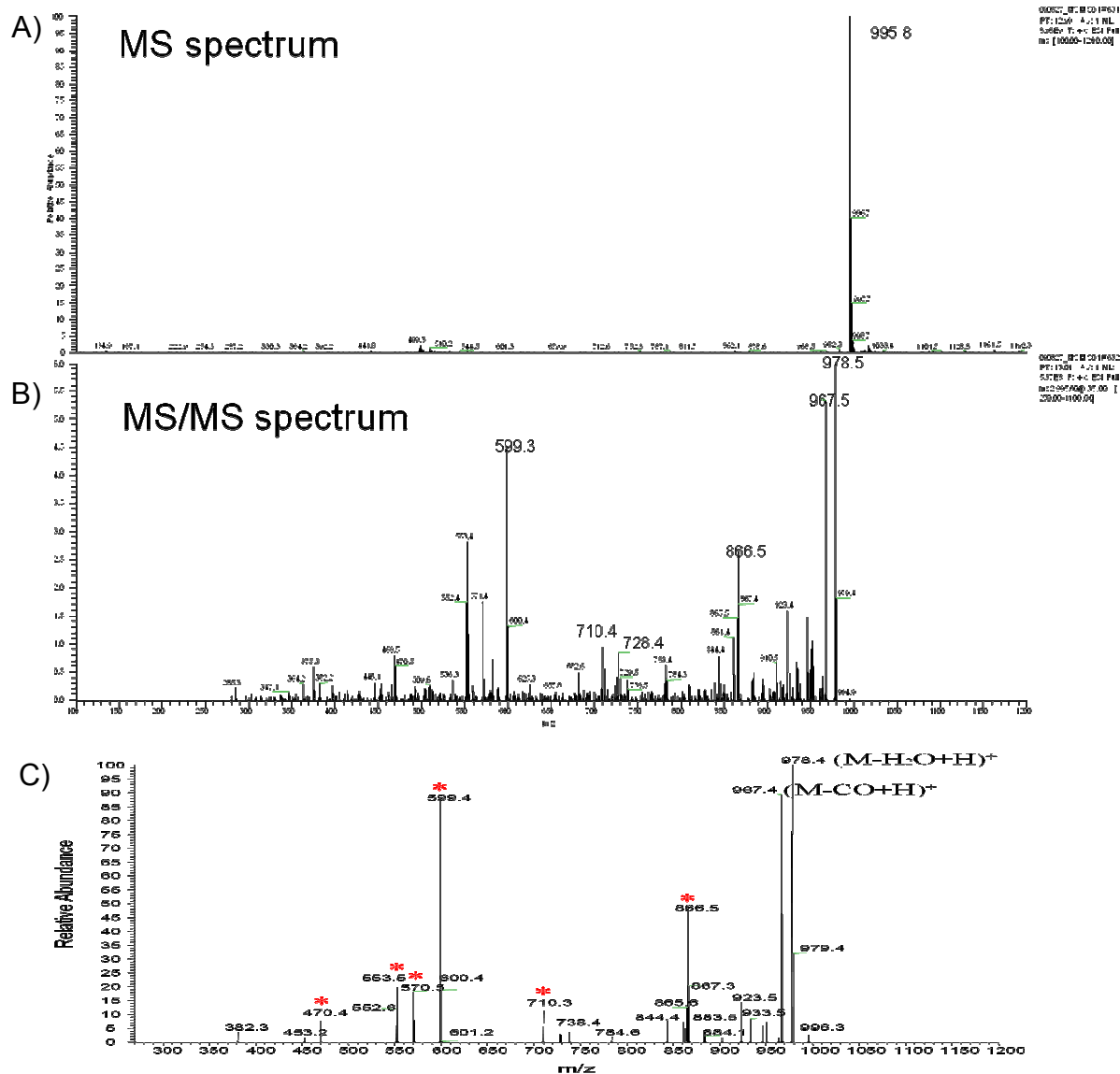


**Figura 2:** Curva de crescimento da *Microcystis* sp. TAC95, notar a senescência após o dia 30.

A quantificação de microcistinas totais realizada por ic-ELISA apontou o concentrado do extrato contendo 92 mg / L, sendo assim diluído para que a concentração da solução final resultasse em 5 µg / L de microcistinas totais.

A figura 3 apresenta a caracterização e confirmação da presença de microcistina LR por CLAE-MS / MS no extrato celular empregado para os ensaios. A amostra testada apresentou os mesmos padrões de espectro gerado pela quebra de ligações peptídicas do íon precursor padrão (m / z 995). Assim, os TIC's (total ion chromatogram) da análise apresentou 6 picos de íons identificados: 470 (Arg-Adda),

553 (Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg), 570 (Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-NH<sub>2</sub>), 599 (Arg-Adda-Glu), 710 (MeAsp-Arg-Adda-Glu(-H<sub>2</sub>O)) e 866 (Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-Adda) estabelecidas para MC-LR, previamente confirmada por LC-MS / MS e LC-MS / MS / MS (MAYUMI *et al.*, 2006).

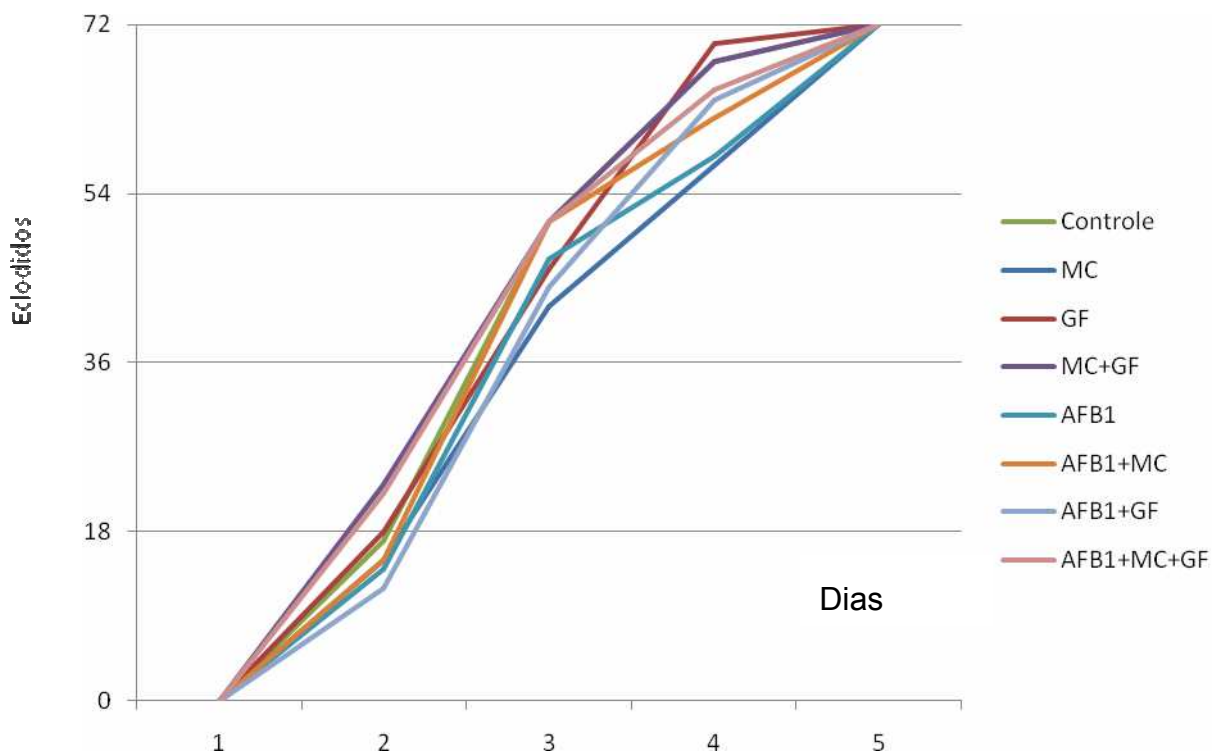


**Figura 3:** Espectro de MC-LR por LC-MS / MS em extrato celular microcistina produzida por *Microcystis* sp. TAC95 (A e B) no padrão de toxina e (C).

### 6.3.3. Eclodibilidade

B)

No modelo utilizado no trabalho, considerou-se cada poço de microplaca como sendo uma unidade experimental independente e livre de contaminação não planejada, para assegurar a precisão do estudo de eclodibilidade. Os contaminantes estudados não influíram na eclodibilidade, já que todos os animais eclodiram ao final de cinco dias, não havendo diferença significativa entre a taxa de eclosão na concentração testada ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4:** Eclodibilidade dos ovos de tilápia expostos à contaminação ambiental simulada. AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>, MC: microcistina em extrato celular de *Microcystis* sp. TAC 95 e GF: Glifosato.

O indício de mecanismo de defesa se manifesta pela eclosão prematura, já que pela ausência de mobilidade, o ovo de tilápia do nilo é totalmente dependente de cuidado materno. O período embrionário é a fase mais sensível; aliado a isso, a matriz portando os ovos na cavidade bucal não se alimenta e se debilita, incapacitando-a de detectar baixas concentrações de contaminantes, capazes de afetar a prole. Ao eclodir prematuramente, o embrião adquire mobilidade e locomove para ambiente menos contaminado, embora a eclosão precoce libere embriões

imaturos, incapazes de fuga perante predadores, ou procurar alimento através da predação. Em contraste, a eclosão tardia permite maior desenvolvimento larval, aumentando a probabilidade de sobrevivência no habitat (WOYNAROVICH, 1989).

#### 6.3.4. Comprimento

O comprimento padrão das larvas de tilápia diferenciou-se estatisticamente, mas sem nenhuma correlação aparente ao tratamento exposto ( $P < 0,05$ ). A aleatoriedade de comprimento na fase larval é considerada comum, já que utilizou-se animais sem melhoramento genético, sendo as diferenças observadas devidas ao alto desvio padrão (Tabela 6).

**Tabela 6:** Comprimento padrão (de cabeça ao começo de cauda) das larvas de tilápia.

Comprimento padrão de larvas		
Tratamento	N	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )
Controle	31	6858,8 <sup>f</sup>
MC	38	6978,7 <sup>d</sup>
GF	43	7176,7 <sup>b</sup>
MC+GF	44	7229 <sup>b</sup>
AFB1	33	6918,7 <sup>e</sup>
AFB1+MC	36	6840,9 <sup>f</sup>
AFB1+GF	40	7294 <sup>a</sup>
AFB1+MC+GF	40	7090,2 <sup>c</sup>

Letras diferentes significam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ )

Isto é, embora a tabela 4 indique diferença significativa, a aleatoriedade provavelmente decorrente de variação genética de animais não-melhorados, aliado a heterogeneidade considerada comum nesta fase interferiu na interpretação. Apesar de ter sido significativo as diferenças também sob  $P < 0,05$ , observa-se que

as médias dos comprimentos permaneceram aproximadamente entre 6 e 7 mm, dados que na prática podem ser irrelevantes no decorrer do desenvolvimento destes animais.

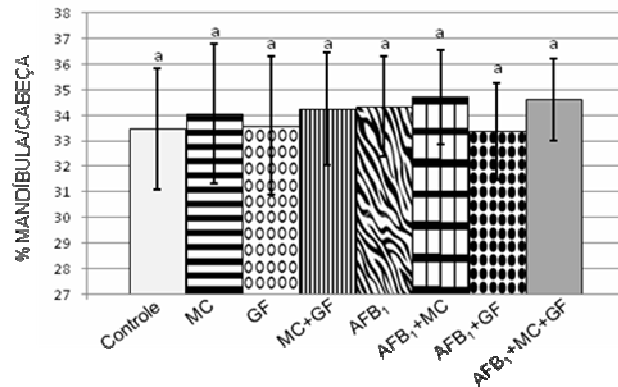
### 6.3.5. Proporcionalidade da mandíbula

A proporção entre comprimento de mandíbula e comprimento de cabeça é estabelecida na caracterização da espécie feita por Trewavas (1983), sendo que a proporção deve permanecer entre 29 e 37 % do comprimento de cabeça.

**Tabela 7:** Ocorrência de anormalidades na proporção mandíbula/cabeça.

Anormalidades na proporção mandíbula/cabeça		
Tratamento	N	N de anormais
Controle	31	0
MC	38	0
GF	43	0
MC+GF	44	0
AFB1	33	0
AFB1+MC	36	0
AFB1+GF	40	0
AFB1+MC+GF	40	0

Observa-se na tabela 5 que todos os animais analisados permaneceram dentro da faixa na normalidade (29-37 %). Com todos os animais dentro da faixa de normalidade, investigou-se se existiria alguma diferença significativa entre os tratamentos. No gráfico apresentado (Figura 5) observa-se que os tratamentos não se diferenciaram entre si inclusive em  $P < 0,01$ , mostrando que nas concentrações testadas, o extrato celular de *Microcystis* sp. TAC95, glifosato, a aflatoxina B<sub>1</sub> e respectivas combinações, não interferiram na proporção mandíbula/cabeça.



**Figura 5:** Proporção da mandíbula em relação à cabeça das larvas. Letras diferentes sobre as barras de erro significam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

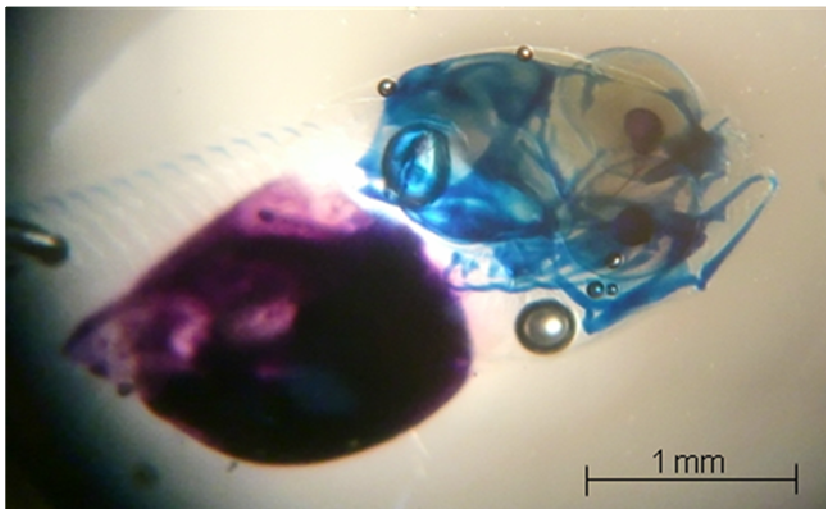
### 6.3.6. Malformação óssea

A análise de malformação óssea (pós-sacrifício) pelo processo de diafanização enzimática e química evidenciou o osso e materiais ricos em cálcio em vermelho e as cartilagens em azul com fundo tecidual transparente, permitindo análise detalhada de esqueleto (figura 6).

A Figura 6 mostra os tecidos de cavidade celomática ainda não digeridos pela pancreatina em púrpura e estrutura esquelética cartilaginosa (azul) em larvas diafanizadas sem evisceração. Nesta idade não ocorre interferência de pele, estando a escama ainda em formação, diferindo de peixe jovem ou adulto, que requer evisceração para evitar a coloração interferente oriunda de glicoproteína e cálcio presentes em tecidos da cavidade celomática. O estágio larval de tilápia em análise apresentou esqueleto cartilaginoso, com *Alcian Blue* ligado a mucopolissacarídeos de cartilagem (figura 6). Embora seja peixe ósseo, esta característica indicaria desenvolvimento normal sem ossificação precoce ou calcificação, observada em animais expostos à água do lago Mariut, Alexandria, Egito (ZAKI *et al.*, 1996). Em nosso trabalho, empregou-se concentrações baixas e passíveis de ocorrência ambiental.

O crânio, vértebras, nadadeira dorsal, anal e caudal e espinhas apresentaram-se em conformidade com a caracterização da espécie descrita por

Trewavas (1983). O animal evidenciou 30 a 32 vértebras com uma espinha dorsal em cada vértebra, assim como 11 a 13 raias (lepidotríquias) na nadadeira dorsal e 8 na nadadeira anal. O fato diferiu dos resultados de Zaki *et al.* (1996), que observaram diminuição do número de lepidotríquias e segmentação das mesmas devido a exposição à xenobióticos, indicando calcificação precoce e o risco de injúria devido a perda da flexibilidade.



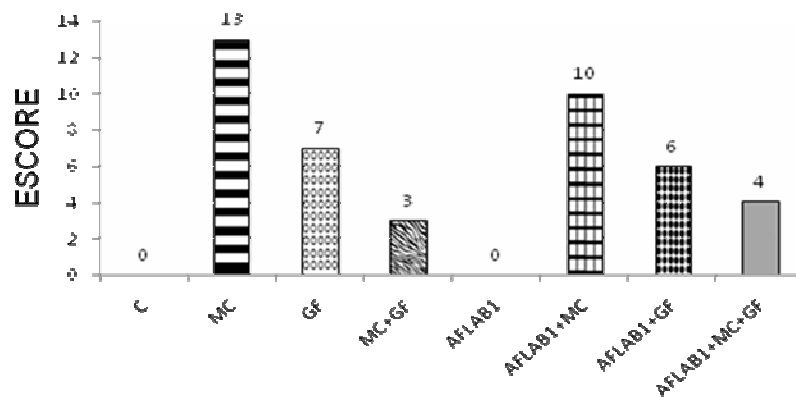
**Figura 6:** Larva de tilápia diafanizada, material em azul: cartilagem, material em púrpura: material rico em cálcio.

A análise do número de estruturas permaneceram na faixa normal em todos os animais, sem aumento ou diminuição do número ou aspecto estrutural, indicando que as concentrações testadas dos contaminantes também não influíram na calcificação prematura, na quantidade e forma das estruturas esqueléticas no final de 12 dias de exposição a xenobióticos.

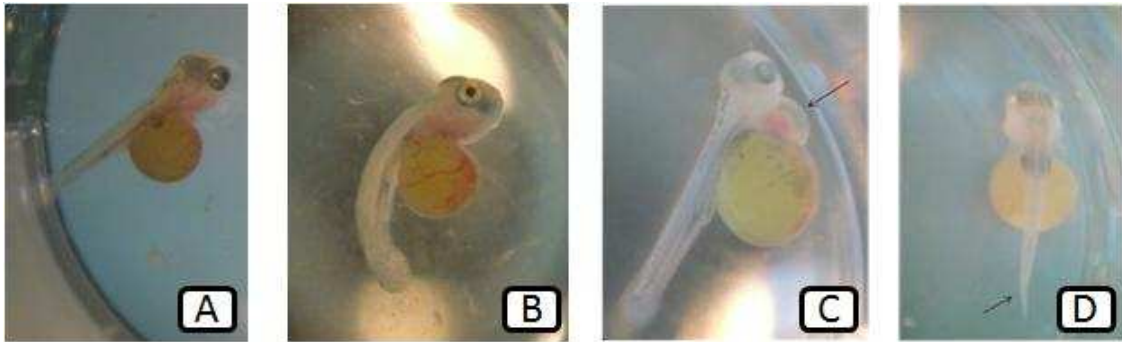
### 6.3.7. Escore de teratogênese

A figura 8 mostra as malformações macroscópicas registradas diariamente no decorrer de 12 dias, considerando que 90% estariam em estágio pós-larval e, contabilizaram-se todos os animais envolvidos no experimento (N=72). Os animais apresentaram desvios da coluna vertebral (para os lados e para baixo), desvio da cauda e megalocardia, também descritas na literatura (ZAKI *et al.*, 1996; DAN Li *et al.* 2009, PERDIE *et al.*, 2009).

As malformações macroscópicas identificadas foram classificadas de acordo com a gravidade. Um animal com a coluna vertebral desviada (figura 8B) apresenta dificuldade de natação, locomovendo-se em círculos, expondo-se a predadores e diminuindo probabilidade de atingir a maturidade. A figura 8C mostra megalocardia, resultando em desenvolvimento fatal, com morte de todas as larvas antes do final do experimento. Em contraste, larvas com desvio da cauda (8D) foram capazes de se regenerar, dando continuidade ao seu ciclo de vida sem outros pormenores. A análise diária de 12 dias retificou a importância da fase inicial de diferenciação no desenvolvimento animal, i.e. a fase larval ainda sem boca, intestino, ânus, brânquias e bexiga natatória e, no caso de tilápia mantém-se estático no fundo do recipiente, com nados ocasionais e rápidos à superfície (HAFEZ e HAFEZ, 2004). A multi-contaminação em concentração utilizada no experimento provavelmente teria diferente impacto na fase pós-larval, cujo animal com absorção completa de saco vitelínico e bexiga natatória funcional já nada como um animal adulto e encontra-se apto à alimentação exógena.

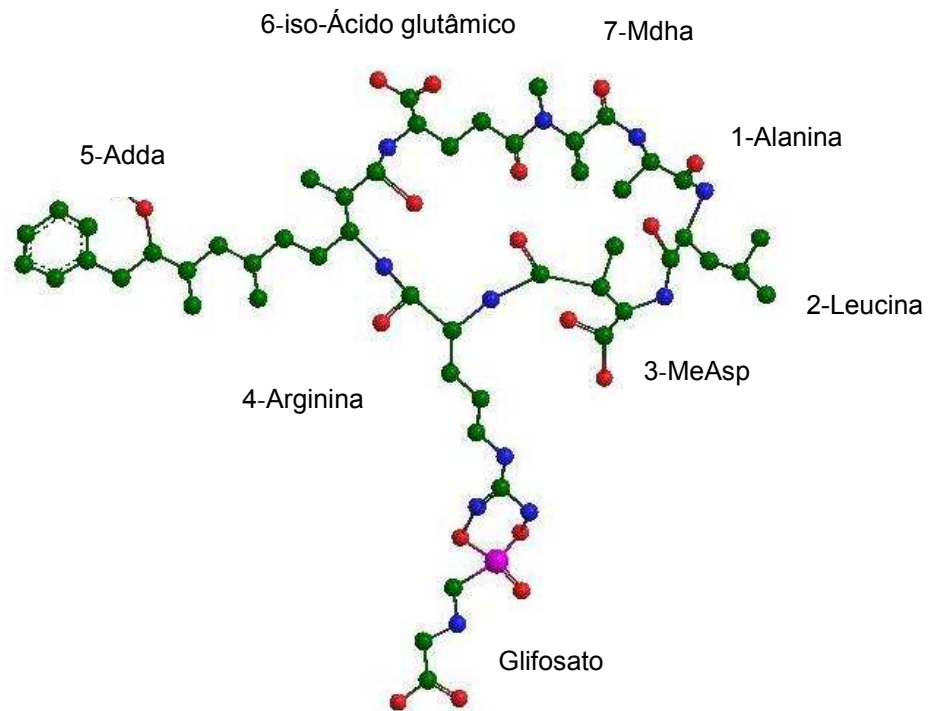


**Figura 7:** Escore de malformação macroscópica observado em larvas de tilápia (*O. niloticus*) vivas durante os 12 dias de exposição a combinações de aflatoxina B<sub>1</sub>, (AFB<sub>1</sub>) extrato celular de *Microcystis* sp. TAC95 (MC) e herbicida a base de glifosato (GF).



**Figura 8:** A) larva de tilápia sem anormalidades ; B) larva de tilápia apresentando desvio na coluna; C) larva de tilápia com megalocardia; D) larva de tilápia com desvio da cauda.

Na figura 7 observa-se o efeito antagônico do tratamento MC + GF, contradizendo o efeito somatório esperado. Tsui *et al.*(2005) também observaram antagonismo testando associação de glifosato (puro e em formulação comercial) a metais pesados (elementos altamente reativos e bioacumuláveis) na sobrevivência e bioacumulação em *Ceriodaphia dubia*, dependendo do metal testado. Os metais de transição, representados pela prata, cobre e níquel reduziram a bioacumulação e mortalidade de 100% para menos de 20%, enquanto que os metais representativos (chumbo) e não-metals (selênio) não afetaram a mortalidade. Os autores atribuíram redução de toxicidade decorrente de associação GF + metais pesado, já que o glifosato apresenta pKs em 0,8; 2,2; 5,4 e 10,2 (AMARANTE JR. *et al.*, 2002) i.e tendência da molécula com carga negativa em solução neutra. Conseqüentemente, a condição ambiental permitiria a complexação do GF deprotonada com os metais com carga positiva. Neste contexto, a condição de ensaio na faixa da neutralidade (pH 7) também poderia simular uma situação semelhante. A molécula de MC-LR protonada devido ao resíduo de arg na posição 4 (pK=12,48) complexaria com GF deprotonado (figura X). Assim, a complexação entre GF com carga negativa com resíduo de Arg positivamente carregada reduziu a teratogênese devido a indisponibilização de ambos os poluentes ambiente aquático.



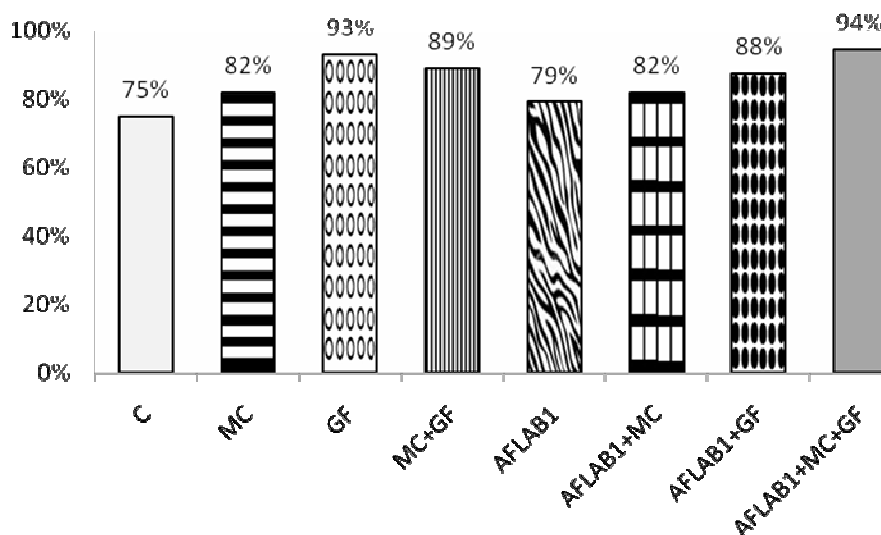
**Figura 9:** Simulação representativa da interação microcistina LR - glifosato. Verde: carbono, vermelho: oxigênio, azul: nitrogênio, rosa: fósforo.

Por outro lado, o efeito de ensaio pós-AFB<sub>1</sub> não deve ser atribuído somente a microcistina e glifosato, já que não se utilizou MC-LR e glifosato puros, simulando uma condição real de contaminação ambiental. O extrato celular preparado com cultivo de *Microcystis* sp. TAC95 também deve conter lipopolissacarídeo altamente tóxico, responsável pela reação inflamatória em peixe (NOVOA *et al*, 2009); o GF utilizado consistiu de formulação comercial (RoundUp® Original) contendo o surfactante tóxico *Polyethoxylated tallowamine* (POEA).

### 6.3.8. Sobrevivência

A figura 10 mostra a taxa de sobrevivência calculada em porcentagem de animais sobreviventes no final de 12 dias de experimento, independentemente de alteração macroscópica. A sobrevivência manteve-se acima de 60 %, considerado normal nesta fase de vida da espécie. A variação aleatória de sobrevivência entre

grupos ocorreu sem motivo aparente, estando dentro de normalidade em indivíduos heterogêneos.



**Figura 10:** Porcentagem de sobrevivência das larvas de tilápia do nilo (*O. niloticus*) submetidos a tratamento com AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>, MC: microcistina em extrato celular de *Microcystis* sp. TAC 95, GF: Glifosato após 12 dias (N amostral de 72 animais por grupo).

#### 6.4. Conclusão

As malformações morfológicas e biométricas registradas em fase larval de tilápia, decorrente de baixo nível de exposição, reverteram antes da fase pós-larval, independentemente de contaminante. Todavia, salienta-se a teratogênese permanente sem redução na sobrevivência observada em concentrações capazes de ocorrerem em habitat natural perante *Microcystis* sp.TAC95, glifosato e AFB<sub>1</sub>.

## **7.CAPÍTULO 2: Histopatologia em larvas de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas à aflatoxina B<sub>1</sub>, *Microcystis* sp., e herbicida à base de glifosato**

### **7.1.Introdução**

Microcistinas são heptapeptídeos monocíclicos tóxicos produzidas por espécies pertencentes aos gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix*. As microcistinas possuem sete aminoácidos em sua composição e são nomeadas de acordo com a variação dos L-aminoácidos, logo, por exemplo, microcistina-LR contém leucina (L) e arginina (R). Mais de 70 microcistinas foram isoladas e identificadas, sendo a MC-LR, a toxina de ocorrência mais freqüente (DJEDIAT *et al*, 2010).

Glifosato, N-fosfometilglicina, comumente vendido sob a formulação comercial, Roundup®, é um herbicida extremamente usado em áreas de plantação ou urbanas. Apesar de alguns estudos mostrarem que o composto pode ser classificado como não carcinogênico, também foi demonstrado que tanto o composto isolado glifosato, como a formulação comercial Roundup® podem causar um rápido aumento na divisão celular em células de câncer de mama (GEORGE *et al*, 2010). Os testes de toxicidade crônica são geralmente avaliados por meio de exposições prolongadas do organismo a concentrações subletais. Em peixes geralmente abordam apenas uma fase do ciclo de vida, que pode variar de sete dias a alguns meses (ALBINATI, 2009).

Aflatoxinas são derivados de difuranocumarinas predominantemente produzidas como metabólito secundário por fungos filamentosos, principalmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxina B<sub>1</sub> é a variação mais comum, é altamente mutagênica, tóxica, carcinogênica e teratogênica para humanos e animais (ALBERTS *et al*, 2009).

Dentre as espécies de peixe mais cultivadas, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) se destaca pela capacidade de suportar variações ambientais e

sobrepesca. O cultivo vem sendo muito apreciado por pescadores profissionais e amadores devido sua facilidade de comercialização e carne saborosa (SANTOS *et al*, 2004). Assim, a tilápia do Nilo como modelo experimental para averiguar efeitos histológicos de uma possível multi-contaminação. Uma vez que efeitos tóxicos de poluentes podem ser evidentes em células e tecidos, antes que mudanças significativas no comportamento ou na aparência externa possam ser identificadas (ALBINATI, 2009).

Levando todos esses fatos em consideração, o presente estudo teve o objetivo de utilizar como biomarcadores histológicos o fígado e o rim de tilápias para verificar o efeito de contaminantes ambientais: aflatoxina B<sub>1</sub>, microcistina e glifosato.

## **7.2. Material e métodos**

**7.2.1. Animal experimental:** o modelo experimental para o ensaio consistiu das larvas de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), obtidas e mantidas conforme item 5.2.

**7.2.2. Aflatoxina B<sub>1</sub>:** Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA, diluída em metanol e concentração determinada de acordo com item 5.3.

**7.2.3. Herbicida a base de glifosato:** herbicida comercial Roundup<sup>®</sup> Original (Monsanto, St, Louis, EUA) diluída a 5 µL/L para os ensaios de imersão (item 5.4).

**7.2.4. Microcystis sp.:** a cepa TAC95 foi cultivada, concentrada, liofilizada e diluída para o uso (item 5.5). A determinação da variante da microcistina foi realizada por HPLC-MS (item 5.10.3.2.) e a quantificação realizada por c-ELISA (item 5.10.3.1.).

### **7.2.5. Delineamento experimental:** definido no item 5.6.

Oito tratamentos, cada um contendo 48 unidades experimentais foram formulados, incluindo o controle negativo. Os ovos de tilápia foram expostos a 5 ng/mL de AFB<sub>1</sub> por 1 hora em placa de Petri, seguida de exposição isolada e simultânea a Roundup® (glifosato) e microcistina (extrato celular concentrado e liofilizado de *Microcystis* sp. TAC95, item 5.5.1) em microplaca para cultura de célula (1 ovo por poço). As concentrações foram baseadas em trabalhos anteriores e ensaios prévios. Após 12 dias, 5 larvas/tratamento foram aleatoriamente coletadas para análise histológica.

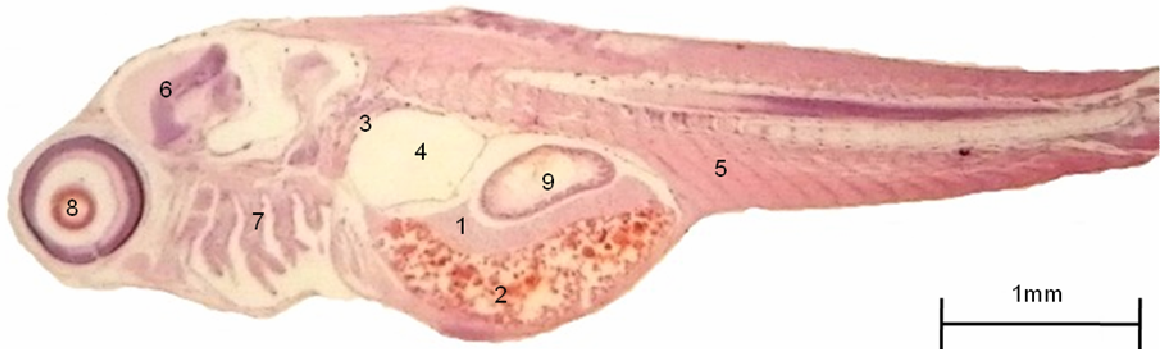
**7.2.6. Histologia:** a análise histológica/histoquímica consistiu de técnicas detalhadas no item 5.9.

## **7.3. Resultados e discussão**

A figura 13 e tabelas 8 e 9 apresentam a análise histológica em larvas de tilápia submetidas ao tratamento com AFB<sub>1</sub>, herbicida à base de glifosato e extrato celular de *Microcystis* sp. TAC95 contendo microcistina. A maioria dos animais expostos a contaminantes ambientais na concentração testada, mesmo apresentando determinadas alterações macroscópicas, foram capazes de reversão, obtendo-se porcentagem de sobrevivência normal no 12º dia. Salienta-se que o ensaio de imersão foi realizado em água reconstituída com qualidade controlada, mantendo-se as características adequadas para a espécie.

A figura 11 mostra o corte histológico integral de larva de tilápia, que atingiu entre 6 a 7 mm de desenvolvimento no 12º dia, independentemente do tratamento submetido. Conforme a figura, todos os grupos já continham a maioria dos órgãos internos de peixe normal em formação, apontados e identificados na legenda. Nesta idade também pode iniciar a diferenciação de hepatopâncrea, sendo observada em uma larva normal, entre os cinco animais analisados (dados não apresentados). As brânquias mostraram-se ainda em estágio insuficiente para análise tecidual, portanto

os dois principais órgãos selecionados para estudos subseqüentes consistiram de fígado e rim.



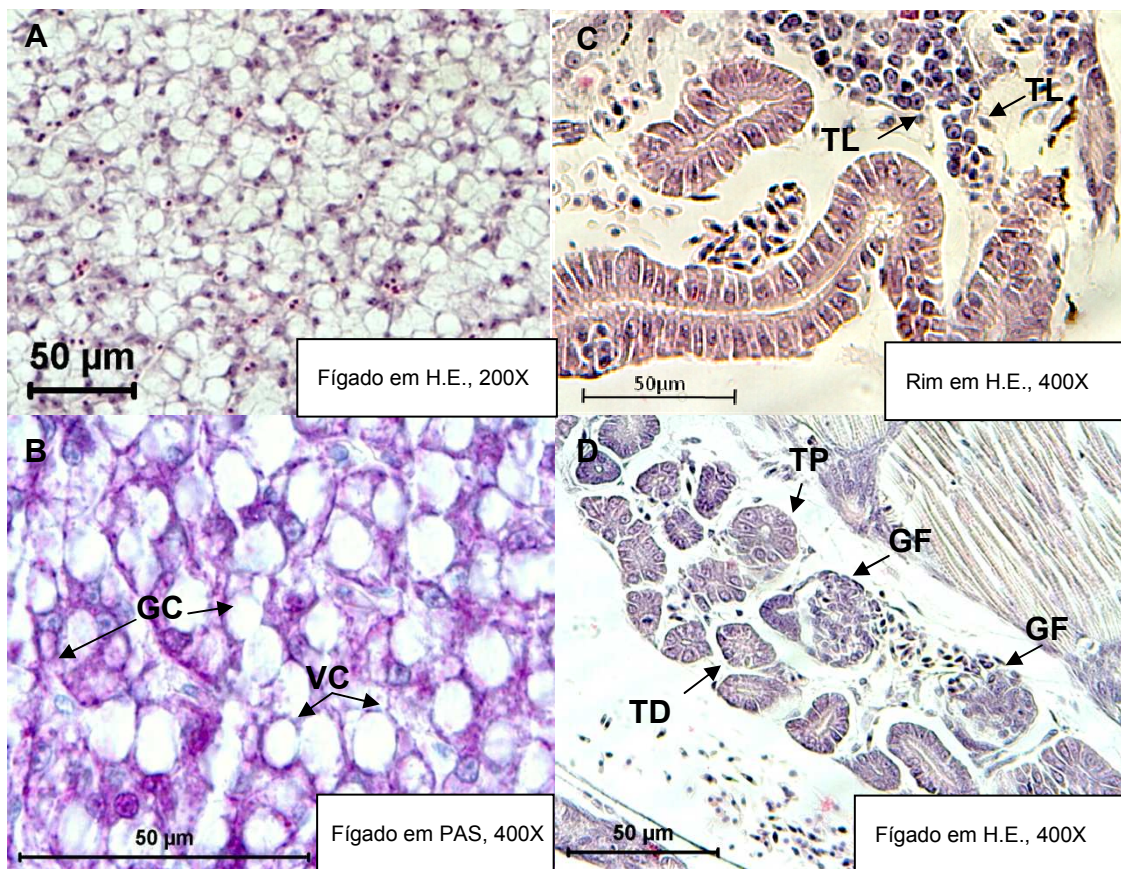
**Figura 11:** Corte longitudinal da larva de tilápia corada com H.E. (5µm de espessura). 1 – fígado; 2 – saco vitelínico; 3 – porção proximal de rim; 4 – bexiga natatória; 5 – musculatura; 6 – cérebro; 7 – arcos branquiais; 8 – olho.

Dois órgãos com maior grau de alteração consistiram de fígado e rim, sendo observado em todos os tratamentos, embora variasse em quantidade e intensidade (tabelas 8 e 9). As escassas literaturas referentes à histopatologia de peixes expostos a multicontaminantes diferem entre si em relação às espécies, ao delineamento experimental e, principalmente, à metodologia da avaliação de resultados (Albinati *et al.*, 2009).

A tabela 1 mostra as alterações histológicas detectadas no fígado de larva, que apresentou-se atípico, se comparado com tilápia adulto. Os hepatócitos apresentaram-se extremamente vacuolizado, mas o fato seria considerado normal em animal com alta demanda energética e metabolismo acelerado, já que os hepatócitos estariam acumulando glicogênio. A vacuolização hepática normal ocorre em peixe dependendo da fase da vida, sendo que o fígado e pâncrea não funcionais ao eclodir, somente se tornam funcionais após absorção do saco vitelínico em larva de tilápia (Govoni *et al.*, 1986). Durante a embriogênese, o saco vitelínico sustenta tanto a demanda energética para a organogênese quanto para os processos metabólicos (DELERME *et al.*, 2005). A falta de funcionalidade hepática justificaria a reação negativo para PAS (figura 12B), demonstrando que a vacuolização do tecido

não seja devida ao acúmulo de glicogênio, mas provavelmente ao acúmulo de lipídeos, sendo observado também em larva de *Melanogrammus aeglefinus* (HAMLIN *et al.*, 2000)

A baixa concentração de glicogênio em relação a predominância de lipídeos, em larva de *O. niloticus* (figura 12), também tem sido observada na ontogênese no primeiro mês pós-eclosão em larva de *Sparatus aurata* (SARASQUETE *et al.* (1995)



**Figura 12:** Fígado em larva de tilápia do nilo (*O. niloticus*) A - H.E.: vacuolização intensa com presença de sinusóides, mas sem disposição lobular evidente (200x); B - PAS: baixa quantidade de grânulos de glicogênio (GC) e vacuolização (VC)(400x); Rim em larva de tilápia do nilo (*O. niloticus*) C - porção proximal do rim com tecido linfóide (TL) em comparação com a porção distal (400x); D - Porção distal do rim sem tecido linfóide. Observar glomérulos em formação (GF), túbulo contorcido distal (TD) e túbulo contorcido proximal (TP) (400x).

Hepatócitos normais apresentaram núcleo com cromatina dispersa, concentrada próximo a membrana nuclear, com um ou mais nucléolos. O citoplasma apresentou-se granular e altamente vacuolizado. Resultados semelhantes foram

encontrados por Fanta *et al.*(2003) ao analisar o fígado de coridoras (*Corydoras paleatus*).

A maioria de alterações hepáticas observadas não foram de caráter necrótico e apresentavam a possibilidade de reversão para tecidos normais e funcionais (figura, tabela). Outrossim, sendo fígado um órgão vital para a biotransformação, as alterações devidas a impactos toxicológicos frequentemente estão associadas com condições degenerativas e necróticas.

A figura 12B mostra o fígado corado com ácido periódico-*Schiff* (PAS) para evidenciar macro-moléculas de carboidrato (glicogênio, glicoproteínas e proteoglicanas) em púrpura-magenta. A reação oxidativa seletiva desencadeada com ácido periódico produz aldeídos, que subsequentemente reagem com o reagente de *Schiff*, sendo usualmente utilizada para identificar glicogênio intracelular. Os hepatócitos das larvas de tilápia apresentaram baixa quantidade de glicogênio se comparado ao peixe adulto (figura 12B), mas vacúolos evidentes sugerem presença de lipídeo devido a falta de coloração, tanto por HE como por PAS. Conforme mostra a figura 11, existe uma proximidade íntima entre fígado e saco vitelínico em larva de tilápia, e no estágio de desenvolvimento estudado está ocorrendo transição de função de armazenamento do saco vitelínico para o fígado.

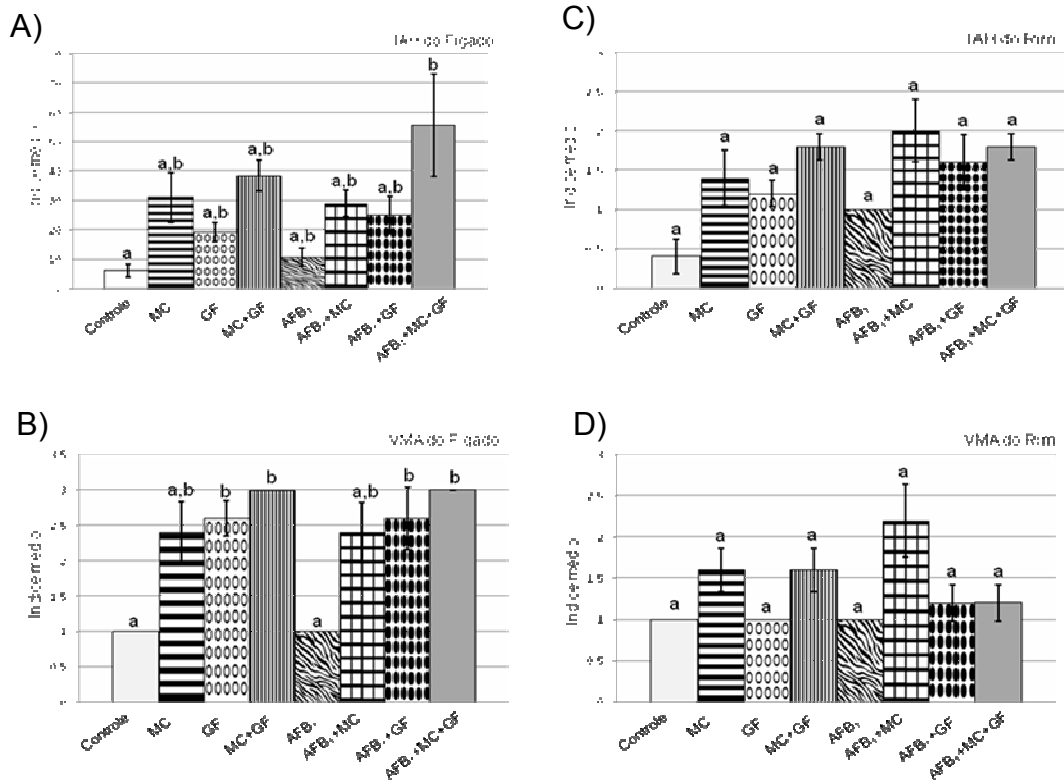
A fase adulta pode apresentar vacúolos conforme estado metabólico do animal (estresse, período de reprodução, contaminação ambiental) a Figura 12A também mostra que as larvas de tilápia nesta fase não apresentaram lobos no fígado. Em determinadas espécies, como em *Sebastes melanops*, *Brevoortia patronus* e *Leiostomus xanthurus* os lobos do fígado apenas se tornam distintos ao redor do 30º dia após a eclosão (GOVONI *et al.*, 1986).

O rim de tilápia em estágio larval é composto por uma porção proximal formada por tecido intersticial e nefrons, e uma porção distal formada somente por nefrons, com pouco, ou até mesmo ausência de tecido intersticial. Na figura 12D observou-se um foco na parte distal do rim, apresentando túbulos contorcidos proximal, distal e glomérulos em formação. A diferença entre os túbulos contorcidos distais e proximais pôde ser percebida pelo tamanho das células cubóides e sua

superfície na luz do túbulo. Os túbulos proximais possuem as células cubóides maiores, com borda em escova e maior número de mitocôndria (não é possível observar com o aumento de 1000x utilizado), os túbulos distais possuem as células menores, seus microvilos não formam escova e o número de mitocôndrias é menor.

**Alterações histológicas mais freqüentes observadas nos peixes expostos à estrato de *Microcystis sp.* TAC95 contendo microcistina, herbicida a base de glifosato e aflatoxina B<sub>1</sub>**

Os animais expostos apenas a um contaminantes ou combinação entre eles apresentaram alterações histológicas nos rins e no fígado. A quantificação dos danos foi calculado através do Índice de Alterações Histológicas, IAH e do Valor Médio de Alterações, VMA.



**Figura 13:** Índice de alterações histológicas - IAH e valor médio de alterações - VMA das alterações observadas no fígado (A e B) e rim (C e D) de tilápia. As barras de erro correspondem ao erro padrão e letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos. (P < 0,05, N = 5).

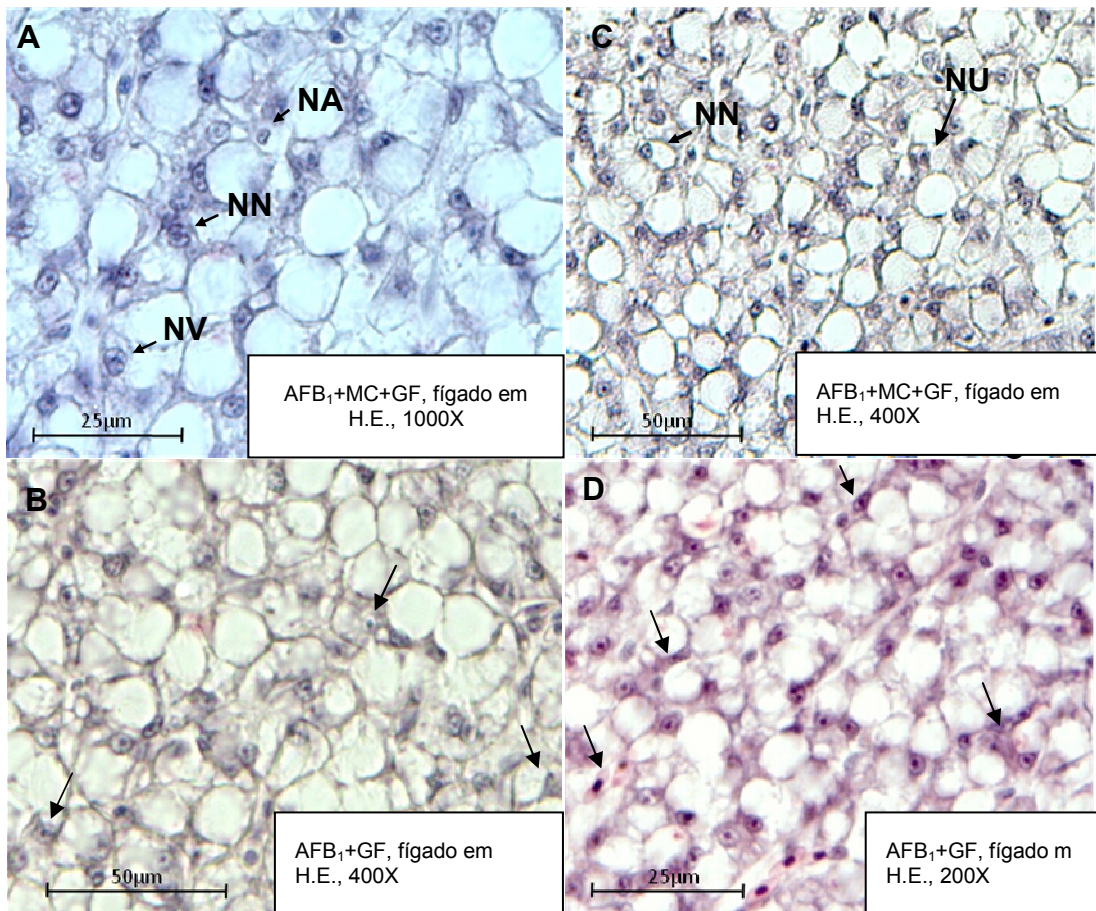
Na figura 13, apresentam-se gráficos dos índices de alterações histológicas e suas análises de diferença de média por Tukey a  $P < 0,05$ . Diferenças significativas foram encontradas somente no fígado, em ambos índices de avaliação. Nos rins, a ausência de efeitos significativos pode ser atribuída a baixa toxicidade ao órgão em formação.

Como foi observado na figura 13A somente o tratamento  $AFB_1 + MC + GF$  diferiu estatisticamente pela avaliação do IAH, no entanto os tratamentos apresentaram alterações histológicas em maior número e severidade que o tratamento controle.

Na figura 13B, os tratamentos diferiram do controle, porém não houve diferença entre eles. Histologicamente, os efeitos dos contaminantes não causaram alterações específicas.

Para rim, em ambos os índices, IAH e VMA, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e o controle, no entanto foi possível observar que em geral houve mais alterações nos animais tratados que nos animais controle.

Os tratamentos que receberam  $AFB_1$  apresentaram as mesmas alterações dos tratamentos sem a micotoxina, não demonstrando efeitos adicionais nas larvas. Essa ausência de efeitos de uma toxina tão potente pode ser atribuída à concentração e ao método de exposição. A  $AFB_1$  é polar e foi empregada por imersão dos ovos, no entanto a membrana que reveste o ovo possui microporos para troca gasosa e de íons presentes na água. Moléculas polares não possuem a capacidade de atravessar a barreira, mantendo assim o embrião sem contato com a micotoxina. A concentração da  $AFB_1$  também influenciou no resultado, enquanto neste trabalho foi empregada a concentração equivalente a contaminação de  $5 \mu\text{g} / \text{Kg}$ , alguns experimentos (LOPES *et al*, 2005a e 2005b) utilizaram concentrações superiores o permitido por legislação ( $203 \mu\text{g} / \text{Kg}$ ) para obter resultados significativos em experimentos com peixes).



**Figura 14:** Fígado de tília ( *Oreochromis niloticus*) corado com HE, A- NA: Núcleo Atrofiado, NN: Núcleo Normal, NU: Núcleo com aumento de volume, NV: Núcleo Vacuolado; B – Observar eritrócitos pelo tecido; C – Núcleo com aumento de volume; D – Observar aumento da frequência de capilares. Aumento de 1000X em A e 400X em B, C e D.

Foi possível encontrar resultados semelhantes aos aqui apresentados, no que se diz respeito às alterações histológicas e contaminantes (LANGIANO, 2006; JIRAUNGKOORSKUL *et al.* 2002 e 2003; ALBINATI *et al.* 2009), porém em fases distintas do desenvolvimento de peixes.

**TABELA 8:** Alterações hepáticas nos grupos de peixes expostos a diferentes combinações de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), extrato celular de *Microcystis* sp. TAC95 (MC) e glifosato (GF).

Alterações	peso	Porcentagem de peixes com dano (N =5)							
		Ctrl	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>
PContCel	I	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PContNuc	I	N.D.	N.D.	20	20	20	40	40	40
AVolCel	I	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AVolNuc	I	N.D.	60	80	60	40	40	40	100
DFreqNuc	I	N.D.	20	20	N.D.	N.D.	20	N.D.	N.D.
EstBil	I	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	20	20
HHem	II	N.D.	60	N.D.	80	20	60	40	60
RupVas	II	N.D.	80	20	20	N.D.	20	40	20
VacNuc	II	N.D.	40	80	80	N.D.	60	20	40
DegNuc	II	40	40	60	100	60	80	80	100
AtrofNuc	II	20	60	20	60	20	60	60	100
RompCel	II	N.D.	20	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	20
Necrose	III	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	20

T<sub>1</sub> = MC; T<sub>2</sub> = GF; T<sub>3</sub> = MC+GF; T<sub>4</sub> = AFB<sub>1</sub>; T<sub>5</sub> = AFB<sub>1</sub>+MC; T<sub>6</sub> = AFB<sub>1</sub>+GF; T<sub>7</sub> = AFB<sub>1</sub>+MC+GF; N.D.= não detectado; PContCel=perda ou atipia do contorno dos hepatócitos; PCont Nuc=perda ou atipia do contorno do núcleo dos hepatócitos; AVolCel=aumento do volume celular; AVolNuc= aumento do volume nuclear;DFreqNuc=diminuição da frequência relativa de núcleos; EstBil=estagnação biliar; HHem=hiperemia; RupVas=ruptura de vasos; VacNuc=vacuolização nuclear; DegNuc=degeneração nuclear; AtrofNuc= atrofia nuclear; RompCel=rompimento celular.

A necrose, por ser o estágio mais avançado da degeneração celular, não foi registrada nesse experimento, por se tratar de concentrações baixas. É possível que em concentrações maiores, os mesmos contaminantes e / ou a combinação entre eles possam vir a causar degenerações mais graves e irreversíveis como a necrose.

**TABELA 9:** Alterações renais nos grupos de peixes expostos a diferentes combinações de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), extrato celular de *Microcystis* sp. TAC95 (MC) e glifosato (GF).

Alterações	peso	Porcentagem de peixes com dano (N total =5)							
		Ctrl	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>
PCTL	I	20	60	40	60	N.D.	100	60	100
DHL	I	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
HTCT	I	N.D.	60	40	20	40	40	40	60
PAST	I	20	20	40	100	60	60	80	20
DHS	II	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Nec	III	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

T<sub>1</sub> = MC; T<sub>2</sub> = GF; T<sub>3</sub> = MC+GF; T<sub>4</sub> = AFB<sub>1</sub>; T<sub>5</sub> = AFB<sub>1</sub>+MC; T<sub>6</sub> = AFB<sub>1</sub>+GF; T<sub>7</sub> = AFB<sub>1</sub>+MC+GF; N.D.= não detectado; PCTL= perda do contorno ou contorno atípico das células do tecido linfóide; DHL= degeneração hialina leve; HTCT=hipertrofia das células tubulares; PAST=presença de material PAS-positivo nas células tubulares; DHS=degeneração hialina severa; Nec=necrose.

### Índice Hepatosomático e Proporção do saco vitelínico

O índice hepatossomático (proporção do fígado em relação ao corpo) foi determinado pelo comprimento de ambos. Tavares, 2000 correlaciona positivamente a relação entre peso hepático/peso corporal e peso hepático/comprimento corporal, desta forma a utilização da medida comprimento fez-se viável devido aos animais serem demasiadamente pequenos.

O saco vitelínico é a reserva de energia para o desenvolvimento do animal, sendo possível aferir o estágio de desenvolvimento de acordo com a quantidade de reserva ainda presente no anexo embrionário. Utilizou-se a proporção entre a área do anexo embrionário e o comprimento padrão, em um corte longitudinal-central para determinação da proporção do saco vitelínico ao 12º dia de vida.

**Tabela 10:** Análise biométrica de *O. niloticus* perante Índice Hepatosomático (IHS) e proporção do saco vitelínico em relação ao comprimento padrão (SV/CP).

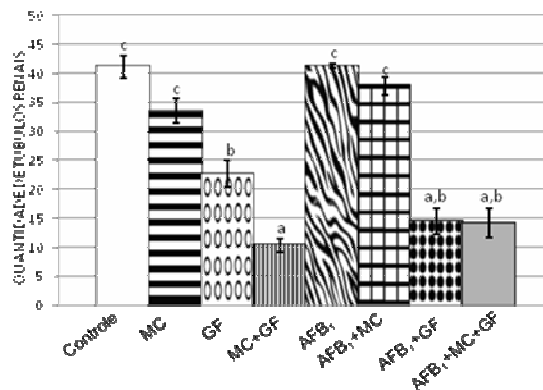
Tratamento	IHS	SV/CP
Controle	21,25 ± 1,82	57,68 ± 25,9
MC	21,53 ± 1,65	74,88 ± 30,15
GF	21,32 ± 3,12	50,93 ± 40,69
MC+GF	16,47 ± 0,72	37,01 ± 53,81
AFB <sub>1</sub>	17,90 ± 3,19	28,83 ± 21,75
AFB <sub>1</sub> +MC	19,98 ± 3,66	57,20 ± 26,23
AFB <sub>1</sub> +GF	20,52 ± 3,29	52,14 ± 49,53
AFB <sub>1</sub> +MC+GF	24,07 ± 1,10	98,42 ± 70,09

AFB<sub>1</sub> = aflatoxina B<sub>1</sub>; MC = extrato celular de *Microcystis* sp. TAC95; GF = glifosato.

A determinação dos valores padrão para a determinação do IHS é importante para a compreensão dos distúrbios hepáticos, que podem ocorrer durante os processos patológicos. De acordo com Tavares (2000) *O. niloticus* apresentou o fígado proporcionalmente maior que a maioria das espécies comerciais, porém menor que as outras tilípias. Outros fatores, além de contaminantes, como alimentação e infecções podem ser responsáveis por eventuais alterações de tais características biométricas.

O IHS não diferiu entre os tratamentos e apresentou baixo desvio padrão, demonstrando que apesar do tamanho dos animais terem diferido estatisticamente como observado no capítulo anterior, a proporção entre fígado e o corpo não foi afetada. De acordo com Delorme *et al.*, 2005 larvas de *Orizyas latipes* apresentaram diminuição do tamanho e massa do fígado quando expostas a MC-LR, no entanto a exposição feita pelos autores não simula uma ocorrência natural, pois foi injetado diretamente no saco vitelínico a quantidade de 2 pg / saco vitelínico (equivalente a 100 µg / L, ou seja, 20 vezes a concentração utilizada neste trabalho).

O desenvolvimento do rim foi aferido pela contagem de túbulos renais presentes no corte central da larva (Fig. XX). Quanto maior o número de túbulos presente no corte, mais avançado foi considerado o estágio do desenvolvimento. Existiu a possibilidade de ter se contabilizado o mesmo túbulo mais que uma vez, pelo fato de túbulos renais serem contorcidos e poderem passar pela seção mais que uma vez, no entanto todos os túbulos foram contabilizados pois se um túbulo passou mais que uma vez pela seção, indica que o tamanho deste é superior e logo é mais funcional, também indicando um estágio mais avançado.



**Figura 15:** Quantidade de túbulos renais detectadas no corte central de tilápia.

Os animais tratados com MC e AFB<sub>1</sub> + MC não diferiram estatisticamente do grupo controle e do grupo que recebeu somente AFB<sub>1</sub>, no entanto todos os grupos que recebeu o GF apresentaram menor quantidade de túbulos renais, fato este que pode ser devido ao metabolismo dar mais importância com a detoxicação do organismo que sua própria formação.

Os resultados histológicos diferiram dos resultados teratogênicos macroscópicos, apresentados no capítulo anterior. Enquanto a utilização concomitante da MC e do GF diminuíram as alterações teratogênicas, na histologia pode-se observar o efeito contrário. Apesar de terem sido os mesmo animais e o mesmo tempo de exposição, os efeitos teratogênicos não reversíveis levaram os animais a morte, enquanto os efeitos reversíveis já haviam desaparecido ao 12º dia. Com isso observou-se que os efeitos teratogênicos tinham caráter de efeito agudo,

enquanto os efeitos histológicos, caráter de efeito crônico. Embora o tempo de exposição tenha sido o mesmo, os efeitos teratogênicos foram de uma fase do desenvolvimento, levando o animal a morte ou não, já os efeitos histológicos representam os efeitos de toda uma fase, o período larval, caracterizando assim um ensaio crônico.

## **Conclusão**

Através do ensaio de co-exposição de tilápia a *Microcystis* sp. TAC95, aflatoxina B1 e herbicida à base de glifosato foi possível observar alterações histológicas no fígado e no rim.

As alterações de fígado foram significativamente ( $P < 0,01$ ) diferentes nos animais tratados com glifosato e suas combinações, porém não houve diferença significativa nos animais tratados apenas com extrato celular de *Microcystis* sp. TAC95.

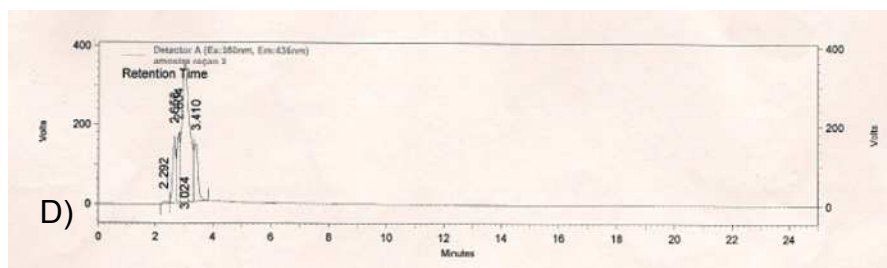
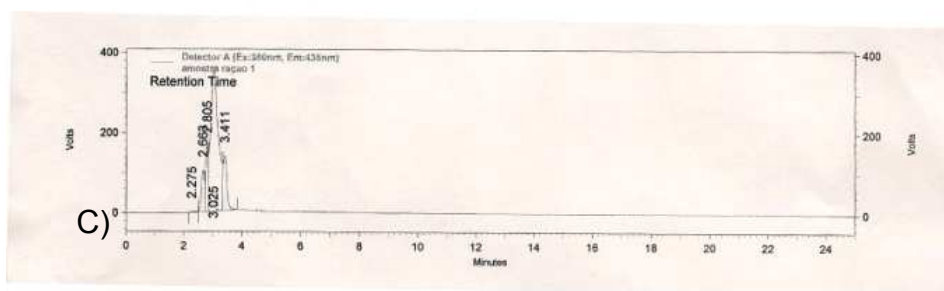
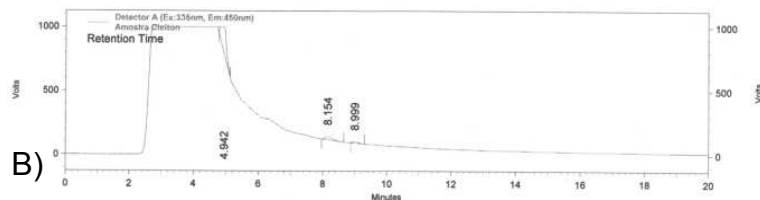
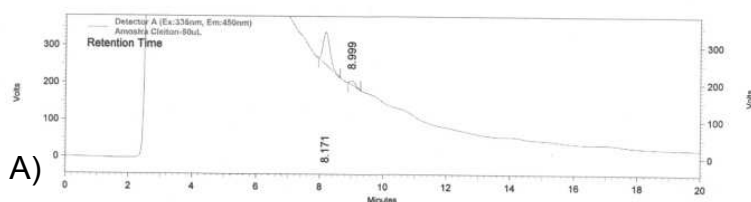
As alterações de rim não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, mostrando que a histologia renal não foi afetada pelos contaminantes nas concentrações empregadas. No entanto, o número de túbulos renais foi significativamente menor nos animais que entraram em contato com glifosato.

Os resultados mostraram que o extrato celular de *Microcystis* sp. TAC95 e glifosato, mesmo em doses consideradas baixas e sem efeito tóxico agudo, pode desencadear alterações nos tecidos do fígado e rim durante a ontogênese de tilápia.

## 8. Notas de pesquisa

### 8.1. Análise de Micotoxinas

O lote da ração fornecida aos animais durante os 60 dias de experimento não apresentou, em seus cromatogramas, picos no momento de retenção para as micotoxinas analisadas, acusando resultado negativo para as análises de fumonisinas e aflatoxinas, como pode ser observado na figura 16 mostrando-se de boa qualidade para o fornecimento animal em relação a micotoxinas.



**Figura 16:** A e B: análise de fumonisinas por CLAE; C e D: análise de aflatoxinas por CIA-CLAE.

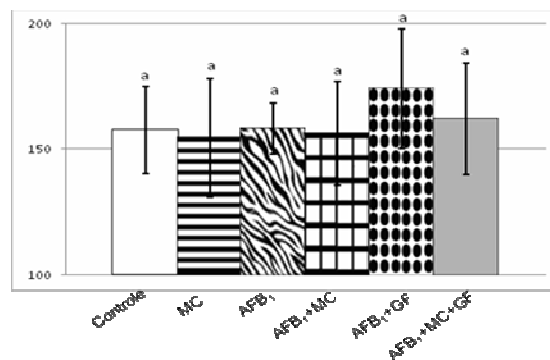
Os animais foram expostos as mesmas concentrações do início do experimento, em duas fases devido a falta de espaço físico. No primeiro dia foram simulados os tratamentos Controle, MC, GF e MC+GF. Após 24 hs foi feita a coleta de sangue, porém os peixes expostos a glifosato não sobreviveram à exposição por 24 hs na concentração utilizada (5 µL/L), devido a isso não foi possível obter dados para análise destes tratamentos. No segundo dia foram simulados os tratamentos AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>+MC, AFB<sub>1</sub>+GF e AFB<sub>1</sub>+MC+GF, sendo que a os animais entraram em contato com AFB<sub>1</sub> somente no período embrionário. Devido a mortalidade total dos animais expostos a GF do primeiro dia de experimento, a dose administrada aos tratamentos que continham o herbicida foi reduzido de 5 para 2 µL/L, resultando em nenhuma morte dos tratamentos em 24 horas de exposição estática.

Os resultados obtidos com o ensaio do cometa em eritrócitos de *O. niloticus* expostos à MC, GF e AFB<sub>1</sub> e seu respectivo controle negativo estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11:** Número de nucleóides observados em cada classe de cometa (0, 1, 2, 3) e média de nucleóides danificados por animal em eritrócitos de *Oreochomis niloticus* expostos a MC, GF e AFB<sub>1</sub> e controle negativo. Foram analisadas 100 células por animal.

TRATAMENTOS	Níveis de Danos				Score (Média ± SD)	Frequência de células danificadas (Mean ± SD)
	0	1	2	3		
Controle	15 ± 7,2	32.1 ± 5.6	33 ± 7.8	19.9 ± 3	157.7 ± 17.3	0.85 ± 0.07
MC	17.8 ± 7.7	28.4 ± 4.3	35.5 ± 6.5	18.6 ± 9	154.6 ± 23.4	0.82 ± 0.07
AFB <sub>1</sub>	11.83 ± 4	35 ± 2.6	36.3 ± 5.71	16.8 ± 4.87	158.2 ± 10	0.88 ± 0.04
AFB <sub>1</sub> +MC	11.3 ± 4.7	36.6 ± 10	36.9 ± 10.1	15.3 ± 5.4	156.1 ± 20.5	0.88 ± 0.04
AFB <sub>1</sub> +GF	8.5 ± 6.8	28.5 ± 6.5	43.5 ± 8.9	19.5 ± 5.8	174 ± 23.7	0.91 ± 0.06
AFB <sub>1</sub> +GF+MC	11.5 ± 4.92	33.9 ± 9.6	35.6 ± 5.5	19 ± 8.6	162.1 ± 22	0.88 ± 0.04

Os valores médios de escore foram calculados para os grupos experimentais e para o controle negativo. Os escores médios dos peixes expostos a MC, GF e AFB1 não foram estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que os valores obtidos para os animais expostos somente à água reconstituída (controle-negativo).



**Figura 12:** Os escores médios de cometa de *Oreochromis niloticus* exposta a MC, GF e AFB1.

É possível observar na tabela 11 e na Figura 12, que os tratamentos não diferiram entre si, no entanto também é possível observar que o escore para o tratamento controle encontra-se elevado. Vanzella *et al*,(2007) ao expor *Prochilodus lineatus* à fração hidrossolúvel de óleo diesel em por diferentes períodos de tempo (6, 24, 96 hs e 15 dias) pode observar diferenças significativas entre os tratamentos, no entanto, como a maioria dos outros trabalhos, o escore do controle negativo permaneceu ao redor de  $20 \pm$  desvio padrão. O escore médio do tratamento controle permaneceu ao redor de 157, mostrando que houve algum dano genético ou alguma falha na execução do procedimento.

Speit e Hartmann (1999) estabeleceram o protocolo para a execução do teste de cometa em eritrócitos de sangue periférico. No entanto para evitar o sacrifício dos animais o sangue foi extraído por punção cardíaca pois ainda se apresentavam em tamanho muito diminuto para se extrair o sangue da veia caudal sem o sacrifício. Porém Azevedo *et al*, (2006) ao descrever a hematologia da tilápia do Nilo, mostra

que existe algumas diferenças bioquímicas na composição do sangue na veia caudal e no coração. O sangue da veia caudal é sangue arterial advindo das brânquias e o sangue do coração é venoso advindo da maioria dos órgãos e com destinação às brânquias para troca gasosa e eliminação de compostos tóxicos. O sangue venoso de tilápia possui pH 7,3 enquanto o sangue arterial, pH 7,5. Em relação ao  $pCO_2$ , o sangue venoso possui 50mmHg e o arterial 30mmHg. Logo, para estudos posteriores, caso for necessário utilizar sangue retirado por punção cardíaca, adaptações bioquímicas devem ser feitas para garantir a confiabilidade do protocolo.

## Considerações finais

Os ensaios de exposição isolada e simultânea dos ovos de peixe a AFB<sub>1</sub>, Roundup® (glifosato) e microcistina (extrato celular do cultivo de *Microcystis* sp. TAC 95) não afetaram o tempo de eclosão.

O extrato celular de *Microcystis* sp. foi produzido e caracterizado por LC-MS/MS e a quantificação de MC's totais realizada por ic-ELISA. A caracterização por LC-MS/MS mostrou que o tipo mais provável de microcistina produzida pela cepa TAC95 é a MC-LR.

As rações fornecidas aos animais, reservados ao ensaio de genotoxicidade eram de boa qualidade, com alto nível proteico, energético e vitamínico (de acordo com fabricante) e com ausência de micotoxinas (aflatoxinas e fumonisinas) de acordo com a metodologia utilizada para as análises e seus respectivos limites de detecção.

Algumas larvas expostas aos contaminantes, apresentaram malformações como desvio da cauda, da coluna e megalocardia, no entanto a maioria das anormalidades, com exceção da megalocardia, foram reversíveis antes do 12<sup>o</sup> dia de tratamento. Apesar de causarem efeitos teratogênicos, os contaminantes não influenciaram na sobrevivência dos animais na fase de vida em questão, a fase de larva. Os animais reservados para os testes de genotoxicidade se desenvolveram normalmente com intensa heterogeneidade no tamanho, fato este devido à baixa densidade dos animais levando ao desenvolvimento de dominância.

Os ensaios de genotoxicidade não foram bem sucedidos, e não foi obtido resultado com grau de confiabilidade significativo para ser feito alguma dedução do experimento. Para utilização de sangue retirado por punção cardíaca, recomenda-se a adaptação da técnica do Cometa.

Recomenda-se a continuidade do estudo, estendendo-se a análise do efeito destes contaminantes em espécies com maior sensibilidade, já que a tilápia trata-se de peixe rústico e resistente, características desejáveis para a produção animal,

contrastando-se com as espécies destinadas ao programa de monitoramento ambiental.

## REFERÊNCIAS

ANTÓN, F. A.; LABORA, E.; DE ARIZ, M. Acute toxicity of the herbicide glyphosate to fish. **Chemosfere**, v. 82, p. 745-753, 1994.

ALBINATI, A. C. L., ; MOREIRA, E. L. T.; ALBINATI, R. C. B.; CARVALHO, J. V.; DE LIRA, A.D.; SANTOS, G. B.; VIDAL, L.V.O. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.3, p.621-627, 2009.

ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. A.; BOTHA, A.; ZYL, W. H. VAN. Degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by fungal laccase enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p.47-52, 2009.

ALCON. Alcon Colours. Disponível em <<http://www.labcon.com.br/peixesaquario/alimentos/peixestropicais/colour.htm>>. Acesso em Maio de 2009.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R. DOS; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ANTONIOU, M. G.; SHOEMAKER, J. A.; CRUZ, A. A. DE LA.; DIONYSIOU, D. D. LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO<sub>2</sub> photocatalysis of microcystin-LR. **Toxicon**, v. 51, p. 1103–1118, 2008.

APHA- Awwa Standart methods for the examination of water and wastewater. 21<sup>st</sup>ed. Washington D.C., 2005.

ARAGÃO, W. **Piscicultura brasileira**. Disponível em: <[tudoparana.globo.com/gazetadopovo/arquivo](http://tudoparana.globo.com/gazetadopovo/arquivo)>. Acesso em jun. 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 15088. **Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. 19 pgs, 2004.

BEATTIE, K. A., KAYAK, K., SANO, T., CODD, G. A. Three dehydrobutyryne (Dhb)-containing microcystins from the cyanobacterium *Nostoc* sp. **Phytochemistry**, v.47, n. 7, p. 1289-1292, 1998.

BECKER, A. G.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C.; LORO, V. L.; SANTOS, D. R.; REICHERT, J. M.; BALDISSEROTTO, B. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1734-1739, set. 2009.

BEST, J. H., PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., EDDY, F.B., METCALF, J. S., COOD, G. A. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v.60, p. 223-231, 2002.

BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. **Crop Protection**, v. 27, n. 2, p. 222-230, 2008.

BOLOGNESI, C. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1957-1962, 1997

BOTES, D.P., KRUGER, H., VILJOIN, C.C. Isolation and characterization of four toxins from the blue-green algae, *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v.20, p.945-954, 1982.

BOURRACHOT, S.; SIMON, O.; GILBIN, R.; The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v.1 p.29-36, 2008.

BRASIL, decreto nº 79.367, de 9 de março de 1977. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, mar. 2004.

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

CARMICHEL, W.W., Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, 72, 445-459. 1992

CONAMA, **Conselho Nacional do Meio ambiente**, RESOLUÇÃO CONAMA Nº 20, de 18 de junho de 1986/ D.O.U. de 30/7 /86, [www.agricultura.gov.br/dpa/decreto/resolucao020.htm](http://www.agricultura.gov.br/dpa/decreto/resolucao020.htm) Acesso em mar. 2002.

CONTARDO-JARA, V. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 57–63, 2009.

COSTA, D. A.; MONTEIRO, A. L.; OLIVEIRA-NETO, F. T.; RANTIN, A. L. K. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 153–163, 2008.

COSTA, M. L. da S.; MELO, F. P. de; CORREIA, E. de S. Efeitos de diferentes níveis protéicos da ração no crescimento na tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757), variedade chitralada, criadas em tanques-rede. **Boletim Do Instituto De Pesca**. v. 35, n. 2, p. 285-294, 2009.

DARVICH, J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M. S. Effect of herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. **Environmental Research**, v. 85, n. 3, p. 226-31, 2001.

DELERME, C. H.; EDERY, M.; HUET, H.; PUISEUX-DAO, S.; BERNARD, C. ; FONTAINE, J.-J. ; CRESPEAU, F. ; LUZE, A. DE. Microcystin-LR and embryo-larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. Effects on the digestive tract and associated systems. **Toxicol**, v. 46, n. 1, p. 16-23, 2005.

DINEHART, S. K.; SMITH, L. M.; MCMURRY, S. T.; ANDERSON, T. A.; SMITH, P. N.; HAUKOS, D. A. Toxicity of a glufosinate- and several glyphosate-

based herbicides to juvenile amphibians from the Southern High Plains, USA. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 1065 – 1071, 2009.

DJEDIAT, C.; MALÉCOT, M.; LUZE, A. DE; BERNARD, C.; PUISEUX-DAO, S.; EDERY, M. Localization of microcystin-LR in medaka fish tissues after cyanotoxin gavage. **Toxicon**, v. 55, p. 531-535, 2010.

EMATER – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. Piscicultura – Paraná. Disponível em [www.emater.gov.pr.br](http://www.emater.gov.pr.br). Acesso em jun. 2002.

ENVIRONMENT AGENCY. The determination of microcystin algal toxins in raw and treated waters by high performance liquid chromatography. In: **Methods for the Examination of Waters and Associated Materials**, UK. 1988.

EPPLEY, R.M. Screening method for Zearalenone, Aflatoxin and Ochratoxin. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.51, n.1, p.74-78, 1968.

ERICKSSON, J. E., GRONBERG, L., NYGARD, S., SLOTTE, J. P., MERILUOTO, J. A. O. Hepatocellular uptake of <sup>3</sup>H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1025, p. 60-66, 1990.

FANTA, E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S.; Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 119-130, 2003.

FAO. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary and Conclusions. **Food and Agriculture of the United Nation**. [www.fao.org](http://www.fao.org), Geneva, 6-15/02/ 2001.

FISCHER, W. J.; HITZFELD, B. C.; TENCALLA, F.; ERIKSSON, J. E.; MIKHAILOV, A.; DIETRICH, D. R. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicological Sciences**, v.54, p.365-373, 2000.

FRANCABANDIERA, A. I. **Genotoxicidade Subcrônica de Microcystis aeruginosa, Aflatoxina B1 e Herbicida à Base de Glifosato em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

GAETE, V.; CANELO, E.; LAGOS, N.; ZAMBRANO, F. Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. **Toxicon**, v. 32, n. 1, p. 121-127, jan. 1994,

GARCIA, B. O. **Toxicity of the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* strain 7820 to trout and tilapia: a clinical and histopathological study**. M. Sc. Thesis, University of Stirling, 1989.

GEORGE, J.; PRASAD, S.; MAHMOOD, Z.; SHUKLA, Y. **Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: A proteomic approach**. Journal of proteomics , IN PRESS, 2010.

GOLDSBOROUGH, L. G.; BECK, A. E. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 18, p. 537-544, 1989.

GONÇALVES, G. S.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; ROCHA, D. F.; KLEEMAN, G. K.; SANTA ROSA, M. J. Energia e nutrientes digestíveis de alimentos para a tilápia do nilo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 201-213, 2009.

GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U. T.; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (lyngb.) De reb. **International Association of Theoretical and Applied Limnology**, Proceedings, v. 15, p. 796-804, 1964.

GOURAMA, N., BULLERMAN, L.B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. **Journal of food protection**, v.58, n.12, p1395-1404, 1995.

GOVONI, J. J.; BOEHLERT, G. W.; WATANABE, Y. The physiology of digestion in fish larvae. **Environmental Biology of Fishes**, v.16, n. 1-3, p.59-77, 1986.

GOWEN, R. J. Managing eutrophication associated with aquaculture development. **Journal Applied Ichthyology**, v.10, p.245-257, 1994.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, v. 518, p. 145-150, 2002.

GÜRBAY, A.; SABUNCUOGLU, S. A.; GIRGIN, G.; SAHIN, G.; YIGIT, S.; YURDAKÖK, M.; TEKINALP, G. Exposure of newborns to aflatoxin M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> from mother's breast milk in Ankara, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p. 314-319, 2010.

HAFEZ, S.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7<sup>a</sup> Edição, São Paulo, Editora Manole, 2007.

HALVER, J. E. Aflatoxicosis and trout hepatoma. In: GOLDBLATT, L.A. (Ed). **Aflatoxin scientific background, control, and implications**. Academic Press, New York., p.265-306, 1969.

HAMLIN, H. J.; HUNT VON HERBING, I.; KLING, L. J. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. **Journal of Fish Biology**, n. 57, p. 716–732, 2000.

HARADA, K.-I.; OGAWA, K.; MATSUURA, K.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; WATANABE, M. F.; ITEZONO, Y.; NAKAYAMA, N. Structural determination of geometrical isomers of microcystin-LR and RR from cyanobacteria by two dimension NMR spectroscopic techniques. **Chemical Research Toxicology**, v.3 , p. 473-481. 1990.

HARADA, K.-I.; MURATA, H.; QIANG, Z.; SUZUKI, M.; KONDO, F. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. **Toxicon**, v. 34, p. 701-710, 1996.

HASHIMOTO, E.H., SANTOS, M.A., ONO, E.Y.S., HAYASHI, C., BRACARENSE, A.P.F.R.L., HIROOKA, E.Y. Bromatologia e contaminação com fumonisina e

aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da Região de Londrina, estado do Paraná, Brasil. **Semina. Ciências Agrárias**. V.24.n1. 123-134.2003.

HENDRICKS, J.D. Chemical carcinogenesis in fish. In Aquatic toxicology. Ed. WEBER, L.J. p.149-211. **Raven Press**. New York, 1982.

HERRCHEN, M.; KLEIN, W.; KLEIN, A. W. **Science of the Total Environment**, v. 2, 1689-1699, 1993.

HOOSER, S. B., BEASLEY, V. R., WAITE, L. L., KUKLENSCHMIDT, M. S., CARMICHAEL, W. W., HASHECK, W. M. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. **Veterinary Pathology**, v. 28, p. 259-266, 1991.

IARC Working Group on the Evaluation of carcinogenic risks to mans, v.56. Lyons; **International Agency for Research on cancer**, World Health Organisation. 1993.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Recursos pesqueiros**. Disponível em < <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/>>. Acesso em 26 fev. 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3 ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, v.1. 533p. 1985.

JANTRAROTAI W. LOVELL, R.T. Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B1 to Channel Catfish. **J. Aquatic animal health**, v.2, p.248-254, 1990.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.;KRUATRACHUE, M. et al. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v.28,p.121-127, 2002.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.;KRUATRACHUE, M. et al. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, v.18, p.260-267, 2003.

KAMOGAE, M.; HASHIMOTO, E. H.; MILLET, A. P.; FRANCBANDIERA, A. I.; PÁDUA, C. G. de ; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.

do C.; COLUS, I. M. de S.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; HARADA, K.-I.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Imunoistoquímica: detecção de microcistina em tilápia exposta ao extrato de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n.3, 2007.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 2.ed., 1997. 825p.

KOBAYASHI, H.; SUGUYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis, **MMS Commun.** v.3, p. 103–115, 1995.

KOLPIN, D. W.; THURMAN, E. M.; LEE, E. A.; MEYER, M. T.; FURLONG, E. T.; GLASSMEYER, S. T. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. **Science of the Total Environment**, v. 354, p. 191–197, 2006.

KONDO, F.; IKAI, Y.; OKA, H.; MATSUMOTO, H.; YAMADA, S.; ISHIKAWA, N.; TSUJI, K.; HARADA, K. I.; SHIMADA, T.; OSHIKATA, M.; SUZUKI, M. Reliable and sensitive method for determination of microcystin in complicated matrices by First-fast atom bombardment liquid chromatography/mass spectrometry. **Natural Toxins**, v.3, p.41-49, 1995.

KRISHNAMURTHY, T.; CARMICHAEL, W. W.; SARVER, E. W. Toxic peptides from cyanobacteria (blue green algae). Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. **Toxicon**, v. 24 p. 865–873, 1986.

LANGIANO, V.C. **Toxicidade do Roundup e seus efeitos para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

LAWTON, L. A.; EDWARDS, C., COOD G. A. Extraction and high-performance liquid, chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. **Analysis**, vol.119. 1994.

LeCLAIRE, R. D., PARKER, G. W., FRANZ, D. R. Hemodynamic and colorimetric changes induced by microcystin –LR in the rat. **Journal of Applied Toxicology**, v.15, n.4, p. 303-311, 1995.

LI, D.; LU, C.; WANG, J.; HU, W.; CAO, Z.; SUN, D.; XIA, H.; MA, X. Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 91, p.229–237,2009.

LOPES, P.R.S.; NETO, J.R.; MALLMANN, C.A.; LAZZARI, R.; PEDRON, F.A.; VEIVERBERG, C.A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n.10, p.1029-1034, 2005.

LUZ, R. K. Resistência ao estresse e crescimento de larvas de peixesneotropicais alimentadas com diferentes dietas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.1, p.65-72, jan. 2007.

MACIAS-SILVA, M., GARCIA-SAINZ, J. A. Inhibition of hormones-stimulated inositol phosphate production and disruption of cytoskeletal structure. Effects of okadaic acids, microcystin, chloroformazine, W7 and nystatin. **Toxicon**, v. 2, n. 1, p. 105-112, 1994.

MAGALHÃES, V. F.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. F. O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. **Toxicon**, v.39, n.7, p.1077-1085, 2001.

MALKONES, H. P. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities a review. **J. Plant Dis. Protect.**, v. 8, p. 781-789, 2000.

MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p.129-136, 1998.

MALYAVEUSKAYA, A.Y. Influence of anthropogenic eutrophication: effects on fish in the form of blue-green algae mass development. **Archives of Hydrobiology**, v. 97, p. 412-418, 1983.

MAÑAS, F.; PERALTA, L.; RAVIOLO, J.; OVANDO, H. G.; WEYERS, A.; UGNIA, L.; CID, M. G.; LARRIPA, I.; GORLA, N. Genotoxicity of Glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 37-41 Jul. 2009.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Departamento de Pesca e Aqüicultura** - DPA. Acesso em [www.agricultura.gov.br/dpa](http://www.agricultura.gov.br/dpa), 2002.

MAYUMI, T.; KATO, H.; IMANISHI, S.; KAWASAKI, Y.; HASEGAWA, M.; HARADA, K.-I. Structural Characterization of Microcystins by LC/MS/MS under Ion Trap Conditions. **The Journal of Antibiotics**, v. 59, p. 710–719, 2006.

MEDRI, V. **Modelagem e otimização de sistemas de lagoas de estabilização para tratamento de dejetos de suínos**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1997. 206 p. Tese de Doutorado.

MELETTI, P. C. **Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes**, 2003. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, São Carlos - SP.

MITCHEL, D. G.; CHAPMAN, P. M.; LONG, T. J. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, p. 1028-1035, 1987.

NAKAI, V. K.; ROCHA, L. DE O.; GONÇALEZ, E.; FONSECA, H.; ORTEGA, E. M. M.; CORRÊA, B. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 285-290, jan. 2008.

NASSEM, S. M., HINES, H. B., CREASIA, D. A., Inhibition of microcystin-induced release of cyclooxygenase products from rat hepatocytes by anti-inflammatory steroids. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.195, p. 345-399, 1990.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R. OHTA,T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **Journal Cancer Res, Clin. Oncol.**, v.118, p. 420-424, 1992.

NOVOA, B.; BOWMAN, T. V.; ZON, L.; FIGUERAS, A. LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, p. 326–331, 2009.

ONO, E.Y.S., KAWAMURA, O., ONO, M.A., UENO, Y., HIROOKA, E.Y., A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. **Food and Agricultural Immunology**, v. 12, n.1, p. 5-14, 2000.

OKAMURA, D; ARAÚJO, F. C.; LOGATO, P. V. R.; MURGAS, L. D. S.; FREITAS, R. T. F.; ARAÚJO, R. V. Efeito da vitamina C sobre o hematócrito e glicemia de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em transporte simulado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.4, p.883-888, 2007.

PÁDUA, H.B. Qualidade da água de aquicultura. **Aquicultura**. Disponível em [www.aquiculturafb.hpg.ig.com.br/qualidade.htm](http://www.aquiculturafb.hpg.ig.com.br/qualidade.htm) Acesso em junho de 2002.

PEREIRA NETO, J. B.; DANTAS, D. M. de M.; GÁLVEZ, A. O.; BRITO, L. O. Avaliação das comunidades planctônica e bentônica de microalgas em viveiros de camarão (*Litopenaeus vannamei*). **Boletim Do Instituto De Pesca**, v. 34, n. 4, p. 543-551, 2008.

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

PHILIPS, M.J.; ROBERTS, R.J.; STEWART, J.A.; CODD, G.A. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout, *Salmo gairdneri richardson*. **J. Fish. Dis.**, v. 8, p. 339-344, 1985.

PLAKAS, S. M. SAID, K. R. EL STEHLY, G. R. GINGERICH, W. H. E ALLEN J. L. Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Canadian Journal of Fishery and Aquatic Sciences**. P.1427–1433,1996.

POLEKSIC & MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R. & LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Fishing New Books, Cambridge. p.339-352.

PROENÇA, C.E.M. BITTENCOURT P.R.L. **Manual de piscicultura tropical** - IBAMA . Brasília,1994.

PURDIE, E.L., SAMSUDIN, S., EDDY, F.B., CODD, G.A. Effects of the cyanobacterial neurotoxin  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, on the earlylife stage development of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v.95, p.279-284, 2009.

RABERGH, C. M. I.; BYLUND, G.; ERIKSSON, J. E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquatic Toxicology**, v.20, p.131-145, 1991.

REYNOLDS, C.S., JAWORSKI, G.H.M., CMIECH, H.A. , LEEDALE, G.F. On the annual cycle of the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. Kütz Elekin. Proceedings and Philosophical Transaction of the Royal Society of London. **Biological Sciences**, v.293, n.1068, p.419-477, 1981.

RICHARDSON, M. L.; GANGOLLI, S. The dictionary of substances and their effects. **Royal Society of Chemistry**, p. 715-717, 1994.

RUNNERGAR, M. T. C. & FALCONER, I. R., Effects of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. **Toxicon**, v.24, p. 109-115, 1986.

SANINO, F., FILAZZOLA, M. T., VIOLANTE, A. Fate of herbicides influenced by biotic and abiotic interactions. **Chemosphere**, v. 39, p. 333-341, 1999.

SANTOS, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; FELIZARDO, N. N.; RODRIGUES, E. DE L. Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, n.30, v.2, p.141-145, 2004.

SANTOS, J. B. DOS ; FERREIRA, E. A.; KASUYA, M. C. M.; SILVA, A. A. DA; PROCÓPIO, S. DE O. Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. **Crop Protection**, n.24 p. 543–547, 2005.

SANTURIO, J. M.; BALDISSERA, M. A. & ALMEIDA, S. H. E. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinadas ao consumo animal no Sul do Brasil. In: **Anais do VII Encontro Nacional de Micotoxinas**, São Paulo, p. 14, 1992.

SARASQUETE, M. C.; POLO, A.; YDFERA, M. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. **Aquaculture**, n. 130, p. 79-92, 1995.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, p 75–86, 1997.

SEAP – Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. Disponível em [www.presidencia.gov.br/estrutura\\_presidencia/seap/](http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/). Acesso em Agosto de 2008.

SEKIJIMA, M., TSUTSUMI, T., YOSHIDA, T., TASHIRO, T. H. F., CHEN, G., YU S-Z. E UENO, Y. Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver

cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B<sub>1</sub>-initiated rats. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 1, p. 161-165, 1999.

SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLOM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Liquid Chromatography**, v.1, n.10, p.161-165, 1990.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** v. 175, p - 184–191, 1988.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single cell gel test) — a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair, in: D.S. Henderson (Ed.), *Methods in Molecular Biology* 113, **DNA-repair Protocols: Eucaryotic Systems**, Human Press Inc., Totowa, NY, , p. 203–212, 1999.

SINNHUBER, R.O., WALES, J.H. HENDRICKS, J.D., PUTNAM, G.B., NIXON, J.E. PAWLOWSKI, N.E. Trout bioassay of mycotoxins. In *Mycotoxins in Human and Animal Health* (RODRICKS, J.D., Ed.) **Pathotox**, Chicago, Ill, p 731-744, 1977.

SIQUEIRA, N. S.; RODRIGUES, L. Biomassa perifítica em tanques-rede de criação de tilápia do nilo - *Oreochromis niloticus* (Linneau, 1758). **Boletim Do Instituto De Pesca**. v. 35, n. 2, p. 181-190, 2009.

SIVONEN, K. e JONES, G. Cyanobacterial toxins, in *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, editado por Ingrid Chorus e Jamie Bartram, London, E & FN SPON, p. 41-91, 1999.

SMITH J.E. & MOSS, M.O. (ed). **Mycotoxins; formation, Analysis and Significance** .John Wiley & Sons Ltd. 148p. 1985.

SOARES, L.M.V. & RODRIGUES-AMAYA, D.B., Métodos p/ determinação simultânea de aflatoxina B e G, ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina. *Procedimento Operacional Padronizado - IAL*. 1996.

SOSO, A. B.; BARCELLOS, L. J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; SILVA, L. B. DA; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; FINCO, J. A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundi'á (*Rhamdia quelen*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 308–313, 2007.

SUGAYA, Y.; YASUNO, M.; YANAI, T. Effect of toxic *Microcystis viridis* and isolated toxins on gold fish. **Japanese Journal of Limnology**, v. 5, p. 149 -153, 1990.

TACHIBANA, L.; LEONARDO, A. F. G.; CORRÊA, C. F.; SAES, L. A. Densidade de estocagem de pós-larvas de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a fase de reversão sexual. **Boletim Do Instituto De Pesca**, V. 34, n. 4, p. 483-488, 2008.

TAKAHASHI, N. S. Ácido Graxos, 2005. Disponível em <[http://www.pesca.sp.gov.br/textos\\_tecnicos.php](http://www.pesca.sp.gov.br/textos_tecnicos.php)> . Acesso em 26 fev. 2010.

TAVARES, M. D.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Relação hepatossomática e esplenosomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 17, n.1, p. 273 - 281,2000.

TESSER, M. B. & PORTELLA, M. C. Ingestão de ração e comportamento de larvas de pacu em resposta a estímulos químicos e visuais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.1887-1892, 2006.

TREWAVAS, E. **Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia***. British Mus. Nat. Hist., London, UK. 1983.

TSUI, M. T. K.; WANG, W.-X.; CHU, L. M. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 59-68, 2005.

TSUJI, K.; NAITO, S.; KONDO, F.; ISHIKAWA, N.; WATANABE, M. F.; SUZUKI, M.; HARADA, K.-I. Stability of microcystins from cyanobacteria. Effect of light on decomposition and isomerization. **Envir. Sci. Technol.** v.28, p. 173–177, 1994

UENO Y.; AOYAMA, S., SUGIURA, Y.; WANG,D-S.; HIROOKA, E.Y.; HARA, S. KARKI, T., CHEN, G., YU, S-Z., A limited survey of fumonisin in corn-based products ins Asian countries. **Mycotoxin Research**, v.9, p.27-34, 1993.

U.S. EPA. Office of Pesticide Programs. **Details of the consultation for Department of State use of pesticide for coca eradication program in Columbia**,. Acesso em: [www.state.gov/g/inl/rls/rpt/aeicc/](http://www.state.gov/g/inl/rls/rpt/aeicc/). Aug., 2002.

WATANABE, M. M.; KAYA, K.; TAKAMURA, N. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of *Microcystis* (cyanobacteria) in hypertrophic lake. **J. Phycology**, v. 28, p. 761-767, 1992.

WESTERNHAGEN VON, H.; DETHLEFSEN, V.; CAMERON, P.; BERG, J.; FURSTENBERG, G. Developmental defects in pelagic fish embryos from the western Baltic. **Helgolander Meeresunters**, p. 13–36,1988.

WHO - Toxicological and intake monograph on aflatoxins - **World Health Organization – Food Additives Series**, n. 40, 1998. Disponível em <[www.who.int/fsf](http://www.who.int/fsf)>, acessado em junho, 2002.

WOGAN, G. N. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. **Cancer Res. Review** , Abril,1992.

WOYANAROVICH, E., HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. FAO/CNPq, Brasília, 1989.

Zaki, 1996, Disponível em: <<http://www-heb.pac.dfo-mpo.gc.ca/congress/1996/egg/zaki.pdf>> 06/01/2010

## Anexos

### Raço Alcon COLOURS® MEP 200 Complex

#### Níveis de Garantia:

Umidade (m.q.)	8 %
Proteína bruta (m.q.)	42 %
Extrato etéreo (m.q.)	5 %
Matéria fibrosa (m.q.)	6 %
Matéria mineral (m.q.)	15 %
Cálcio (m.q.)	5 %
Fósforo (m.q.)	0,7 %

#### Enriquecimento por kg de Produto:

Vitamina A	30.000 UI
Vitamina D3	5.000 UI
Vitamina E	83,3 mg
Vitamina K3	8,3 mg
Vitamina B1	6,7 mg
Vitamina B2	25 mg
Vitamina B6	6,7 mg
Vitamina B12	33,3 mcg
Niacina	116,7 mg
Pantotenato de cálcio	50 mg
Biotina	0,3 mg
Ácido fólico	2,5 mg
Colina	520 mg
Ferro	83,3 mg
Cobre	8,3 mg
Zinco	83,3 mg
Manganês	66,7 mg
Selênio	0,2 mg
Iodo	1,7 mg
Metionina	833,3 mg
Vitamina C estabilizada	250 mg

### Composição Básica do Produto:

Proteína texturizada de soja, farinha de peixe, farinha de trigo, camarão fresco, farinha de milho, farinha de algas marinhas, cenoura desidratada, espinafre desidratado, leveduras, óleo de soja refinado, spirulina, aditivo prebiótico, sal, aditivo enzimático, premix vitamínico mineral, astaxantina, corantes naturais, minerais orgânicos quelatados, vitamina C estabilizada, antioxidante. (ALCON, 2009)