



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANIÊ IEDA FRANCO BANDIERA

**GENOTOXICIDADE SUBCRÔNICA DE MICROCYSTIS
AERUGINOSA, AFLATOXINA B₁ E HERBICIDA À BASE DE
GLIFOSATO EM TILÁPIA DO NILO (OREOCHROMIS
NILOTICUS)**

Londrina
2007

ANIÊ IEDA FRANCOBANDIERA

**GENOTOXICIDADE SUBCRÔNICA DE MICROCYSTIS
AERUGINOSA, AFLATOXINA B₁ E HERBICIDA À BASE DE
GLIFOSATO EM TILÁPIA DO NILO (OREOCHROMIS
NILOTICUS)**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Londrina
2007

ANIÊ IEDA FRANCOBANDIERA

**GENOTOXICIDADE SUBCRÔNICA DE MICROCYSTIS
AERUGINOSA, AFLATOXINA B₁ E HERBICIDA À BASE DE
GLIFOSATO EM TILÁPIA DO NILO (OREOCHROMIS
NILOTICUS)**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Departamento de Ciência e Tecnologia de
Alimentos
CCA – UEL

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus
Departamento de Biologia Geral
CCB – UEL

Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
CCA – UEL

Londrina, 29 de junho de 2007.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela oportunidade de cursar o mestrado sob sua orientação, pelo incentivo e confiança.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, pela contribuição na formação acadêmica. Ao Prof. Dr. Fábio Yamashita, pela colaboração no delineamento e estatística experimental.

À Chefia e Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro.

À Fundação Araucária, FINEP, SIGEP e Fundo SETI pelo apoio financeiro.

*À Profa. Dra. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/Piracicaba, por disponibilizar os cultivos de *Microcystis aeruginosa*. À Selma, Bruna, Fabrício, Talita, Romeu, pelo auxílio durante a contagem de células e centrifugação dos cultivos.*

Ao Prof. Dr. Ken-Ichi Harada, da Universidade de Meijo do Japão, por disponibilizar equipamentos, materiais e reagentes para a realização da análise de microcistina.

A Mauro Caetano Filho, do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da UEL, por disponibilizar os animais, instalações, equipamentos, materiais e reagentes para a realização do experimento. A Heitor Frossard Santos, do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da UEL, pela contribuição com a análise de água. A Jurandir Batista, Waldemar Ferreira da Silva, Valdenir da Silva, pelo auxílio durante a execução do experimento.

À Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus, do Departamento de Biologia Geral da UEL, por disponibilizar equipamentos, materiais e reagentes para realização da análise do cometa. À Renata Matuo, Rodrigo, Ariane, Juliana, Mariana, Gustavo, José Pedro, Iara, Hellen, Fernando, Bruno, Roberta, Vivian Langiano, Tatiane, Dario, Melyssa, pelo auxílio durante a execução da análise.

À Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UEL, por disponibilizar equipamentos, materiais e reagentes para realização da análise histológica. À Cláudia, Luciana Takemura, Tiziane, Zé Carlos, Vagner, Ruan, Patrícia, Vinícius, Reginaldo, Bete, Zé Odivino, Ademir, pelo auxílio durante o processamento de amostras.

À Profa. Dra. Elisabete Y. Sataque Ono, do Departamento de Química da UEL, por disponibilizar equipamentos e materiais. À Elaine Moreno, Alexandre Morey e Nelson, pelo auxílio durante o preparo de materiais e reagentes e pela amizade.

À Elisabete Hiromi Hashimoto, pela contribuição com a análise de microcistina, colaboração em todas as etapas do mestrado e amizade.

À Ana Paula M. E. S. Trad, pela contribuição com a análise histológica, colaboração e amizade.

À Tatiana Perez Vanzela, pela colaboração nas análises de micronúcleo e cometa, auxílio durante o experimento e pela amizade.

À Cleiton Ramos e Tatiane de Oliveira pela colaboração nas coletas de amostras e processamento das análises de cometa, micronúcleo e histológica. À Letícia Schiavo e Jorge por auxiliarem na análise de micronúcleo. A todos pela amizade.

À Luciana Hayashi pelo incentivo, colaboração durante a rotina de trabalho e amizade.

Aos amigos do grupo de pesquisa, Patrícia Sambatti, Simoni Fujii, Ricardo, Adriana Pereira, Lu Bernd, Joice, Márcia Kamogae e Camila de Pádua, e a Cláudio Ueno, Luciane Yoshiara, Michele Rosset, Carol Calliari, pelo auxílio durante a rotina de trabalho e amizade.

À Marli, Berenice, Elza Youssef, Nelson, Alessandra, D. Marília, Célia, Alice, Rubens, pela colaboração.

Aos amigos de todas as cidades e instituições, Norma, Magali, Mery, Maíke, Rose, Renata, Suellen, Tati Rio, Mirian, Denão, Rafa, Carol Bernardi, Amanda, Quati, Lu Lobato, Ana Augusta, Vanessa Dias, Lyssa, Cristina, Elvis, Luiz, Mônica, Márcio Fejão, Mônica de Carvalho, Elisa Corbett, Kenji, Ju, Vavá, Tolentino, Joyce, Marcele, Alline, Rosângela,

Karyne, Letícia, Joaquina, Claudinei, Bruna, Verme, Márcio, Berabão, Lu Murai, Vivian, Roselene, Laila, Rodrigo e Paraca, pela presença e apoio.

Ao meu pai, Célio, e irmão, Girron, pelo auxílio na centrifugação do cultivo BCCUSP 262 e apoio. À minha mãe, Olga, e irmã, Clarissa, pelo apoio e incentivo. Aos meus familiares, Bete, Hideyuki, Vó Kiti, Lúcia, Osni, tio Choiti, Alessandra, Luca, Cris, Nicole, Tata e Breno, pelo apoio.

A Alexandre Oba, pela participação e colaboração em todas as etapas do mestrado, pelo apoio e companhia.

A todos que colaboraram afetiva e efetivamente para a realização deste trabalho.

A Deus, sempre.

A maior parte dos transtornos desta vida está dentro de nós mesmos.

Felizmente a solução para eles também está dentro nós.

Catecismo do Colégio de Santo Agostinho

FRANCABANDIERA, Aniê Ieda. **Genotoxicidade Subcrônica de *Microcystis aeruginosa*, Aflatoxina B₁ e Herbicida à Base de Glifosato em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).** 2007. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

No agronegócio brasileiro, a piscicultura se destaca como atividade em expansão, cujo êxito depende da qualidade da água e da alimentação. O manejo inadequado da ração, composta por grão susceptível à contaminação com aflatoxina B₁ (AFB₁), favorece a eutrofização da água, causando floração de cianobactérias, principalmente de *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistina (MC), uma hepatotóxina promotora de tumor. A zona agrícola também contribui na contaminação do ambiente aquático através da lixiviação de agrotóxicos utilizados na plantação, como Roundup[®] (glifosato). Considerando a co-exposição de peixe a estes contaminantes, avaliou-se a genotoxicidade subcrônica da associação entre AFB₁, *M. aeruginosa* linhagens BCCUSP 262 (produzindo MC-LR, -LF, -LW e 7-desmetil-MC-LR) e NPLJ 47 (somente MC-LR) e Roundup[®] em tilápia (*Oreochromis niloticus*) durante 185 dias (t₁₈₅). As tilápias (N=210) foram distribuídas em 7 tratamentos: CN - Controle, T1 - AFB₁ intraperitoneal (i.p.) (10 µg/kg) em t₀; T2 - BCCUSP 262 i.p. (1x10⁵ células/kg equivalente a 488x10⁻⁴ µg MC/kg) em t₆₂, t₁₁₆ e t₁₇₆; T3 - Roundup[®] (2,4 mg isopropilamina de glifosato/L) em três períodos: a) t₃₈, t₄₀, t₄₂, b) t₉₂, t₉₄, t₉₆, c) t₁₄₆, t₁₄₈, t₁₅₀; T4 - T2+T3; T5 - T1+T2+T3; T6 - T1+50% BCCUSP 262 com 50% NPLJ 47 i.p. (5x10⁴ células de cada linhagem/kg equivalente a 244,6x10⁻⁴ µg MC/kg)+T3. Amostras de sangue foram coletadas após 24 h de exposição a cada contaminante e analisadas pelo Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo. O CN apresentou escore médio de cometa elevado durante o experimento, provavelmente devido à alta densidade inicial (5,6 g/L), sendo esta comum em criação intensiva de peixe. Contudo, o CN apresentou predomínio de cometas classe 0 e 1, seguidos por frequência média de micronúcleo entre 0,3±0,5 a 1,2±1,6 em 2000 eritrócitos/animal. No período t₁, o tratamento T1 apresentou escore médio de cometa (76±16) e frequência média de micronúcleo (11,3±3,9) superiores ao CN (p<0,05), indicando a mutagenicidade da AFB₁. No período t₁₈, o tratamento T1 apresentou escore médio de cometa de 269±12, porém com frequência média de micronúcleo de 1,5±1,1, sugerindo genotoxicidade prolongada induzida por AFB₁. Os escores médios de cometa no período t₁₁₇, dos tratamentos T1 (177±36), T2 (181±40), T3 (222±28), T4 (178±33) e T6 (191±23) e, no período t₁₇₁, do tratamento T5 (147±24) foram superiores ao CN (p<0,05), indicando genotoxicidade induzida por exposição subcrônica à AFB₁, *M. aeruginosa* e Roundup[®]. No período t₉₇, as frequências médias de micronúcleo obtidas nos tratamentos T2 (5,2±2,2), T3 (3,7±1,9), T4 (3,8 ± 0,8) e T6 (6±2,1) também foram superiores ao CN (p<0,05), sugerindo o potencial mutagênico destes tratamentos em caráter subcrônico. Não houve diferença significativa entre tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6 ou interação entre AFB₁, *M. aeruginosa* e Roundup[®] em sangue de tilápia. No entanto, observou-se tendência de maior frequência de cometas classe 2 e 3 nos tratamentos com os três contaminantes (T4, T5 e T6) no período t₁₅₁. O fato sugeriu o perigo da co-exposição a estes contaminantes ambientais, devendo-se prosseguir o estudo com ensaios a médio e longo prazo, utilizando doses sub-letais próximas à faixa de contaminação natural.

Palavras-chave: Microcistina. Aflatoxina B₁. Glifosato. Genotoxicidade. Subcrônica. Tilápia.

FRANCABANDIERA, Aniê Ieda. **Subchronic Genotoxicity of *Microcystis aeruginosa*, Aflatoxin B₁ and Glyphosate Based Herbicide in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2007. 101f. Dissertation (Master's Degree Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

In Brazilian agribusiness, fish farming is an expanding activity with successful goal dependent on quality of water and feed. Feed is composed by grain susceptible to aflatoxin B₁ (AFB₁) contamination and inadequate feeding management enhances water eutrophication which causes cyanobacterial bloom, mainly of *Microcystis aeruginosa* able to produce microcystin (MC), a tumor promoting hepatotoxin. Agricultural region also contributes to aquatic environmental contamination by leaching of herbicides used in crops, as Roundup[®] (glyphosate). Considering the co-exposition of fish to these contaminants, the subchronic genotoxicity induced by association of AFB₁, *M. aeruginosa* BCCUSP 262 strain (producing MC-LR, -LF, -LW and 7-desmethyl-MC-LR) and NPLJ 47 strain (only MC-LR) and Roundup[®] were evaluated in tilapia (*Oreochromis niloticus*) during 185 days (t₁₈₅). Tilapias (N=210) were divided in 7 treatments: CN – control, T1 - AFB₁ intraperitoneal (i.p.) (10 µg/kg) at t₀; T2 - BCCUSP 262 i.p. (1x10⁵ cells/kg equivalent to 488x10⁻⁴ µg MC/kg) at t₆₂, t₁₁₆ and t₁₇₆; T3 - Roundup[®] (2.4 glyphosate isopropilammonium mg/L) at three periods: a) t₃₈, t₄₀, t₄₂, b) t₉₂, t₉₄, t₉₆, c) t₁₄₆, t₁₄₈, t₁₅₀; T4 - T2+T3, T5 - T1+T2+T3, T6 - T1+50% BCCUSP 262 with 50% NPLJ 47 i.p. (5x10⁴ cells of each strain/kg equivalent to 244,6x10⁻⁴ µg MC/kg)+T3. Blood samples were collected 24 h after each contaminant exposition followed by Comet Assay and Micronucleus Test. High comet scores were observed in CN throughout the experiment, probably due to high initial density (5.6 g/L), which is common in intensive fish farming. However, comet class 0 and 1 prevailed in CN followed by micronuclei frequency range of 0.3±0.5 to 1.2±1.6 in 2000 erythrocytes/animal. Comet score (76±16) and micronuclei frequency (11.3±3.9) at t₁ were higher in T1 treatment than in CN (p<0.05), indicating mutagenicity of AFB₁. At t₁₈ comet score in T1 treatment was 269±12, although micronuclei frequency was 1.5±1.1, suggesting prolonged genotoxicity induced by AFB₁. Comet scores in T1 (177±36), T2 (181±40), T3 (222±28), T4 (178±33) and T6 (191±23) treatments at t₁₁₇ and in T5 treatment (147±24) at t₁₇₁ were higher than in CN (p<0.05), indicating AFB₁, *M. aeruginosa* and Roundup[®] induced subchronic genotoxicity. Micronuclei frequencies at t₉₇ in T2 (5.2±2.2), T3 (3.7±1.9), T4 (3.8±0.8) and T6 (6±2.1) treatments were also higher than in CN (p<0.05), suggesting mutagenic potential of these treatments at subchronic profile. There was no significant difference among T1, T2, T3, T4, T5 and T6 treatments as well as AFB₁, *M. aeruginosa* and Roundup[®] interaction analyzed in tilapia blood. However, higher frequency trend of comet class 2 and 3 was observed in treatments using the three contaminants (T4, T5 and T6) at t₁₅₁. The data suggested the hazard of co-exposition to these environmental contaminants and further study should emphasize on long and medium term evaluation using sublethal dose nearby natural contamination range.

Keywords: Microcystin. Aflatoxin B₁. Glyphosate. Genotoxicity. Subchronic. Tilapia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de microcistina	21
Figura 2 – Reação de epoxidação da AFB ₁	26
Figura 3 – Biotransformação da AFB ₁	27
Figura 4 – Estrutura química de glifosato [N-(fosfometil)glicina].....	31
Figura 5 – Vias de degradação do glifosato.....	32
Figura 6 – Eritrócitos de sangue periférico de tilápia (<i>O. niloticus</i>) corados com Giemsa 5% em aumento de 1000x.	45
Figura 7 – Classes de cometa 0, 1, 2 e 3 em sangue periférico de tilápia (<i>O. niloticus</i>) corado com brometo de etídeo em aumento de 1000x.	48
Figura 8 – Delineamento experimental demonstrando esquema de exposição dos contaminantes em tilápia do Nilo	49
Figura 9 – Delineamento experimental demonstrando esquema da exposição dos contaminantes e da coleta de amostras	50
Figura 10 – Fluxograma referente à padronização das doses experimentais de AFB ₁ , <i>M. aeruginosa</i> e Roundup [®] para ensaio subcrônico com <i>O. niloticus</i>	58
Figura 11 – Concentração de MC em água contaminada com extrato celular de <i>M. aeruginosa</i> BCCUSP 262 e monitorada por IC-ELISA durante 7 dias.....	59
Figura 12 – Espectro de massa para caracterização de MC produzida pelos cultivos liofilizados de <i>M. aeruginosa</i> BCCUSP 262 (A) e NPLJ 47 (B) utilizando <i>ESI-LCMS</i>	61
Figura 13 – Escores Médios de Cometa obtidos após análise de 600 nucleóides por tratamento no Ensaio Cometa em sangue de tilápia exposta à AFB ₁ , Roundup [®] e <i>M. aeruginosa</i>	74
Figura 14 – Frequências relativas de classes de cometa obtidas após análise de 600 nucleóides por tratamento no Ensaio Cometa em sangue de tilápia exposta à AFB ₁ , Roundup [®] e <i>M. aeruginosa</i>	75

Figura 15 – Frequências médias de micronúcleo obtidas após análise de 2000 eritrócitos por animal no Teste do Micronúcleo em sangue de tilápia exposta à AFB₁, Roundup[®] e *M. aeruginosa* 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Escore médio de cometa obtido após análise de 100 nucleóides por animal para definição da dose i.p. de aflatoxina B ₁ em tilápia.....	59
Tabela 2 –	Escore médio de cometa obtido após análise de 100 nucleóides por animal para definição da dose i.p. de <i>M. aeruginosa</i> BCCUSP 262 em tilápia	59
Tabela 3 –	MC produzida por <i>M. aeruginosa</i> BCCUSP 262 e NPLJ 47	60
Tabela 4 –	Teste preliminar de mortalidade devido à exposição ao Roundup [®] em tilápia	60
Tabela 5 –	Parâmetros físico-químicos da água dos tanques durante período experimental	71
Tabela 6 –	Parâmetros físico-químicos de água em três pesqueiros da região de Londrina-PR, durante monitoramento realizado no período de 2002 a 2003	71
Tabela 7 –	Escores Médios de Cometa obtidos após análise de 600 nucleóides por tratamento no Ensaio Cometa em sangue de tilápia exposta à AFB ₁ , Roundup [®] e <i>M. aeruginosa</i>	72
Tabela 8 –	Frequências Médias de Micronúcleo obtidas após análise de 2000 eritrócitos por animal no Teste do Micronúcleo em sangue de tilápia exposta à AFB ₁ , Roundup [®] e <i>M. aeruginosa</i>	73
Tabela 9 –	Análise histológica em fígado de tilápia exposta à <i>M. aeruginosa</i> BCCUSP 262 no período t ₇₇	80
Tabela 10 –	Peso médio de tilápia exposta em ensaio subcrônico à AFB ₁ , Roundup [®] e <i>M. aeruginosa</i>	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem	p.c.	Peso Corporal
AF	Aflatoxina B ₁	PF1	Proteína Fosfatase 1
AFB₁	Aflatoxina B ₁	PF2A	Proteína Fosfatase 2A
AFB₂	Aflatoxina B ₂	POEA	Polioxi-etileno Amina
AFG₁	Aflatoxina G ₁	R	Roundup Original [®]
AFG₂	Aflatoxina G ₂	RNA	Ácido Ribonucléico
AFL	Aflatoxicol	rpm	Rotações por Minuto
AFM₁	Aflatoxina M ₁	RR	<i>Roundup Ready</i> [®]
AFP₁	Aflatoxina P ₁	seg	Segundo (s)
AFQ₁	Aflatoxina Q ₁	T	Tratamento
AMPA	Ácido Aminometilfosfônico	t	Tempo (dia)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada	UV	Ultravioleta
céls	Células	V	Volts
CN	Controle Negativo	VMP	Valor Máximo Permitido
CYP 450	Citocromo P450	µg	Micrograma
DNA	Ácido Desoxirribonucléico	µL	Microlitro
ESI-LCMS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa com <i>Electron Spray Ionization</i>	µm	Micrômetro
ex.	Exemplo		
g	Grama		
GR	Resistente ao Glifosato		
GST	Glutathione S-Transferase		
GST-P	Glutathione S-transferase placentar		
h	Hora(s)		
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Precisão		
i.e.	Isto é		
i.p.	Intraperitoneal		
IC-ELISA	Ensaio Imunoenzimático Competitivo Indireto		
IDA	Ingestão Diária Aceitável		
kg	Quilograma		
km	Quilômetros		
kV	Quilovolt		
L	Litro		
LMA	Limite Máximo Aceitável		
LMR	Limite Máximo de Resíduo		
LPS	Lipopolissacarídeos		
m	Metros		
M262	<i>Microcystis aeruginosa</i> BCCUSP 262		
M47	<i>Microcystis aeruginosa</i> NPLJ 47		
MC (s)	Microcistina (s)		
mg	Miligrama		
min	Minuto(s)		
mL	Mililitro		
MN (s)	Micronúcleo (s)		
n.d.	Não Detectável		
nm	Nanômetro		
°C	Graus Celsius		

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A AQUICULTURA BRASILEIRA	17
2.2 FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS NA PISCICULTURA	19
2.3 MICROCISTINA	20
2.4 MECANISMO DE TOXICIDADE DA MICROSCISTINA	22
2.6 TOXIDADE DA MICROCISTINA	23
2.7 CONTAMINAÇÃO DE RAÇÃO COM AFLOTOXINA	24
2.8 AFLATOXINA B ₁	26
2.9 MECANISMO DE TOXIDADE DA AFLATOXINA B ₁	28
2.10 TOXICIDADE DA AFLATOXINA B ₁	30
2.12 ASSOCIAÇÃO INICIADOR – PROMOTOR DE CARCINOGENESE	30
2.13 HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO	31
2.15 MECANISMO DE TOXICIDADE DO GLIFOSATO	34
2.16 TOXICIDADE DO GLIFOSATO	34
2.17 MONITORAMENTO DE GENOTOXICIDADE AQUÁTICA	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 BIOENSAIO	39
4.1.1 Local e Instalação Experimental	39
4.1.2 Animal Experimental e Manejo	39
4.1.3 Período Experimental	40
4.2 MATERIAIS UTILIZADOS NOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS	40
4.2.1 Aflatoxina B ₁	40

4.2.2 <i>Microcystis aeruginosa</i>	41
4.2.2.1 Extração e determinação de microcistina	42
4.2.3 Roundup [®]	43
4.3 TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS	43
4.4 COLETA DE SANGUE	44
4.5 COLETA DE TECIEDO	44
4.7 TESTE DO MICRONÚCLEO	45
4.8 ENSAIOS DE COLETA (SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS).....	46
4.9 PROCESSAMENTO DE MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA	47
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
Capítulo 1 – Determinação de dose, tempo e animal experimental para bioensaio de associação aflatoxina B ₁ — Roundup [®] — <i>Microcystis aeruginosa</i>	52
Capítulo 2 – Genotoxicidade subcrônica induzida por <i>Microcystis aeruginosa</i> , aflatoxina B ₁ e Roundup [®] em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	62
Nota de Pesquisa – Histopatologia em tecido hepático de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) exposta a <i>Microcystis aeruginosa</i> BCCUSP 262	77
6 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A sociedade moderna tem buscado por alimentos considerados seguros, isto é, que não oferecem qualquer risco à saúde. Logo, tem se exigido maior rigor nos mecanismos de controle e fiscalização da cadeia produtiva de alimentos, visando prevenir ou diminuir o risco de contaminação, decorrente de causa natural ou antropogênica, em especial de ingredientes primários, representados por grãos, frutas, hortaliças e água.

A contaminação de gêneros alimentícios por fungos produtores de toxina é comum e atinge principalmente grãos, constituintes básicos da alimentação humana e animal. As aflatoxinas são metabólitos secundários de fungos do gênero *Aspergillus*, caracterizadas por efeito hepatotóxico, mutagênico, carcinogênico e teratogênico. A aflatoxina B₁ é a de maior ocorrência e poder toxigênico, classificada como cancerígeno primário e relacionada com a etiologia do câncer hepático no homem.

O despejo de resíduos provenientes de centros urbanos, industriais e áreas agrícolas em rios e lagos ocasiona o enriquecimento artificial do ambiente aquático e, conseqüentemente, favorece a proliferação de cianobactérias, conhecida como floração. Em ambiente eutrofizado, desenvolve-se predominantemente *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistina, uma potente hepatotoxina com atividade promotora de tumor hepático.

A região agrícola também contribui com a contaminação do ambiente aquático, através da lixiviação de agrotóxicos utilizados em plantações. Entre estes se destaca o herbicida à base de glifosato (Roundup[®]), que tem gerado preocupação em decorrência do uso aumentado em cultura de soja tolerante ao glifosato. Embora estudos demonstrem que o Roundup[®] seja seguro ao ambiente e ao homem, outros apresentam evidências de que herbicidas à base de glifosato interferem na regulação do ciclo celular, mecanismo básico que gerencia o crescimento e desenvolvimento dos seres vivos.

Diante destes fatos, percebe-se a grandiosidade do número de agentes potencialmente tóxicos aos quais os indivíduos estão constantemente expostos e a necessidade de se avaliar a toxicidade da associação entre estas substâncias a médio e longo prazo. Dentre os animais mais prováveis de co-exposição à aflatoxina B₁, *Microcystis aeruginosa* e glifosato estão

os peixes criados em cativeiro, que constituem excelente fonte proteica para a alimentação humana.

No sistema de piscicultura intensiva, destaca-se a criação de tilápia do Nilo por abranger características desejáveis, como rusticidade, adaptação ao manejo, resistência a doenças e alta densidade de animais, além de adequar-se à indústria de filetagem. A tilapicultura é uma atividade econômica em expansão no território nacional, sendo necessária a adoção de medidas de controle e monitoramento da saúde do pescado para garantir altos padrões de produção e comercialização.

Portanto, este trabalho considerou a alta probabilidade da co-exposição de peixes à aflatoxina B₁ (oriunda de ingredientes contaminados que compõem a ração), microcistina (devido à eutrofização na piscicultura causada pelo arraçoamento em excesso e lixiviação de fertilizantes agrícolas), bem como a resíduo de herbicida à base de glifosato (amplamente vinculado à produção agrícola), tendo como objetivo avaliar o efeito tóxico da exposição subcrônica da aflatoxina B₁, *Microcystis aeruginosa* toxigênica e Roundup® em tilápia do Nilo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A AQUICULTURA BRASILEIRA

O Brasil reúne condições extremamente propícias à aquicultura. O território é constituído por 8.400 km de costa marítima, 5.500.000 hectares de reservatórios de água doce (aproximadamente 12% da água doce disponível no planeta), clima favorável para o crescimento de organismos aquáticos, grande disponibilidade de grãos para fabricação de ração, mão de obra abundante e crescente demanda por pescado no mercado interno (CAMARGO; POUHEY, 2005; SEAP, 2007). O Brasil é considerado um dos países de maior potencial para o desenvolvimento do setor e configura como o quarto de maior taxa de crescimento anual da aquicultura. Comparando-se a taxa de crescimento da aquicultura com a de outros setores brasileiros produtores de proteína, entre 1990 e 2003, obteve-se taxa anual média de 23,3% para a aquicultura, frente às taxas de crescimento do setor de aves (10%), bovinos (4%), suínos (7,9%) e soja (8,6%). A aquicultura atualmente representa 5 % da produção animal nacional (DIDAQ, 2007).

De acordo com a Estatística da Pesca de 2005 realizada pelo IBAMA (2007), a região sul apresenta a maior produção aquícola continental (32,9%), representada principalmente por peixes de água doce, sendo seguida pelo nordeste (19,6%). No Rio Grande do Sul predomina o cultivo de carpa; em Santa Catarina, de carpa e tilápia; e no Paraná, de tilápia (EMBRAPA, 2002). Atualmente, o Paraná possui cerca de 22 mil propriedades responsáveis pela produção de 13,3 mil toneladas de tilápia ao ano, sendo a região Oeste do Estado produtora de 8,3 mil toneladas, a Norte, de 3,29 mil e a Sul, de 1,08 mil tonelada (AEN, 2005).

A tilápia, principalmente a tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), é o segundo grupo de peixes de água doce mais cultivado no mundo, ficando atrás apenas da carpa (LOVSHIN, 1997). No Brasil, acredita-se que metade da produção anual de peixes cultivados seja de tilápias (LOVSHIN; CYRINO, 1998). O destaque alcançado pela tilápia do Nilo (*O. niloticus*) advém de características como rusticidade, resistência a doenças, crescimento rápido, adaptação ao confinamento, hábito alimentar onívoro (HAYASHI, 1995), além de apresentar

resistência à alta temperatura, baixa concentração de oxigênio dissolvido, alta concentração de amônia na água e alta densidade em sistema intensivo de criação (POPMA; PHELPS, 1998). Sobressai-se também por adequar-se à indústria de filetagem, devido à ausência de espinhos musculares em “Y”, ter ótima aceitação no mercado consumidor e mostrar-se bastante apreciada nos pesque-pagues (MEURER et al., 2003).

As características da água relevantes para a produção intensiva de tilápia incluem o oxigênio dissolvido (crítico <2 mg/L, ideal >6 mg/L), temperatura (crítico em extremos 10 e 35°C, ideal entre 28-32°C), amônia (crítico >15 mg/L, ideal <3 mg/L), nitrito (crítico >5 mg/L, ideal <1 mg/L), entre outros (BEVERIDGE; McANDREW, 2000). A densidade animal em criação intensiva de tilápia do Nilo é bastante variável, relatando-se de 20 a 80 peixes/m³ (CASTAGNOLLI, 1992), 25 a 100 kg/m³ (BEVERIDGE; McANDREW, 2000) até 60 a 200 kg/m³ (MAEDA et al., 2006).

O interesse pelo cultivo da tilápia do Nilo no sul e sudoeste do país cresceu rapidamente nos últimos anos, devido à introdução da tecnologia de reversão sexual e da pesca esportiva, representada pelos pesque-pagues (BOSCOLO et al., 2001). Calcula-se que na região Centro-Sul do país, mais de 80% dos peixes de água doce cultivados são comprados pelos pesque-pagues (MAPA, 2007). O sucesso econômico da atividade é diretamente relacionado à qualidade da água (CASTAGNOLLI, 1992), cujas características variam em função da fonte de abastecimento de água e do manejo alimentar (PÁDUA, 2002).

A qualidade da água e efluentes, bem como as condições sanitárias do sistema de criação, constituem atualmente uma das maiores preocupações do setor aquícola. Em decorrência da expansão do setor, a poluição das águas causada por efluentes da aquicultura caracteriza-se como um dos principais problemas ambientais encontrados no ecossistema aquático. Desta forma, o setor produtivo tem buscado por sistemas sustentáveis de gestão, visando assegurar a preservação do meio ambiente e garantir a competitividade no mercado internacional (MAPA, 2007).

2.2 FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS NA PISCICULTURA

A piscicultura é uma das práticas mais significativas da eutrofização do sistema aquático, representada pelo enriquecimento com nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio (PÁDUA, 2002; MERCANTE et al., 2005). A entrada excessiva de nutrientes, através do manejo inadequado de fertilizantes químicos (ricos em amônia e nitrato) e da constante adição de ração e ceva em pesque-pagues (PAERL; TUCKER, 1995; MERCANTE et al., 2005), favorece o crescimento acelerado de cianobactérias fixadoras de nitrogênio, conhecido como *bloom*, florescimento ou floração (CARMICHAEL, 1996; CHORUS; BARTRAM, 1999).

Xavier et al. (1991) notificaram a ocorrência de floração de *Euglena sanguinea* Ehrenberg em tanques de criação de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) adubados com excrementos de aves e suínos e fertilizante químico. Eler et al. (2001) relacionaram a mortalidade de peixes em pesque-pague, de Descalvado – SP, à floração de *Anabaena spiroides* Kleb 1985 e *Microcystis aeruginosa* (Kutzing) Kutzing 1846. Pádua (2002) e Kamogae et al. (2006) relataram a ocorrência de microcistina (MC), toxina produzida por florações de cianobactérias, em amostras de água provenientes de pesqueiros da região de Londrina-PR e de represas de abastecimento de água no Paraná (Itaipu, Capivara e Três - Bocas), respectivamente.

A ocorrência de florações de cianobactérias em viveiros é extremamente desfavorável, podendo transmitir compostos odoríferos aos animais (PAERL; TUCKER, 1995) e levar à redução do crescimento dos peixes (LI et al., 2004). Pode ainda provocar a morte dos animais devido a inúmeros fatores, como a formação de mucilagem, que pode aderir às brânquias e causar asfixia (XAVIER et al., 1991), a redução do oxigênio dissolvido em virtude da respiração noturna ou da senescência e morte de cianobactérias (MOHAMED e HUSSEIN, 2006), e a produção de toxinas (WATANABE et al., 1996; TAVARES, 2000; SOARES et al., 2004).

Cianobactérias são capazes de produzir ampla variedade de toxinas, incluindo neurotoxinas, citotoxinas, hepatotoxinas, como a microcistina, e endotoxinas, como os lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular (BEST et al., 2003). LPS são componentes característicos de bactérias Gram-negativas, formados por polissacarídeos e lipídeo A, sendo este último o responsável pela toxicidade da estrutura (WATANABE et al., 1996). LPS são agentes tóxicos, pirogênicos, alergênicos, irritantes da mucosa gastrointestinal e altamente inflamatórios

(HUISMAN et al., 2005), sendo os LPS de cianobactérias geralmente menos tóxicos que os de bactérias Gram-negativas patogênicas, como a *Salmonella* spp. (CHORUS; BARTRAM, 1999).

2.3 MICROCISTINA

Microcistinas (MCs) consistem de metabólitos secundários tóxicos produzidos por cianobactérias, representadas por *Anabaena* spp., *Nostoc* spp., *Oscillatoria* spp., *Anabaenopsis* spp., *Hapalosiphon* spp. e *Microcystis* spp., sendo o último gênero mais comumente associado aos casos de intoxicação animal e humana (CARMICHAEL, 1996). Entre as espécies de *Microcystis*, destaca-se a *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistina, potente hepatotóxica com atividade promotora de tumor (NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992). A produção de MCs ocorre durante a formação da floração, caracterizada por intensa proliferação de cianobactérias em corpos d'água, favorecida pelo aumento de luminosidade e temperatura aliada à eutrofização antropogênica, advinda de atividades agrícolas, industriais e domésticas (REYNOLDS et al., 1981).

MCs classificam-se como heptapeptídeos monocíclicos compostos por cinco aminoácidos, comuns a todas as variantes, e dois L-aminoácidos variáveis, que designam o nome da variante de MC. Sua estrutura pode ser representada por ciclo (D -Ala- L -**X**-eritro- β -metil- D -isoAsp- L -**Y**-Adda- D -isoGlu-Mdha), onde **X** e **Y** referem-se aos dois aminoácidos variáveis; Adda refere-se ao ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico e Mdha, ao *N*-metildeidro-Alanina (CHORUS; BARTRAM, 1999) (figura 1). Até o momento, foram catalogadas 80 variantes de MC (SONG et al., 1998), sendo a mais freqüente a microcistina-LR (MC-LR), caracterizada por leucina (L) e arginina (R) na posição **X** e **Y**, respectivamente (FALCONER; HUMPAGE, 2005).

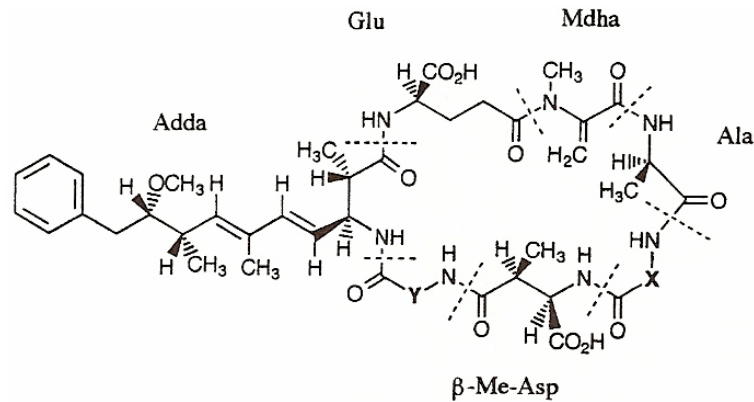


Figura 1 – Estrutura química de microcistina

A exposição a MCs pode ocorrer por inalação, via dérmica, intravenosa (diálise) e, principalmente, via oral, através da ingestão de água contaminada ou de animais aquáticos que acumularam a toxina em seus tecidos (MAGALHÃES et al., 2001). As células de cianobactérias são lisadas no estômago, liberando MC no lúmen intestinal (FALCONER, 1993). Dificilmente as cianotoxinas são ingeridas pelo homem em quantidade suficiente para provocar a morte, sendo os danos provavelmente atribuídos à exposição freqüente a longo prazo (MAGALHÃES et al., 2003). Em peixes, a principal via de exposição ocorre por ingestão de células de cianobactérias tóxicas ou através da exposição à toxina liberada durante a lise celular de cianobactérias (CARBIS et al., 1997; MOHAMED e HUSSEIN, 2006).

A Ingestão Diária Aceitável (IDA) de MC-LR foi estabelecida em 0,04 µg/kg p.c. (CHORUS; BARTRAM, 1999), baseada em experimentos de toxicidade oral em nível subcrônico com suínos (FALCONER et al., 1994). A partir deste valor, estipulou-se o Limite Máximo Aceitável (LMA) de MC em 1 µg/L em água para consumo humano (WHO, 1993). O limite de MC (1 µg/L de água) é adotado pela legislação vigente na grande maioria dos países, inclusive no Brasil, conforme a Portaria nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000 da FUNASA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

2.4 MECANISMO DE TOXICIDADE DA MICROCISTINA

A MC chega ao hepatócito por meio de receptores de ácidos biliares (RUNNEGAR et al., 1981; ERIKSSON et al., 1990; FALCONER, 1991) e promove a desorganização de filamentos intermediários e filamentos de actina, que são polímeros protéicos componentes do citoesqueleto (RUNNEGAR; FALCONER, 1986). Esta desorganização leva à retração dos hepatócitos, provocando a perda de contato entre estes e as células que formam os capilares sinusoidais. Como consequência, o fígado perde sua arquitetura e desenvolve graves lesões internas. A perda de contato entre células cria espaços internos, que são preenchidos por sangue, o qual passa a fluir dos capilares para esses locais (HOOSER et al., 1991; CARMICHAEL, 1994; LAMBERT et al., 1994).

O mecanismo de toxicidade da MC envolve a inibição específica da atividade das proteínas serina/treonina fosfatases 1 (PF1) e 2A (PF2A) de células eucariontes, provocando subsequente acúmulo de fosfoproteínas, perda da integridade do citoesqueleto e apoptose, principalmente em hepatócitos (MACKINTOSH et al., 1990; MATSUHIMA et al., 1990; YOSHIZAWA et al., 1990; GOLDBERG et al., 1995; FUJIKI et al., 1996). Acredita-se ser este o provável mecanismo envolvido na atividade promotora de tumor hepático (NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992).

O aminoácido Mdha da MC é capaz de se ligar covalentemente ao sítio catalítico da PF1 e PF2A (ZHANG et al., 1993; MACKINTOSH et al., 1995), porém a inativação efetiva requer a introdução do grupamento Adda da MC na cavidade hidrofóbica do sítio catalítico da PF (GOLDBERG et al., 1995). Portanto, o aminoácido Adda é responsável pela atividade biológica da molécula (HARADA et al., 1990; NISHIWAKI-MATUSUSHIMA et al., 1992). A detoxicação da MC pode ocorrer por conjugação com glutatona, através da enzima glutatona S-transferase (GST) e excreção biliar (MOHAMED; HUSSEIN, 2006).

2.6 TOXICIDADE DA MICROCISTINA

As primeiras evidências da correlação de MCs com o desenvolvimento de hepatocarcinoma humano foram relatadas em estudos epidemiológicos realizados na China, onde descobriu-se que a mortalidade por hepatocarcinoma era superior nos indivíduos que consumiam água de valas e açudes (com maior probabilidade de ocorrência de florações). A substituição da água de abastecimento por poços artesianos reduziu a taxa de mortalidade por hepatocarcinoma, sugerindo provável relação da doença com a contaminação da água com MCs (YU, 1989; YU, 1995).

O primeiro caso confirmado de morte humana em consequência da exposição intravenosa à MC ocorreu em 1996, em Caruaru – Pernambuco, através do uso de água contaminada com MC em centro de hemodiálise, onde 130 pacientes renais crônicos desenvolveram insuficiência hepática aguda após o tratamento, seguida do óbito de 76 pacientes (JOCHIMSEN et al., 1998; CARMICHAEL et al., 2001).

No Brasil, os problemas associados ao desenvolvimento de cianobactérias têm aumentado, principalmente em áreas de grande contingente populacional, onde se observa eutrofização do ecossistema aquático (MAGALHÃES et al., 2001; SOARES et al., 2004). Mais recentemente, em 2007 no Rio de Janeiro, noticiou-se a proibição da pesca e venda de pescado no complexo lagunar da Barra da Tijuca, em decorrência da contaminação da água com MC, produzida por *M. aeruginosa*, em concentração 6 vezes acima do limite aceitável (1 µg/L). Nas vísceras e carne de tilápia, a concentração de MC ultrapassou 0,06 µg/kg (O GLOBO, 2007).

A morte de vertebrados decorre geralmente dos danos hepáticos, que podem ser representados por desorganização do citoesqueleto, edema celular, peroxidação lipídica, perda de integridade da membrana, alterações do DNA, apoptose, necrose e hemorragia intrahepática (FISCHER; DIETRICH, 2000; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005). Em peixes, a morte é atribuída preferencialmente à necrose hepática provocada pela MC, diferindo-se da hemorragia intrahepática e, subsequente, choque hipovolêmico comum em mamíferos (TENCALLA et al., 1994).

A atividade genotóxica induzida por extrato de cianobactéria contendo MC-LR, obtido de floração dominada por *M. aeruginosa* (>90%), foi demonstrada por Ding et al. (1999)

através do ensaio cometa em cultivo de hepatócitos de rato e do teste do micronúcleo em eritrócitos de camundongo. O teste de mutagenicidade da *Salmonella* (Teste de Ames) indicou atividade mutagênica induzida pelo extrato celular, mas não pela MC-LR purificada, o que sugere a participação de outras toxinas, além da MC-LR, na mutagenicidade observada (DING et al., 1999).

Estudos demonstram o acúmulo de MCs em tecidos, incluindo fígado e músculo, de mamíferos (FALCONER et al., 1994) e organismos aquáticos (FISCHER; DIETRICH, 2000; MAGALHÃES et al., 2001; MAGALHÃES et al., 2003; LI et al., 2004). Portanto, sugere-se que a MC possa atingir níveis tróficos superiores, através do consumo de animais contaminados, podendo estar presente na dieta humana.

2.7 CONTAMINAÇÃO DE RAÇÃO COM AFLATOXINA

A expansão da piscicultura no Brasil tem sido relacionada ao crescimento acentuado do número de pesque-pagues, ao surgimento de indústrias de processamento e à grande demanda por alevinos e ração, estes sendo considerados os principais elementos de custo da atividade (CARNEIRO et al., 1999).

A ocorrência de aflatoxina na ração animal e suas matérias-primas tem sido relatada mundialmente (KICHOU; WALSER, 1993; RAMOS; HERNÁNDEZ, 1997; SCUDAMORE et al., 1997; MADHUSUDHANAN et al., 2004). Entre os produtos agrícolas com maior risco de contaminação por aflatoxina distinguem-se os grãos, como amendoim, milho, trigo e arroz, componentes da maioria das rações para animais, assim como da dieta humana (RODRÍGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002).

A contaminação de alimentos com aflatoxina varia em função das características intrínsecas ao alimento, do armazenamento do produto e das condições ambientais, principalmente umidade relativa e temperatura (HUSSEIN; BRASEL, 2001). A aflatoxina é termoestável e mantém a toxicidade mesmo após o processo de peletização de rações (FERREIRA et al., 2006).

A contaminação da ração com aflatoxina B₁ (AFB₁) pode acarretar em perdas econômicas durante a criação de peixes, conforme experimento conduzido por Lopes et al. (2005) demonstrando que peixes alimentados com dieta contendo AFB₁ apresentaram menor ganho de peso e comprimento e pior conversão alimentar. A AFB₁ também possui atividade imunossupressora, favorecendo o aparecimento de doenças (TUAN et al., 2002).

2.8 AFLATOXINA B₁

Aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus*, que se desenvolvem naturalmente em alimentos, principalmente após a colheita, durante o transporte e o armazenamento (TANAKA et al., 2001). Classificam-se como compostos de baixo peso molecular, não-imunogênicos, termoestáveis e lipofílicos (FERREIRA et al., 2006) (figura 2).

Despertam grande interesse e preocupação por desencadarem processos patológicos, tais como mutagênese, carcinogênese, teratogênese e imunossupressão, sendo o fígado o órgão alvo em animais e seres humanos (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; FERREIRA et al., 2006). A AFB₁ é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de AFG₁, AFB₂ e AFG₂ (COULOMBE, 1991). A *International Agency for Research on Cancer* classifica a AFB₁ no grupo 1, como agente carcinogênico para o homem (IARC, 1993).

De acordo com a Resolução RDC nº 274 da ANVISA de 15 de outubro de 2002, a quantidade máxima de aflatoxinas totais (B₁+B₂+G₁+G₂) para consumo humano em amendoim e milho e seus derivados é de 20 µg/kg de alimento. A legislação comum entre países integrantes do MERCOSUL segue os limites determinados pela ANVISA (ANVISA, 2002). Para alimentos destinados ao consumo animal, ingeridos diretamente ou como ingredientes de ração, adota-se o limite de aflatoxina de 50 µg/kg de alimento (MAPA, 1988).

Comparando-se com a legislação vigente na Comunidade Européia, o valor tolerável de aflatoxina total é de apenas 4 µg/kg em cereais, amendoim e frutas secas para consumo humano, sendo para AFB₁ isoladamente de 2 µg/kg (GARDEN; STRACHAN, 2001; AMMIDA et al., 2004). De forma geral, os limites legais estipulados para aflatoxina em produtos

alimentícios dependem de considerações econômicas e variam amplamente de um país para outro (RASTOGI et al., 2001), tendendo a valores mais altos em países subtropicais produtores agrícolas e mais baixos em nações consumidoras de clima temperado (CHIAVARO et al., 2001).

2.9 MECANISMO DE TOXICIDADE DA AFLATOXINA B₁

A aflatoxina é absorvida por difusão passiva no trato gastrointestinal, sendo então distribuída para outros tecidos, principalmente o fígado (MELO et al., 1999). O metabolismo hepático constitui a principal via de detoxicação, através da biotransformação primária por enzimas microsossomais pertencentes à superfamília citocromo P450 (CYP 450), responsável pela detoxicação de xenobióticos no organismo (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

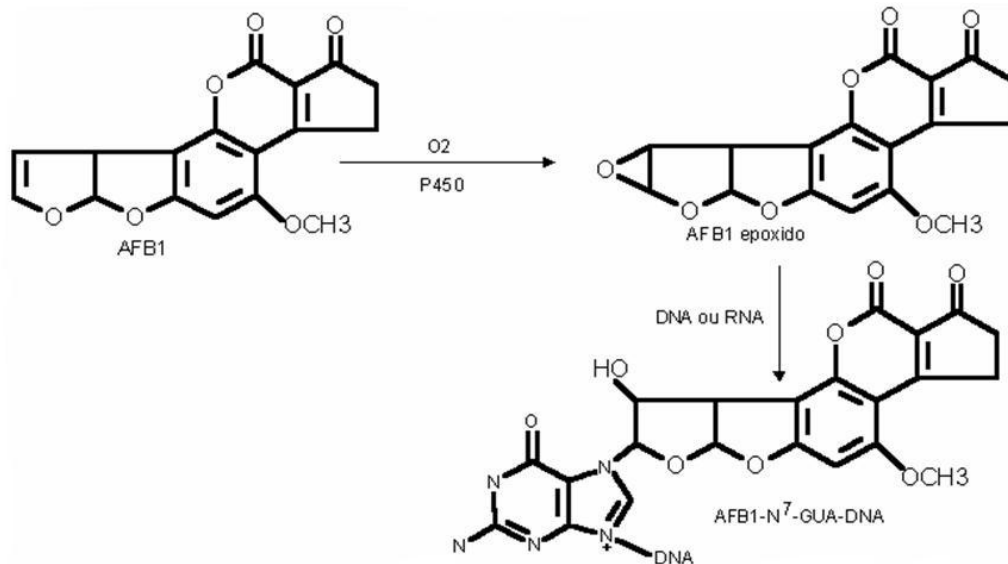


Figura 2 – Reação de epoxidação da AFB₁

Atualmente existe consenso de que a AFB₁ seja um pró-carcinógeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar resposta tóxica (RANEY et al., 1992; OLIVEIRA; GERMANO, 1997). AFB₁ é ativada por epoxidação na ligação 8-9 vinil, formando 8,9-óxido de AFB₁ ou AFB₁-epóxido (figura 2), um composto altamente eletrofílico e capaz de reagir

rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas (ABD-ALLAH et al., 1999). Estas ligações determinam a formação de aductos, os quais representam a lesão primária e a etapa inicial da carcinogênese induzida por AFB₁ (NAKATSURU et al., 1989; OLIVEIRA; GERMANO, 1997). A toxicidade da AFB₁-epóxido é mais associada ao isômero AFB₁-*exo* epóxido, sendo a forma *endo* mais estável e menos genotóxica (JOHNSON; GUENGERICH, 1997). O DNA tem sua estrutura e, conseqüentemente, sua atividade biológica modificada pela ligação com AFB₁-epóxido, caracterizando o mecanismo básico do efeito mutagênico e carcinogênico. A formação de aductos ocorre preferencialmente através da ligação com a guanina do DNA, na posição N⁷ (AFB₁-N⁷-Gua ou AFB₁-DNA) (OLIVEIRA; GERMANO, 1997), embora a ligação covalente *in vitro* tenha sido também relatada à citosina e adenina (WANG; GROOPMAN, 1999).

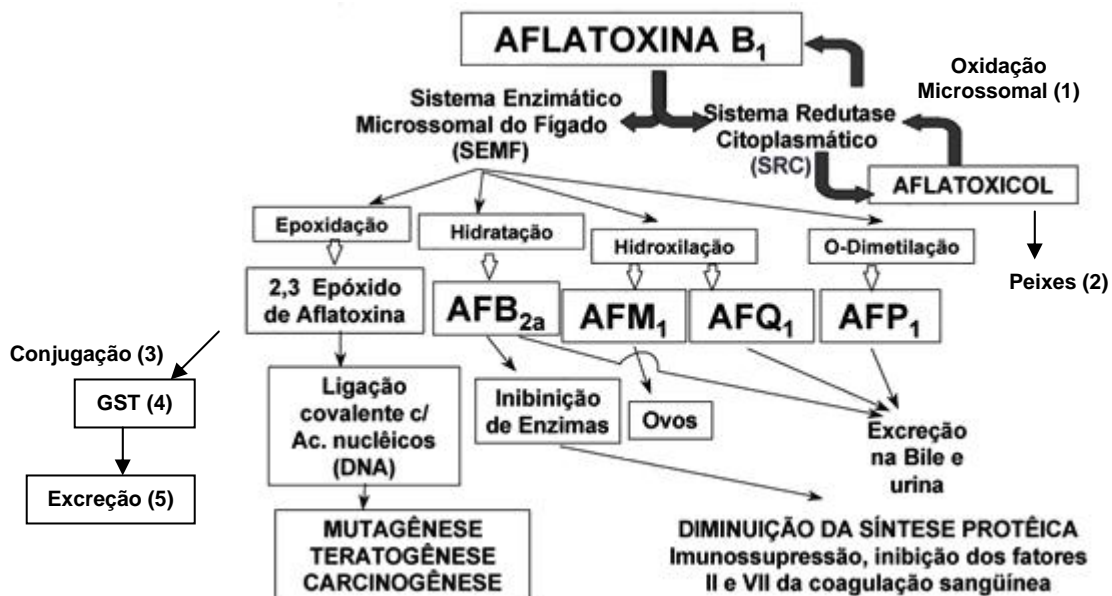


Figura 3 – Biotransformação da AFB₁.

Fonte: Santurio (2000) com adaptações (1, 2, 3, 4, 5)

Estudos em fígado de rato demonstraram que aductos AFB₁-N⁷-guanina podem ser removidos, deixando sítios apurínicos na molécula de DNA, os quais tendem a ser preenchidos com adenina, resultando em transversão de guanina para timina e originando um

ponto de mutação bastante significativo (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). No entanto, experimentos *in vitro* sugerem que o maior responsável pela mutagenicidade da AFB₁ seja a formação do aducto AFB₁-N⁷-guanina, que pode se converter em estrutura formamidopirimidina de anel aberto, relativamente estável e resistente ao processo de reparo do DNA (WANG; GROOPMAN, 1999).

Além da epoxidação, a biotransformação da AFB₁ inclui reações de hidroxilação, formando AFM₁ e AFQ₁, e O-demetilação, formando AFP₁ (figura 3), compostos menos tóxicos que a molécula original (GALLAGHER; EATON, 1995) e com alta solubilidade em água, que podem ser excretados pela urina ou bile (FERREIRA et al., 2006). Entre as principais vias de detoxicação, encontra-se a conjugação enzimática da AFB₁-epóxido com glutathione reduzida, através da enzima GST.

2.10 TOXICIDADE DA AFLATOXINA B₁

Estudos epidemiológicos apontam a contaminação de alimentos com AFB₁ como um dos fatores de risco responsáveis pelo desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em humanos (WOGAN, 1992a; NEAL, 1995). Atualmente, considera-se a etiologia do carcinoma hepatocelular como multifatorial, com provável interação sinérgica entre aflatoxina, atuando como iniciadora do processo cancerígeno, e o vírus da hepatite B, o qual teria efeito promotor de tumor (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). A quantidade de aductos AFB₁-DNA formados no fígado é superior do que em qualquer outro órgão e geralmente se correlaciona com a dose de AFB₁ e a susceptibilidade da espécie (WANG; GROOPMAN, 1999).

O fator que determina a sensibilidade de cada espécie à AFB₁ é o mecanismo de biotransformação da AFB₁ (GALLAGHER; EATON, 1995) que varia amplamente entre as espécies (FERREIRA et al., 2006). A expressão da isoforma α -GST, que possui alta atividade conjugadora com AFB₁-epóxido, contribui para a resistência seletiva do camundongo em relação ao rato (GALLAGHER; EATON, 1995). Descreve-se que a dose média para a produção de tumor (DT₅₀) em rato Fischer macho, após ingestão prolongada de AFB₁ na dieta, é de 1,3 μ g/kg

p.c./dia, enquanto em camundongo C3H macho é $>70 \mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./dia (WOGAN, 1992b apud OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é apontada como espécie extremamente sensível à AFB₁ (ABD-ALLAH et al., 1999; TUAN et al., 2002), devido à alta atividade do citocromo P450, principalmente da CYP 2K1, na biotransformação de AFB₁ em AFB₁-epóxido e à ausência de GST constitutiva ou induzida por moduladores (GALLAGHER; EATON, 1995; BAILEY et al., 1996). Relata-se também que o mecanismo de reparo do DNA de peixes é menos eficiente que o de mamíferos (BAILEY et al., 1996). A toxicidade oral aguda da AFB₁ em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é de 0,5 mg/kg p.c. e no bagre-de-canal (*Ictalurus punctatus*), apontado como espécie extremamente resistente à AFB₁, é de 10-15 mg/kg p.c. (GALLAGHER; EATON, 1995). Gallagher e Eaton (1995) indicaram que a resistência do bagre-de-canal à hepatocarcinogenicidade induzida por AFB₁ ocorre devido à baixa epoxidação microsossomal da AFB₁, juntamente com a rápida conversão de AFB₁ à forma reduzida aflatoxicol (AFL). Em peixe, o principal metabólito da biotransformação da AFB₁ é o AFL, formado pela redutase citosólica NADPH-dependente (figura 3), o qual representa um mecanismo de detoxicação, podendo ser conjugado com ácido glucurônico e excretado, ou metabolizado em AFL-M₁ e, posteriormente, conjugado com ácido glucurônico e excretado. No entanto, também representa mecanismo de reserva de AFB₁, quando re-convertido a AFB₁ por oxidação microsossomal (TROXEL et al., 1997).

A genotoxicidade induzida por AFB₁ (i.p. 10, 40 e 80 mg/kg p.c.) foi demonstrada por Al-Sabti (1986) apud Al-Sabti e Metcalfe (1995) através do teste do micronúcleo em eritrócito realizado em 3 espécies de ciprinídeos (*Cyprinus carpio*, *Tinca tinca* e *Ctenopharyngodon idella*). A AFB₁ induz aberrações cromossômicas, micronúcleos (MNs), troca entre cromátides irmãs e quebras cromossômicas (WANG; GROOPMAN, 1999). Abd-Allah et al. (1999) demonstraram que trutas arco-íris (*O. mykiss*) inoculadas i.p. com AFB₁ (0,5 mg/kg p.c.) apresentaram, após 4 h, danos intensos no DNA de sangue total e rim, que diminuiram após 24 h, enquanto no fígado os danos foram progressivos. Em contraste, os autores relataram que o bagre-de-canal (*I. punctatus*), igualmente exposto à AFB₁, não apresentou aumento de danos no DNA em relação ao controle (ABD-ALLAH et al., 1999).

2.12 ASSOCIAÇÃO INICIADOR – PROMOTOR DE CARCINOGENESE

O processo de carcinogênese envolve múltiplas etapas que, resumidamente, podem ser descritas em duas principais: a iniciação e a promoção da neoplasia. A fase de iniciação é resultante de mutação, marcada por alterações na seqüência de bases nitrogenadas do DNA celular, ao passo que a promoção relaciona-se com a expansão da população celular que carrega a mutação inicial (RIBEIRO et al., 2003; FERREIRA et al., 2006).

O desenvolvimento da neoplasia se caracteriza pelo acúmulo progressivo de mutações no genoma de uma célula, conduzindo a alterações na expressão ou função de genes-chave para a manutenção da homeostasia celular. Mutações que conferem vantagens seletivas à célula mutada (ex. crescimento autônomo, evasão do processo de morte celular) e que são herdáveis podem ser fixadas na população de células de um organismo, culminando com a expansão destas células. Portanto, um eventual tumor pode originar-se de uma única célula mutada (BRAGA et al., 2004). Ressalta-se que mutações provocadas por exposição à aflatoxina B₁ representam alterações genéticas permanentes na célula afetada, possibilitando a iniciação do processo de carcinogênese (FERREIRA et al., 2006). A iniciação de carcinogênese induzida por AFB₁ tem sido adotada como modelo para estudos de carcinogênese e anticarcinogenicidade (TAKAHASHI et al., 1995; GRADELET et al., 1998; SEKIJIMA et al., 1999).

Tem-se avaliado o efeito interativo de compostos com reconhecida atividade iniciadora de tumor e com potencial promotor de tumor. Carlson et al. (2001) demonstraram atividade promotora de tumor da fumonisina, micotoxina associada à incidência de câncer esofágico e hepático humano (ONO et al., 1999), em ratos iniciados com AFB₁ e N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina. Ueno et al. (1992) demonstraram que as micotoxinas fumonisina e nivalenol elevaram a expressão de glutathione S-transferase placentar (GST-P), um marcador histoquímico de carcinogênese, em ratos iniciados com AFB₁, sugerindo aumento da incidência de câncer hepático primário mediante co-exposição a um potente iniciador e promotores de tumor. Estes resultados tornam-se preocupantes haja vista a ocorrência comum em alimentos de aflatoxina junto a outras micotoxinas (UENO, 1991; HIROOKA et al., 1996; ONO et al., 2002; ONO; HIROOKA, 2002).

A atividade promotora de tumor hepático da MC foi demonstrada por Nishiwaki-Matsushima et al. (1992) em ratos iniciados com dietil-nitrosamina, um agente cancerígeno adotado em modelos de indução de câncer hepático, e inoculados i.p. com MC. Sekijima et al. (1999) demonstraram aumento sinérgico da expressão de GST-P em fígado de rato iniciado com AFB₁ (i.p.) e, posteriormente, inoculado com MC-LR (i.p.), sugerindo que a AFB₁, presente em alimentos, possa agir em conjunto com a MC-LR, presente na água potável, no desenvolvimento de câncer hepático primário.

2.13 HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO

Herbicidas à base de glifosato configuram-se entre os mais utilizados no mundo (BAYLIS, 2000; COX, 2004). O glifosato, criado pela Monsanto em 1974 sob o nome comercial de Roundup[®], perdeu a patente em 2000, possibilitando o desenvolvimento de produtos genéricos (WILLIAMS et al., 2000). É um herbicida sistêmico, não seletivo (amplo espectro), para aplicação na fase de pós-emergência no controle de plantas invasoras em regiões agricultáveis (ex. lavouras de soja, milho, pastagem) e não agricultáveis (industriais, florestais, domiciliares, jardinagem) e também em ambiente aquático (BAYLIS, 2000; COX, 1998).

O glifosato [N-(fosfometil)glicina] (figura 4) classifica-se como uma glicina substituída, de fórmula estrutural C₃H₈NO₃P, pertencente à classe toxicológica IV. A *United States Environmental Protection Agency* classifica o glifosato como pertencente ao grupo E, i.e. sem evidência de carcinogenicidade em humanos (USEPA, 1993 apud TU et al., 2001).

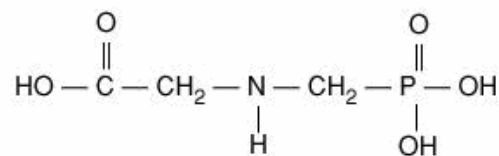


Figura 4 – Estrutura química de glifosato [N-(fosfometil)glicina]

No solo, a degradação do glifosato ocorre principalmente por ação microbiana (figura 5), sendo transformado em sarcosina ou, em maior parte, em ácido aminometilfosfônico (AMPA) (AMARANTE JUNIOR; SANTOS, 2002). A mobilidade no solo e o potencial de lixiviação do glifosato e surfactante são baixos, visto que ambos são fortemente adsorvidos por partículas do solo, considerando-se improvável a persistência no ambiente aquático (MALLAT; BARCELÓ, 1998; SCHUETTE, 1998). A meia-vida do glifosato é bastante variável, citando-se que no solo seja de 3 a 249 dias e, na água, de 35 a 63 dias (COX, 1998; USDA, 2000). Goldsborough e Beck (1989) relataram persistência de glifosato em água de 1,5 a 3,5 dias.

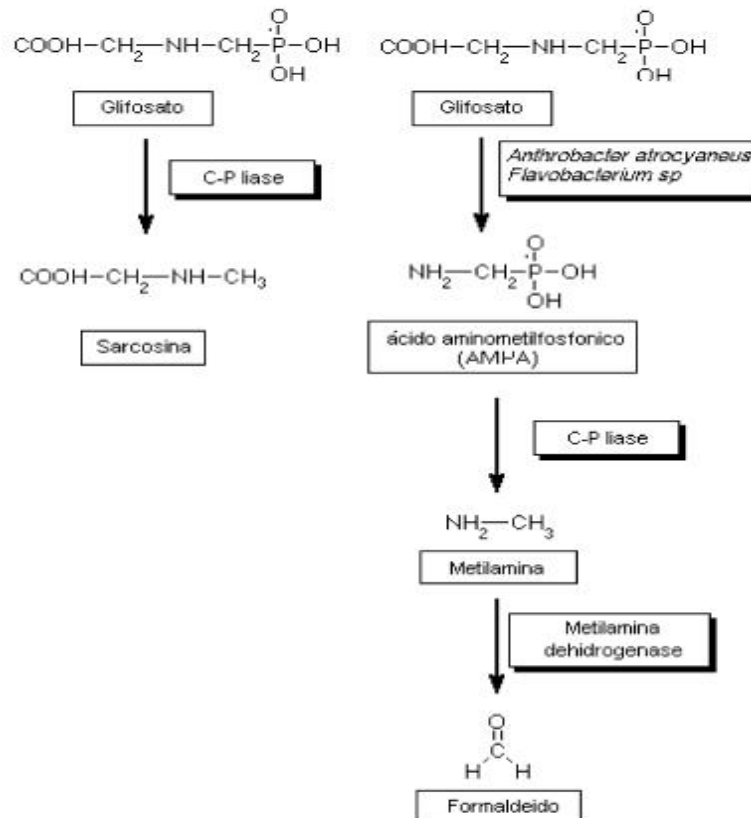


Figura 5 – Vias de degradação do glifosato.

Fonte: (AMARANTE JUNIOR; SANTOS, 2002)

No entanto, descreve-se que o glifosato pode deixar resíduo em água superficial, através da lixiviação da área agrícola, sendo detectado na maioria dos sistemas aquáticos (WHO, 1994 apud COX, 1998). Recentemente, Kjær et al. (2005) detectaram glifosato e AMPA em água

subterrânea, na Dinamarca, em concentração superior ao limite da União Européia para água potável ($<0,1 \mu\text{g/L}$), sugerindo a ocorrência de lixiviação destas substâncias através do solo e, portanto, risco potencial para o ambiente aquático.

A atual preocupação com o glifosato é em relação ao aumento do uso, promovido pela introdução de cultivos geneticamente modificados para resistirem ao glifosato, principalmente da soja GR (resistente ao glifosato) ou RR (*Roundup Ready*[®]). Dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA) coletados entre 2000 a 2005 demonstraram que a disseminação do plantio de soja transgênica tem provocado elevação no uso de herbicidas à base de glifosato: no Rio Grande do Sul, primeiro Estado a plantar transgênico, o consumo cresceu 85%; no Mato Grosso, maior produtor nacional de soja, o crescimento atingiu 94%; no Paraná, onde o governo estadual inibe o plantio de transgênico, a elevação foi de 7% (MRE, 2007). Ainda, Benbroock et al. (2001) reportaram aumento de 10 a 30% no volume total de herbicida aplicado em soja GR em relação a variedades convencionais cultivadas nos EUA entre 1998 a 2000. Dessa forma, estima-se que o uso contínuo do glifosato possa elevar o acúmulo de resíduo na água e nos alimentos. Foi verificado resíduo de glifosato em 70% das 154 amostras de soja transgênica coletadas em 2006 no Paraná, sendo que 8 destas amostras apresentaram nível de glifosato entre 14,4 e 36 mg/kg, valor acima do novo limite autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 10 mg/kg (AEN, 2006).

De acordo com a Portaria nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000 da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001), o Valor Máximo Permitido (VMP) de glifosato em água para consumo humano é de $500 \mu\text{g/L}$. Nos Estados Unidos, o nível máximo de contaminantes em água para consumo humano é de $0,7 \mu\text{g/L}$ (USEPA, 2006) e, na União Européia, o nível máximo admissível de glifosato em água para consumo humano é de $0,1 \mu\text{g/L}$ (RUBIO et al., 2003).

A ANVISA recentemente aumentou o Limite Máximo de Resíduo (LMR) de glifosato em soja de 0,2 para 10 mg/kg, devido ao emprego da soja tolerante ao tratamento com glifosato. A Ingestão Diária Aceitável (IDA) de glifosato é de $0,042 \text{ mg/kg p.c.}$ (ANVISA, 2007; AEN, 2006).

2.15 MECANISMO DE TOXICIDADE DO GLIFOSATO

O glifosato pulverizado no vegetal é absorvido na superfície das folhas e caulículos e transportado pelo floema para os tecidos merismáticos. A absorção do glifosato é facilitada pela ação do surfactante polioxietileno amina (POEA), cuja finalidade é impedir a formação de gotas durante a pulverização, fazendo com que o produto se espalhe pela superfície foliar. A molécula de glifosato, por ser um derivado de glicina (aminoácido essencial de vegetais), não é reconhecida como agente agressor (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

O glifosato inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP), presente em cloroplastos de células vegetais. Conseqüentemente, ocorre inibição da produção de corismato, precursor da síntese de aminoácidos aromáticos essenciais (fenilalanina, tirosina e triptofano), que por sua vez são utilizados na síntese de proteínas e produtos secundários, como promotores e inibidores de crescimento, compostos fenólicos e lignina (SCHUETTE, 1998; BAYLIS, 2000; AMARANTE JUNIOR; SANTOS, 2002; GALLI e MONTEZUMA, 2005). O glifosato também inibe o CYP 450 de vegetais, enzima envolvida na detoxicação de herbicidas (LAMB et al., 1998).

2.16 TOXICIDADE DO GLIFOSATO

Agências regulatórias e instituições científicas no mundo inteiro confirmam que o glifosato e sua fórmula comercial Roundup[®] são seguros à exposição humana e ao meio ambiente (WILLIAMS et al., 2000). No entanto, estudos têm demonstrado o efeito tóxico induzido por herbicidas à base de glifosato, sugerindo risco potencial à saúde humana (MARC et al., 2002; DALLEGRAVE et al., 2003; MARC et al., 2004 a b). Dallegrave et al. (2003) avaliaram o potencial teratogênico do Roundup[®] na gestação de ratas tratadas oralmente com Roundup[®] diluído em água (equivalente ácido de glifosato 500, 750 e 1000 mg/kg p.c.) entre o 6º e 15º dia gestacional, demonstrando que o herbicida retardou o desenvolvimento do esqueleto fetal. Marc et al. (2002) demonstraram em embrião de ouriço-do-mar, modelo reconhecido para

estudos do ciclo celular, que o Roundup[®] promoveu disfunção na regulação do ciclo celular, devido à inibição da síntese de DNA durante a fase S (MARC et al., 2004 b) e, conseqüentemente, preveniu a ativação do complexo CDK1/ciclina B, conhecido como regulador universal da transição de fases G2/M (MARC et al., 2002; MARC et al., 2004 b). Marc et al. (2004 a) enfatizam que a disfunção no ciclo celular de uma única célula pode ser crucial no desenvolvimento de câncer. Em estudos subseqüentes, demonstraram que o Roundup[®] atrasou o processo de desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar em concentração 500 vezes menor que a recomendada pelo fabricante para pulverização a campo, por interferir no processo de transcrição (MARC et al., 2005). O efeito tóxico do herbicida foi atribuído ao sinergismo entre o glifosato e a mistura de surfactantes e permeabilizantes presentes na fórmula comercial (MARC et al., 2002; MARC et al., 2004 a).

A fórmula comercial do herbicida apresenta maior toxicidade em organismos aquáticos, incluindo peixes, e mamíferos do que o composto ativo isoladamente (glifosato), devido ao surfactante polioxietileno amina (POEA) presente no Roundup[®] (FOLMAR et al., 1979; DALLEGRAVE et al., 2003; TSUI; CHU, 2003; MARC et al., 2005). A toxicidade do POEA varia conforme a espécie, podendo contribuir com até 86% da toxicidade da fórmula em organismos aquáticos (TSUI e CHU, 2003).

Jiraungkoorskul et al. (2002) demonstraram alterações histológicas em fígado de tilápias expostas por imersão ao Roundup[®] na concentração correspondente a CL₅₀ 96 h para *O. niloticus* adulto (76,7 µL Roundup[®]/L ou sal isopropilamina de glifosato de 36 mg/L), como hepatócitos com volume aumentado, infiltrado de leucócitos e formação de vacúolos. Langiano (2006) também detectou alterações em fígado de curimba (*Prochilodus lineatus*), utilizando concentração subletal de Roundup Original[®] de 7,5 e 10 µL/L (correspondente ao sal isopropilamina de glifosato de 3,6 mg/L e 4,8 mg/L, respectivamente), descrevendo a CL₅₀ 96 h do Roundup Original[®] nesta espécie em 13,7 µL/L (sal isopropilamina de glifosato de 6,57 mg/L).

Sugere-se a viabilidade do teste do micronúcleo e ensaio do cometa em peixes como ferramenta útil para monitoramento de genotoxicidade causada por contaminantes ambientais, como o Roundup[®] (GRISOLIA, 2002; ÇAVAS; KÖNEN, 2007). Grisolia (2002) relatou aumento significativo na frequência de micronúcleo (MN) em eritrócitos de peixe (*Tilapia rendalli*) 4 dias após a inoculação intra-abdominal de Roundup[®] em doses únicas de 42, 85 e 170 mg/kg (sal isopropilamina de glifosato). O autor descreve ainda que peixes

demonstraram maior sensibilidade que camundongos à indução de micronúcleo provocada por pesticidas, como Alliete[®], Brestanid[®] e Roundup[®] (GRISOLIA, 2002). ÇAVAS; KÖNEN (2007) demonstraram que peixes (*Carassius auratus*) expostos ao Roundup[®] em 5, 10 e 15 mg/L (sal isopropilamina de glifosato) apresentaram aumento dose-dependente na frequência de micronúcleo, anormalidade nuclear e danos no DNA, avaliados em eritrócitos após 48, 72 e 96 h.

2.17 MONITORAMENTO DE GENOTOXICIDADE AQUÁTICA

A utilização de peixe como modelo experimental para avaliação de genotoxicidade induzida por contaminantes ambientais presentes na água tem se popularizado (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA, 2002; ÇAVAS; KÖNEN, 2007). O peixe é considerado bioindicador apropriado devido à posição sistemática de vertebrado e consumidor final na cadeia alimentar aquática (BAGANZ et al., 1998), necessidade de grande volume de água para respiração, intensificando sua exposição (ULUPINAR; OKUMUS, 2002) e resposta a toxicantes geralmente similar a vertebrados superiores (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O teste do micronúcleo em peixe tem sido amplamente utilizado para avaliar a exposição a toxicantes em condições experimentais e ambientais (HAYASHI et al., 1998), demonstrando potencial para monitoramento *in situ* da qualidade da água (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001). O teste do micronúcleo fornece estimativa da frequência de mutação, possibilitando introspecção sobre riscos diretos e indiretos à saúde humana causados por contaminantes ambientais (ULUPINAR; OKUMUS, 2002).

Micronúcleos (MNs) são pequenas massas citoplasmáticas de cromatina condensada, semelhantes a pequenos núcleos, resultantes da quebra de cromossomos (clastogênese) ou de cromossomos inteiros que sofreram atraso durante a anáfase da divisão celular (aneugênese) (FENECH et al., 1999). A técnica exige que a população celular eleita para avaliação passe por processo de mitose, para que as alterações no cromossomo induzidas pelo tratamento se manifestem como micronúcleo nos ciclos celulares subseqüentes (ULUPINAR; OKUMUS, 2002). O critério para identificação de micronúcleo em eritrócito de peixe é que: (a) o MN seja menor que 1/3 do núcleo principal, (b) o MN esteja totalmente separado do núcleo

principal, (c) o MN apresente coloração idêntica ao núcleo principal, sem refringência (GRISOLIA, 2002). Estima-se também que o micronúcleo em peixe tenha entre 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo principal (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Paralelamente, tem-se utilizado o ensaio do cometa (*SCGE – Single Cell Gel Electrophoresis*) para detecção de substâncias genotóxicas (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; MIYAJI et al., 2004). A técnica envolve o preparo de suspensão celular em agarose, que se solidifica formando um filme sobre a lâmina. As lâminas são imersas em solução de lise contendo detergente e sais em alta concentração, para que ocorra lise da membrana e remoção de proteínas nucleares (incluindo histonas) (TICE et al., 2000; RIBEIRO et al., 2003). A estrutura remanescente, denominada nucleóide, é submetida a pH extremamente alcalino, para que ocorra abertura da dupla-fita do DNA (desnaturação), e eletroforese. À medida que os fragmentos de DNA migram do nucleóide em direção ao ânodo, forma-se figura semelhante a um “cometa”, que revela a extensão de danos do DNA (FAIRBAIRN et al., 1995; BOECK et al., 2000). As lâminas são posteriormente neutralizadas e coradas com brometo de etídeo, agente intercalante do DNA capaz de emitir fluorescência (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

O ensaio alcalino do cometa possibilita a identificação de quebras de fita simples, de fita dupla e de sítios álcali-lábeis do DNA. O ensaio do cometa não é utilizado para detectar mutação, mas sim lesões genômicas que, diferente da mutação, são passíveis de reparo (RIBEIRO et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito tóxico oriundo da exposição subcrônica a extrato celular de *Microcystis aeruginosa* toxigênica (produtora de microcistina) associada à aflatoxina B₁ (micotoxina) e herbicida à base de glifosato (Roundup[®]) em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), focando na hipótese de ocorrer interação tóxica entre estes contaminantes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a ocorrência de genotoxicidade em células sangüíneas de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) exposta de forma subcrônica à aflatoxina B₁, *Microcystis aeruginosa* toxigênica (linhagens BCCUSP 262 e NPLJ 47) e herbicida à base de glifosato Roundup[®] através do Ensaio Alcalino do Cometa.

Avaliar a ocorrência de mutagenicidade em eritrócitos de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) exposta de forma subcrônica à aflatoxina B₁, *Microcystis aeruginosa* toxigênica (linhagens BCCUSP 262 e NPLJ 47) e herbicida à base de glifosato Roundup[®] através do Teste do Micronúcleo.

Avaliar as alterações histológicas no fígado de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) exposta de forma subcrônica à aflatoxina B₁, *Microcystis aeruginosa* toxigênica (linhagens BCCUSP 262 e NPLJ 47) e herbicida à base de glifosato Roundup[®] (análise em andamento).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BIOENSAIO

4.1.1 Local e Instalação Experimental

O experimento foi conduzido na Estação de Piscicultura (EPUEL), do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina. Foram utilizados 7 tanques plásticos com capacidade de 500 L, não comunicantes, com aeração individual e constante. A água de abastecimento, proveniente de poço tubular profundo (aproximadamente 70 m de profundidade) situado na EPUEL, era primeiramente armazenada em caixa de água com aquecedor e aerador e, depois, distribuída em fluxo contínuo para os tanques experimentais.

4.1.2 Animal Experimental e Manejo

As tilápias (*Oreochromis niloticus*) destinadas ao experimento foram obtidas na EPUEL e criadas de acordo com a rotina de atividades. Os reprodutores, machos e fêmeas, foram alocados em hapas instaladas em viveiro de terra, para acasalamento no período reprodutivo (8 dias). Os ovos foram coletados para incubação artificial em água recirculante, com filtro biológico, a 28°C e aeração constante, em galpão coberto (3-5 dias). As larvas foram encaminhadas para hapas em viveiro de terra e alimentadas (30 dias) com ração farelada adicionada de metil-testosterona (60 mg/kg ração), visando reversão sexual para machos. Em seguida, os alevinos foram transferidos para viveiros de criação, onde permaneceram por cerca de 3 meses até o momento da coleta. Foram coletadas 210 tilápias do Nilo (*O. niloticus*), provenientes de um único viveiro, com peso médio inicial de $74,95 \pm 15$ g. Os peixes foram

distribuídos em 7 grupos experimentais, a uma densidade inicial de aproximadamente 5,6 g peixe/L (equivalente a 30 peixes por tanque), fluxo de água de aproximadamente 550 mL/min, e aclimatados por 12 dias antes do início do experimento, para minimizar o estresse oriundo da manipulação. Após a primeira coleta de tecido (t_{77}) (figura 9), a densidade foi de aproximadamente 6,8 g/L e, após a segunda coleta de tecido (t_{131}), de 4,9 g/L.

Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial extrusada em quantidade aproximada de 1,5% do p.c. Para monitoramento de aflatoxina na ração experimental foram coletadas amostras mensais analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), conforme metodologia descrita por Soares e Rodríguez-Amaya (1989). A excreta dos peixes foi limpa a cada três dias. O teor de oxigênio dissolvido e temperatura da água foram monitorados a cada três dias, utilizando aparelho digital YSI 55/12 FT Dissolved Oxygen Meter. O teor de amônia e nitrito foi monitorado diariamente nos dias de exposição ao Roundup[®], e a cada 15 dias nos demais dias experimentais, de acordo com as normas descritas por Paranhos (1996).

4.1.3 Período Experimental

O período experimental foi de 185 dias (t_{185}), visando a exposição subcrônica de tilápias avaliadas por diferentes tratamentos utilizando concentrações subletais de AFB₁, *Microcystis aeruginosa* e Roundup[®].

4.2 MATERIAIS UTILIZADOS NOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Aflatoxina B₁

Aflatoxina B₁ (AFB₁) (Sigma Chemical Company, MO) foi ressuspensa em metanol e analisada em espectrofotômetro a 360 nm para determinação da concentração, de

acordo com a metodologia de Soares e Rodríguez-Amaya (1989). Em seguida, uma alíquota desta solução foi separada para utilização no bioensaio, seca em nitrogênio gasoso a 40°C e, posteriormente, solubilizada em óleo mineral em concentração de 5 µg AFB₁/mL. O tratamento com AFB₁ foi realizado por inoculação intraperitoneal (i.p.) de 10 µg/kg de peso corporal (p.c.) em uma única aplicação no primeiro dia do experimento (t₀) (figuras 8 e 9).

4.2.2 *Microcystis aeruginosa*

Foram utilizadas duas linhagens de *Microcystis aeruginosa* produtoras de microcistina, denominadas *M. aeruginosa* BCCUSP 262 e *M. aeruginosa* NPLJ 47. Cada cultivo foi preparado individualmente em meio BG-11 pH 7,4 (RIPPKA et al., 1979 modificado por BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2000) em sala climatizada a 23-24°C do Laboratório de Microalgas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ – USP, Piracicaba. Procedeu-se a contagem de células em câmara de Fuchs-Rosenthal e, logo após, cada cultivo foi concentrado por centrifugação (11000 xg, 23°C), recolhendo-se o precipitado celular no fundo do tubo. Este precipitado foi congelado e descongelado por 8 vezes consecutivas, visando promover lise celular e liberação de microcistina (MC), obtendo-se o extrato celular de *M. aeruginosa*. A seguir, cada extrato foi liofilizado (-26°C, 386 µHg), sendo uma parte destinada ao bioensaio com tilápia e outra encaminhada para a Universidade de Meijo (Japão), para identificação e quantificação de MC por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa com *Electron Spray Ionization (ESI-LCMS)*.

Para o bioensaio, foram utilizados dois tratamentos experimentais com *M. aeruginosa*: um a partir do liofilizado da linhagem BCCUSP 262 diluído em solução fisiológica e inoculado i.p. na dose de 1x10⁵ células/kg p.c. O outro contendo o liofilizado de ambas linhagens BCCUSP 262 e NPLJ 47 diluído em solução fisiológica e inoculado i.p. na dose de 50% de cada linhagem/ kg p.c., i.e. 5x10⁴ células BCCUSP 262 + 5x10⁴ células de NPLJ 47/kg p.c. Os peixes submetidos ao tratamento com *M. aeruginosa* foram inoculados i.p. no período t₆₂, t₁₁₆ e t₁₇₀ do experimento (figuras 8 e 9).

4.2.2.1 Extração e determinação de microcistina

Para determinação de MC, as amostras liofilizadas (500 mg de cada linhagem) foram extraídas por 3 vezes com ácido acético 5% (30 min, sob agitação), para retirada de MC hidrofílica (MC-LR, MC-RR e MC-LY) ou com metanol, para retirada de MC hidrofóbica (MC-LW e MC-LF). Em seguida, foram centrifugadas (4000 xg, 30 min) e aplicadas em coluna pré-condicionada C18 Sep-Pak (Waters, Milford, MA, USA). O eluato foi seco em rotavapor e o resíduo diluído em metanol.

As MCs foram analisadas por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massa com *Electron Spray Ionization* (ESI-LCMS). A separação por Cromatografia Líquida foi realizada através do sistema HPLC Agilent 1100. Após filtração (membrana Ultrafree-MC, Millipore), 5µL de amostra foram introduzidos em coluna de gel TSK Super ODS (2µm, 2,0x100mm, TOSOH) a 40°C. A fase móvel consistiu em: (A) 0,1% de ácido fórmico em água e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. A vazão foi mantida a 200 µL/min. MC-LR, MC-LR linear, tetrapeptídeo e Adda foram analisados em comprimento de onda 238 nm, sendo os compostos derivatizados com L-FDLA analisados a 340 nm. Após análise por Cromatografia Líquida, o eluato foi submetido a Espectrômetro de Massa (Finnigan LCQ Deca SP plus ITMS) equipado com interface *Electron Spray Ionization* (HARADA et al., 1996).

A determinação de MC por ESI-LCMS indicou a presença de MC-LR (leucina e arginina), MC-LF (leucina e fenilalanina), MC-LW (leucina e tirosina) e 7-desmetil-MC-LR no extrato celular liofilizado de BCCUSP 262. No extrato celular liofilizado de NPLJ 47 detectou-se apenas MC-LR. A injeção i.p. de extrato celular contendo 1×10^5 células de BCCUSP 262/kg p.c. correspondeu à dose de MC total de $488,02 \times 10^{-4}$ µg/kg p.c., enquanto a inoculação i.p. de 5×10^4 células de BCCUSP 262 adicionada de 5×10^4 células de NPLJ 47 correspondeu à dose de MC total de $244,63 \times 10^{-4}$ µg/kg p.c. (capítulo 1, tabela 3).

4.2.3 Roundup®

Foi utilizado herbicida comercial Roundup Original®, composto por sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina (480 g/L), equivalente ácido de N-(fosfonometil) glicina (360 g/L) e ingredientes inertes (684 g/L) (Monsanto do Brasil). Este produto foi previamente diluído e homogeneizado em água destilada, para posterior adição nos tanques experimentais, a fim de se obter concentração final de 5 µL Roundup®/L água, correspondente ao equivalente ácido de glifosato de 1,8 mg/L ou ao sal isopropilamina de glifosato de 2,4 mg/L.

A exposição ao Roundup® foi realizada em 3 dias, procedendo 24 h de imersão em Roundup® na dose de 5 µL/L (fluxo de água fechado para manter contato com Roundup®), intercalado com 24 h de renovação de água (fluxo de água aberto e sem adição do herbicida), para evitar acúmulo de amônia devido à alta densidade de animais. A exposição ao Roundup® foi realizada desta forma em três períodos distintos: a) t₃₈, t₄₀, t₄₂; b) t₉₂, t₉₄, t₉₆; c) t₁₄₆, t₁₄₈, t₁₅₀ do experimento (figura 8 e 9).

4.3 TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 7 grupos experimentais:

- I. CN – Controle negativo;
- II. T1^(AF) – Aflatoxina B₁ i.p., 10 µg/kg p.c. em t₀,
- III. T2^(M262) – *M. aeruginosa* BCCUSP 262 i.p., 1x10⁵ células/kg p.c. em t₆₂, t₁₁₆ e t₁₇₆;
- IV. T3^(R) – Roundup Original® imersão, 5 µL Roundup®/L água aplicado em 3 períodos: a) t₃₈, t₄₀, t₄₂; b) t₉₂, t₉₄, t₉₆; c) t₁₄₆, t₁₄₈, t₁₅₀;
- V. T4^(R+M262) – T2 + T3
- VI. T5^(AF+R+M262) – T1 + T2 + T3

- VII. T6^(AF+R+M262/47) – T1 + duas linhagens de *M. aeruginosa* (BCCUSP 262 5x10⁴ células/kg p.c. e NPLJ 47 5x10⁴ células/kg p.c.) + T3 i.p., em t₆₂, t₁₁₆ e t₁₇₆.

O mesmo procedimento foi adotado em todos os tratamentos, i.e. quando os animais foram inoculados i.p. com AFB₁ ou *M. aeruginosa*, os demais que não recebiam o tratamento em questão foram inoculados i.p. com solução fisiológica e, quando os animais foram expostos ao Roundup[®], os demais que não recebiam este tratamento foram expostos à água destilada. O intervalo mantido entre a exposição ao Roundup[®] e *M. aeruginosa* foi de 20 dias, entre a exposição à *M. aeruginosa* e coleta de tecido, de 15 dias, e entre a coleta de tecido e nova exposição ao Roundup[®], de 15 dias.

4.4 COLETA DE SANGUE

Decorridas 24 horas de exposição do animal aos diferentes contaminantes (AFB₁, Roundup[®] e *M. aeruginosa*) (figura 9), 6 peixes de cada tratamento foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína (1:5000) para coleta de amostra de sangue periférico da veia caudal, utilizando agulhas e seringas heparinizadas. De acordo com Gontijo et al. (2003), a benzocaína não interfere no resultado do Ensaio Cometa. As amostras de sangue foram utilizadas para o Teste do Micronúcleo e para o Ensaio do Cometa.

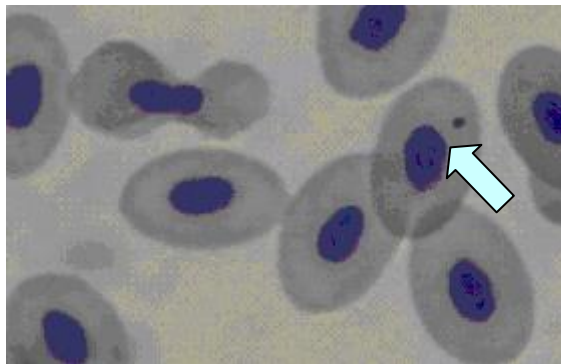
4.5 COLETA DE TECIDO

A coleta de tecido foi realizada no período t₇₇, t₁₃₁ e t₁₈₅ do experimento (figura 9), correspondendo a 15 dias após a última inoculação de *M. aeruginosa*. Seis peixes de cada tratamento foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína (1:5000) e, em seguida, eutanasiados mediante secção medular para coleta de fígado, rim, brânquia e músculo. Uma

amostra de cada tecido foi imediatamente fixada em bouin, por 18 h, e em formalina tamponada 10%, por 24 h.

4.7 TESTE DO MICRONÚCLEO

Foram confeccionados dois esfregaços sangüíneos por animal. As lâminas foram secas por 24 h em temperatura ambiente, fixadas com metanol absoluto por 10 min e coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 (4,08 g KH_2PO_4 ; 7,10 g Na_2HPO_4 para 1L de água destilada) por 10 min. Posteriormente, foram lavadas com água destilada, secas em temperatura ambiente e montadas para uso permanente com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Efetuou-se análise citológica em microscópio óptico, com objetiva de 1000x. Para cada animal foram contados 2000 eritrócitos, anotando-se a freqüência de micronúcleos observados (figura 6).



A seta indica eritrócito micronucleado observado em microscópio óptico.

Figura 6 – Eritrócitos de sangue periférico de tilápia (*O. niloticus*) corados com Giemsa 5% em aumento de 1000x.

4.8 ENSAIO DO COMETA (*SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS*)

O Ensaio Alcalino do Cometa foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Departamento de Biologia Geral da UEL, conforme metodologia descrita por Singh et al. (1988) com modificações de Speit e Hartmann (1999). Foram confeccionadas duas lâminas por animal. As lâminas foram cobertas com filme de agarose 1,5% (300 mg/20 mL de PBS) a 60°C, secas a temperatura ambiente por 24 h e armazenadas a 4°C. A seguir, foi confeccionada suspensão celular com 10 µL de sangue diluído em 1000 µL de solução salina (7,4 g NaCl; 0,36 g KCl; 0,17 g CaCl₂; 0,31 g NaHCO₃; 1,6 g Na₂HPO₄; 0,4 g NaH₂PO₄ para 1L de água destilada). Logo após, 15 µL desta suspensão foi homogeneizada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (100 mg/20 mL PBS – 0,2 g KCl; 0,2 g KH₂PO₄; 8,0 g NaCl; 1,15 g Na₂HPO₄ para 1L de água destilada), mantida a 37°C em banho-maria. Em seguida esta solução foi colocada sobre a lâmina pré-gelatinizada inicialmente descrita, coberta com lamínula e mantida por 20 min a 4°C para solidificação. Após remoção da lamínula, a lâmina foi imersa em solução de lise gelada recém-preparada (1 mL Triton X-100; 10 mL DMSO e 89 mL solução de lise estoque pH 10,0 – solução de lise estoque: 146,1 g NaCl 2,5 M; 37,2 g EDTA 100 mM; 1,2 g Tris 10 mM; 8,0 g NaOH; 10 g Lauril Sarcosinato de Sódio para 1 L), contida em cuba de vidro envolta com papel alumínio para proteção contra luz, permanecendo nesta solução por 24 h a 4°C. A seguir, as lâminas foram lavadas com água destilada e colocadas em cuba de eletroforese, mantida em banho com gelo. Posteriormente, estas foram cobertas com tampão alcalino gelado (NaOH 300 mM, EDTA 200 mM, pH ~ 13,0), permanecendo em repouso, no escuro, por 20 min. Na seqüência, realizou-se eletroforese a 25 V e 300 mA (0,8-1,0 V/cm) por 20 min, sendo as lâminas, posteriormente, neutralizadas com tampão de neutralização (Tris 0,4 M – HCl, pH 7,5), por 3 repetições de 5 min. As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 min, e, após secagem a temperatura ambiente, armazenadas a 4°C até o momento da análise.

Para a análise citológica, as lâminas foram coradas com 90 µL de solução aquosa de brometo de etídio (0,20 mg/mL de água) e observadas ao microscópio de fluorescência, com objetiva de 1000x, filtro de excitação de 515–560 nm e filtro de barreira de 590 nm. Foram analisados 100 nucleóides por animal, registrando-se as classes de cometa segundo Kobayashi et al. (1995): 0 (sem formação de cauda), 1 (cauda menor que 1 vez o diâmetro do nucleóide), 2

(cauda entre 1-2 vezes o diâmetro do nucleóide) e 3 (cauda maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide) (figura 7). Para cada animal foi obtido um escore, multiplicando-se o número de células obtidas em cada classe pelo valor de cada classe, de acordo com a fórmula: $\text{Escore} = (A \times 0) + (B \times 1) + (C \times 2) + (D \times 3)$, em que A, B, C e D representam o número de células encontradas para cada classe analisada.

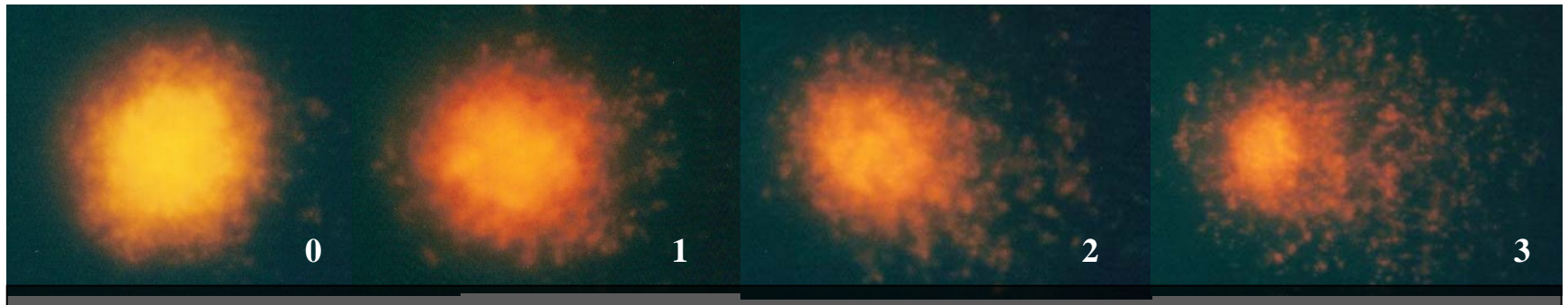
4.9 PROCESSAMENTO DE MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras de fígado, rim, brânquias e músculo foram fixadas em formalina tamponada 10%, por 24 h, e em bouin, por 18 h. Em seguida, foram processadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UEL. As amostras foram lavadas sucessivamente com água corrente (1 h), álcool amoniacal 10% (1 h) e, novamente, com água corrente (1 h). Em seguida foram desidratadas seqüencialmente por imersão em solução alcoólica de concentração crescente, inclusas em parafina líquida a 60°C (overnight) e emblocadas em parafina.

As amostras de tecido hepático referentes ao grupo controle (CN) e inoculado i.p. com *M. aeruginosa* BCCUSP 262 (T2) foram cortadas com micrótomo em secções de 5 µm de espessura, aderidas à lâmina de microscopia, coradas pelo método hematoxilina-eosina (H.E.) e analisadas em microscópio óptico pela Ms. Ana Paula M. E. Santos sob orientação da Prof. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense. A análise histopatológica encontra-se em andamento.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$) para análise dos dados referentes ao escore médio de cometa e frequência média de micronúcleo obtidos pelos tratamentos experimentais.



Nucleóides observados em microscópio de fluorescência e classificados segundo Kobayashi et al. (1995).

Figura 7 – Classes de cometa 0, 1, 2 e 3 em sangue periférico de tilápia (*O. niloticus*) corado com brometo de etídeo em aumento de 1000x

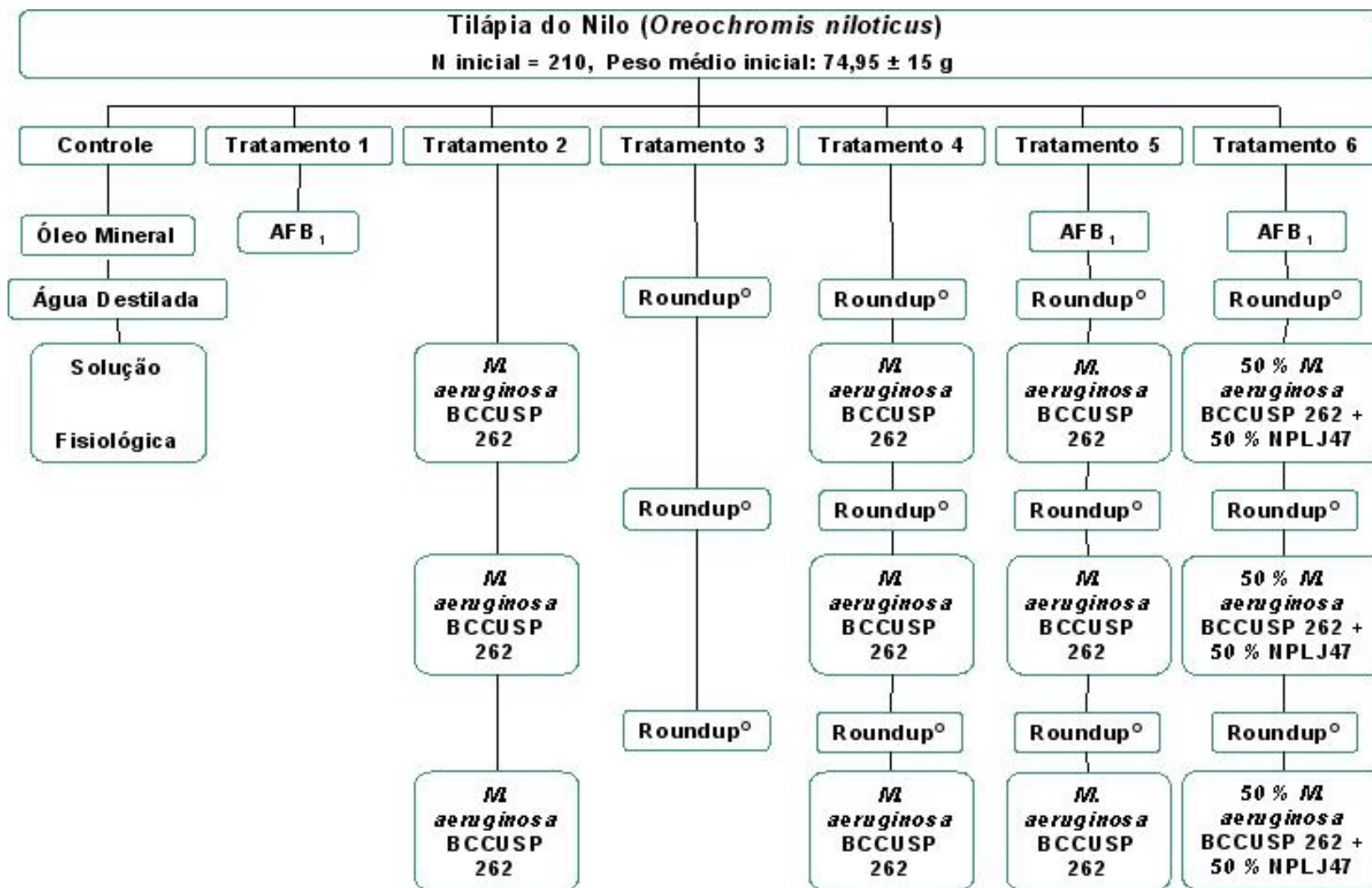
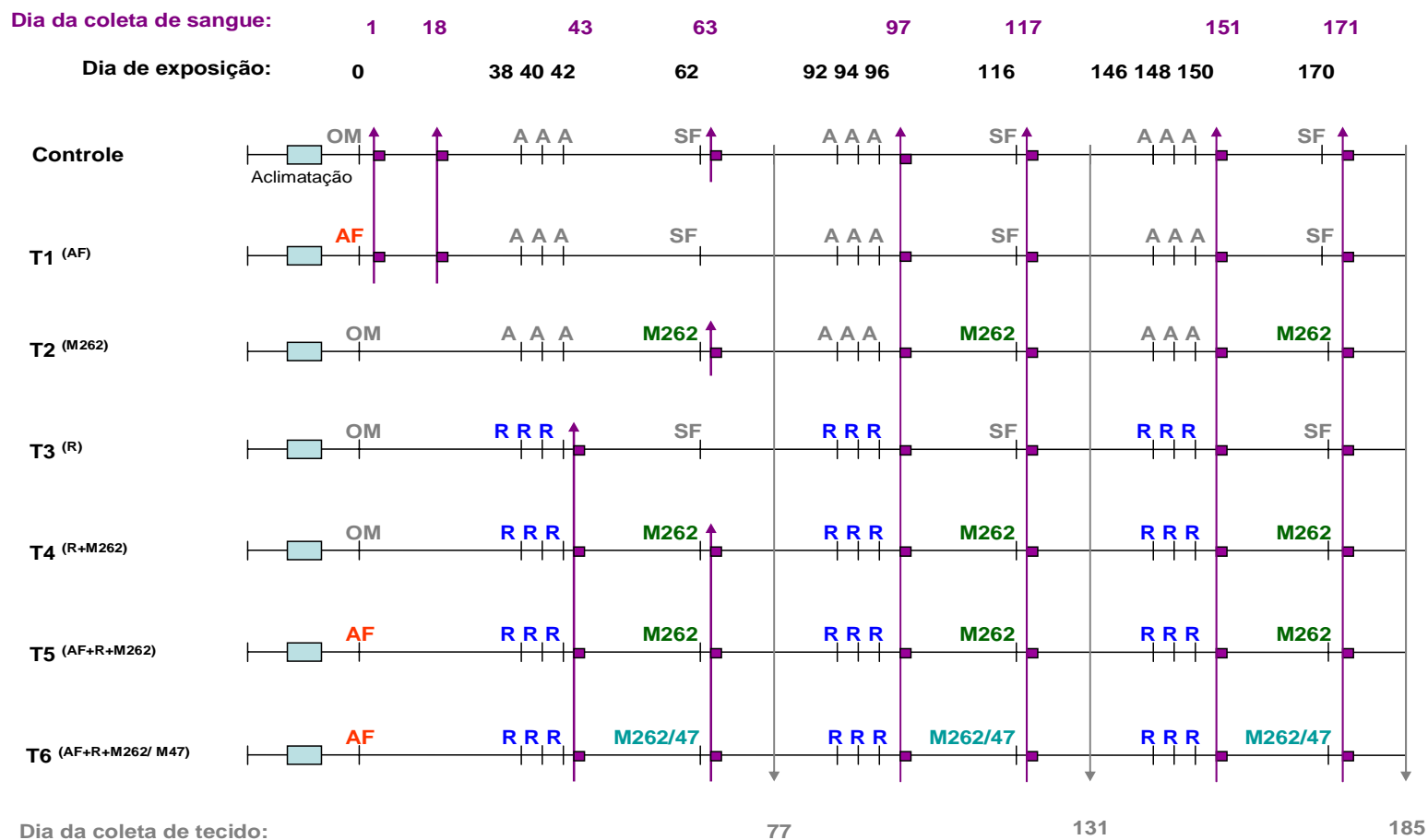


Figura 8 – Delineamento experimental demonstrando esquema de exposição dos contaminantes em tilápia do Nilo



AF:AFB₁, R:Roundup[®], M262:*M. aeruginosa* BCCUSP 262, M47:*M. aeruginosa* NPLJ 47, A:água destilada, OM:óleo mineral, SF:soro fisiológico. Seta e número rosa:coleta de sangue realizada em cada tratamento, seta e número cinza:coleta de tecido realizada em cada tratamento.

Figura 9 – Delineamento experimental demonstrando esquema da exposição dos contaminantes e da coleta de amostras

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram escritos em forma de capítulos, iniciando-se com a definição de parâmetros referentes às concentrações de aflatoxina B₁, *M. aeruginosa* e Roundup[®], tempo e animal experimental a serem utilizados no ensaio biológico, listados abaixo:

CAPÍTULO 1. Determinação de dose, tempo e animal experimental para bioensaio de associação aflatoxina B₁ — Roundup[®] — *Microcystis aeruginosa*;

CAPÍTULO 2. Genotoxicidade subcrônica induzida por *Microcystis aeruginosa*, aflatoxina B₁ e Roundup[®] em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*);

NOTA DE PESQUISA: Histopatologia em tecido hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposta a *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 262.

CAPÍTULO 1

**Determinação de dose, tempo e animal experimental para bioensaio de
associação aflatoxina B₁ — Roundup[®] — *Microcystis aeruginosa***

CAPÍTULO 1 – Determinação de dose, tempo e animal experimental para bioensaio de associação aflatoxina B₁ — Roundup[®] — *Microcystis aeruginosa*

Animal Experimental

Diante da necessidade de se avaliar o efeito tóxico decorrente da co-exposição à aflatoxina B₁, *Microcystis aeruginosa* toxigênica e herbicida à base de glifosato, elegeu-se a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como animal experimental, considerando a possibilidade de exposição natural a estes contaminantes no ciclo da cadeia produtiva.

A padronização do ensaio iniciou-se desde a criação de tilápia na Estação de Piscicultura da UEL (EPUEL). Os peixes, provenientes de um único viveiro de terra, foram divididos em 7 grupos experimentais e aclimatados por 12 dias. Tendo em vista que o tempo de criação comercial da tilápia é de 6 a 8 meses (CASTAGNOLLI, 1992), aliado à necessidade de avaliar o efeito da exposição a doses baixas de contaminantes ambientais a médio e longo prazo, definiu-se o período experimental de 185 dias (aproximado ao período de abate).

Considerando a alta densidade praticada em sistema intensivo de piscicultura, admitindo variação entre 25-40 kg/m³, equivalente a 25-40 g/L (BEVERIDGE e McANDREW, 2000), 30 animais com peso médio inicial de 74,95 ± 15 g foram alocados em cada tanque experimental, correspondendo à densidade de aproximadamente 5,6 g/L.

A figura 10 mostra o fluxograma utilizado para definir as doses de AFB₁, *M. aeruginosa* e Roundup[®] em ensaio subcrônico com tilápia.

Aflatoxina B₁

O meio ambiente aquático natural não se enquadra como fator de risco perante exposição de peixe selvagem à AFB₁. Todavia, não se pode descartar o mesmo, em se tratando de animal cultivado em cativeiro, alimentado com ração preparada com grão susceptível ao

crescimento fúngico e conseqüente contaminação com micotoxinas (GALLAGHER; EATON, 1995). A aflatoxina afeta a produção animal, causando menor ganho de peso, conversão alimentar, imunossupressão a morte (HUWIG et al., 2001; TUAN et al., 2002).

A definição da dose de AFB₁ a ser destinada ao ensaio baseou-se em monitoramento prévio da contaminação com aflatoxina em 42 amostras de ração provenientes de pesqueiros da região de Londrina-PR, realizado por Hashimoto et al. (2003). No estudo constatou-se aflatoxina em nível não detectável a 15,6 µg/kg, com 61,9% das amostras em nível <4 µg/kg, valor inferior ao permitido pela legislação brasileira de 20 µg/kg (ANVISA, 2002).

Assim, testou-se AFB₁ nas doses de 10, 20 e 50 µg/kg p.c. via i.p. em tilápia (*O. niloticus*). Optou-se por exposição i.p. para minimizar o perigo de contaminação dos manipuladores e coletou-se o sangue após 8, 24 e 48 h da inoculação, a fim de determinar a menor dose capaz de iniciar danos genéticos. Todas as doses induziram danos no DNA, detectados através do Ensaio Cometa (tabela 1). A tabela 1 mostra que o efeito genotóxico causado por AFB₁ foi dose-dependente, i.e. o escore de cometa aumentou conforme a dose inoculada, tendo a coleta após 24 h diferido das demais na dose de 50 µg/kg (p<0,05). Baseado nestes dados, preconizou-se o ensaio fixando a dose de AFB₁ em 10 µg/kg p.c. e coleta de sangue após 24 h da inoculação, visando simular ensaio subcrônico em tilápia.

Microcystis aeruginosa

Em tanques de piscicultura, freqüentemente ocorre floração de cianobactérias produtoras de MC, favorecida pelo excesso de matéria orgânica procedente da própria atividade e de afluentes de regiões com alta densidade populacional (PÁDUA, 2002). A presença de MC na água da piscicultura implica em risco para a saúde humana, através do consumo de animais contaminados e do descarte de dejetos próximo a corpos d'água para consumo humano (KAMOGAE et al., 2006). Durante monitoramento de MC, realizado no Paraná entre 1995 e 1996, em 50 amostras de água provenientes de um lago urbano, reservatórios para consumo humano, lagos recreacionais, lagos para dessedentação animal e da aquicultura, Hirooka et al. (1999) detectaram positividade para *M. aeruginosa* em todos os locais, além de alta contaminação com MC em 2 amostras de água para recreação (6,4 e 10 µg/mL) e 1 amostra de

água para consumo humano (6,6 µg/mL) (HIROOKA et al., 1999). Kamogae et al. (2006) detectaram MC-LR em 7 das 14 amostras de florações, coletadas no Lago Itaipú e represas Capivara e Barra do Iraí – PR entre 2000 e 2001, sendo as variantes MC-RR e MC-YR detectadas em menor frequência (3 amostras). Além da MC-LR, outras variantes de MC que ocorrem com frequência em florações são MC-RR, MC-LW e MC-LF (McELHINEY et al., 2000).

Para o ensaio, empregaram-se *M. aeruginosa* linhagem BCCUSP 262 e NPLJ 47 com características iniciais positivas para a produção de microcistina (HASHIMOTO, 2002). A linhagem BCCUSP 262 caracterizava-se inicialmente como produtora de MC, mas negativa para MC-LR (HASHIMOTO et al., 2007), enquanto NPLJ 47 apresentava-se positiva para MC-LR além de outras MCs (informação pessoal com Profa. Dra. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira), sendo ambas cultivadas em meio BG-11 modificado (RIPPKA et al., 1979 modificado por BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2000).

A dose do extrato celular de *M. aeruginosa* a ser utilizado no modelo experimental foi determinada em ensaio com *M. aeruginosa* linhagem BCCUSP 262. O mesmo esquema foi projetado para NPLJ 47, substituindo 50% da dose celular da linhagem BCCUSP 262, já que a literatura relata ampla diversidade de cianobactérias numa mesma floração, com destaque a *M. aeruginosa*, ocorrendo repetidamente ao longo do ano (WATANABE et al., 1996).

A padronização iniciou-se com imersão de tilápia em água contaminada com extrato celular de *M. aeruginosa* BCCUSP 262, sob monitoramento de MC por IC-ELISA durante 7 dias (figura 11: HASHIMOTO, 2002). Considerando a queda drástica da concentração de MC observada após 24 h, com redução de 40,4 para 7,8 µg/L (figura 11), decidiu-se pela inoculação i.p. na região abdominal do peixe, para reproduzir o efeito constante de uma concentração fixa.

Para definir a dose i.p. de MC, testou-se o extrato celular de *M. aeruginosa* BCCUSP 262 contendo 2×10^5 , 4×10^5 e 1×10^6 células/kg p.c. e avaliou-se o efeito genotóxico pelo Ensaio Cometa em sangue coletado após 8, 24 e 48 h da inoculação (tabela 2). A tabela 2 mostra o efeito genotóxico dose-dependente provocado por *M. aeruginosa* após 8 e 24 h, em que o tempo de coleta não diferiu entre si ($p < 0,05$). Considerando a positividade em todos os tratamentos, definiu-se uma dose inferior à utilizada, i.e. 1×10^5 células/kg p.c., para prosseguir com ensaio subcrônico.

A figura 12 mostra os espectros de MC obtidos no extrato celular liofilizado de *M. aeruginosa* BCCUSP 262 e NPLJ 47, analisados por *ESI-LCMS* (HARADA et al., 1996). A linhagem NPLJ 47 produziu somente MC-LR, enquanto a BCCUSP 262 produziu 4 variantes de MC, identificadas como MC-LR, 7-desmetil-MC-LR, MC-LW e MC-LF. Estes dados contrastam com as características iniciais destas linhagens, indicando variação na expressão gênica dependente das condições de cultivo.

A tabela 3 mostra a concentração de MC no extrato celular liofilizado de *M. aeruginosa* BCCUSP 262 e NPLJ 47 e a dose correspondente de MC inoculada i.p. em tilápia. A injeção i.p. de extrato contendo 1×10^5 células de BCCUSP 262/kg p.c. correspondeu à dose de MC total de $488,02 \times 10^{-4}$ µg/kg p.c. Referente ao tratamento com 5×10^4 células de BCCUSP 262 adicionado de 5×10^4 células de NPLJ 47, correspondeu à dose de MC total de $244,63 \times 10^{-4}$ µg/kg p.c.

Roundup[®]

A localização da piscicultura em zona agrícola pode propiciar a exposição de peixes a resíduos de fertilizante e também de herbicida (WHO, 1994 apud COX, 1998; JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002), como o Roundup[®], amplamente vinculado à produção agrícola e constituindo motivo de preocupação em decorrência do uso aumentado em cultivo de soja resistente ao glifosato (BENBROOCK et al., 2001; MRE, 2007).

A definição da concentração de Roundup[®] a ser utilizada no modelo experimental baseou-se em experimentos em andamento do Centro de Ciências Biológicas – UEL (LANGIANO, 2006), assim como na compilação dos dados apresentados por Jiraungkoorskul et al. (2002), que determinaram a CL_{50} 96 h do Roundup[®] em 36 mg/L (sal isopropilamina de glifosato) em tilápia (*O. niloticus*). Baseado nisto, elegeu-se as concentrações de Roundup Original[®] de 3, 6 e 12 mg/L (sal isopropilamina de glifosato) para ensaio agudo com tilápia (*O. niloticus*). A mortalidade atingiu 100% em peixe imerso nas duas maiores concentrações (dados não apresentados), apontando que uma concentração de Roundup[®] <6 mg/L (isopropilamina de glifosato) fosse adequada para o estudo subcrônico.

Considerando que Langiano (2006) detectou alteração histológica em fígado de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando dose subletal de Roundup Original[®] de 7,5 e 10 µL/L (correspondente ao sal isopropilamina de glifosato de 3,6 mg/L e 4,8 mg/L, respectivamente), de formulação do herbicida idêntica em nosso trabalho, avaliou-se a sobrevivência de tilápia (*O. niloticus*) em imersão com Roundup Original[®] de 3, 5 e 7 µL/L (correspondente ao sal isopropilamina de glifosato de 1,4; 2,4 e 3,7 mg/L, respectivamente) (tabela 4). A dose de 5 µL/L (isopropilamina de glifosato 2,4 mg/L) foi selecionada para ensaio subcrônico, já que se tratava da maior dose com sobrevivência de todos os indivíduos.

A literatura relata que a persistência do glifosato na água é menor que no solo (COX, 1998; USDA, 2000) e bastante variável, podendo atingir 1,5 a 3,5 dias (GOLDSBOROUGH; BECK, 1989). Visando simular esta condição, fixou-se a duração da exposição ao Roundup[®] em 3 dias, procedendo 24 h de imersão em Roundup[®] (fluxo de água fechado para manter contato com Roundup[®]), intercalado com 24 h de renovação de água (fluxo de água aberto e sem adição do herbicida), para evitar acúmulo de amônia causado pela alta densidade de peixes no tanque experimental. Çavas e Könen (2007) avaliaram a genotoxicidade induzida por Roundup[®] em peixe-dourado (*Carassius auratus*), procedendo imersão em Roundup[®] nas concentrações de 5, 10 e 15 mg/L (isopropilamina de glifosato) durante 6 dias, trocando-se a água-teste a cada 2 dias. No mesmo experimento, adotou-se densidade de 3,75 g/L água (ÇAVAS; KÖNEN, 2007).

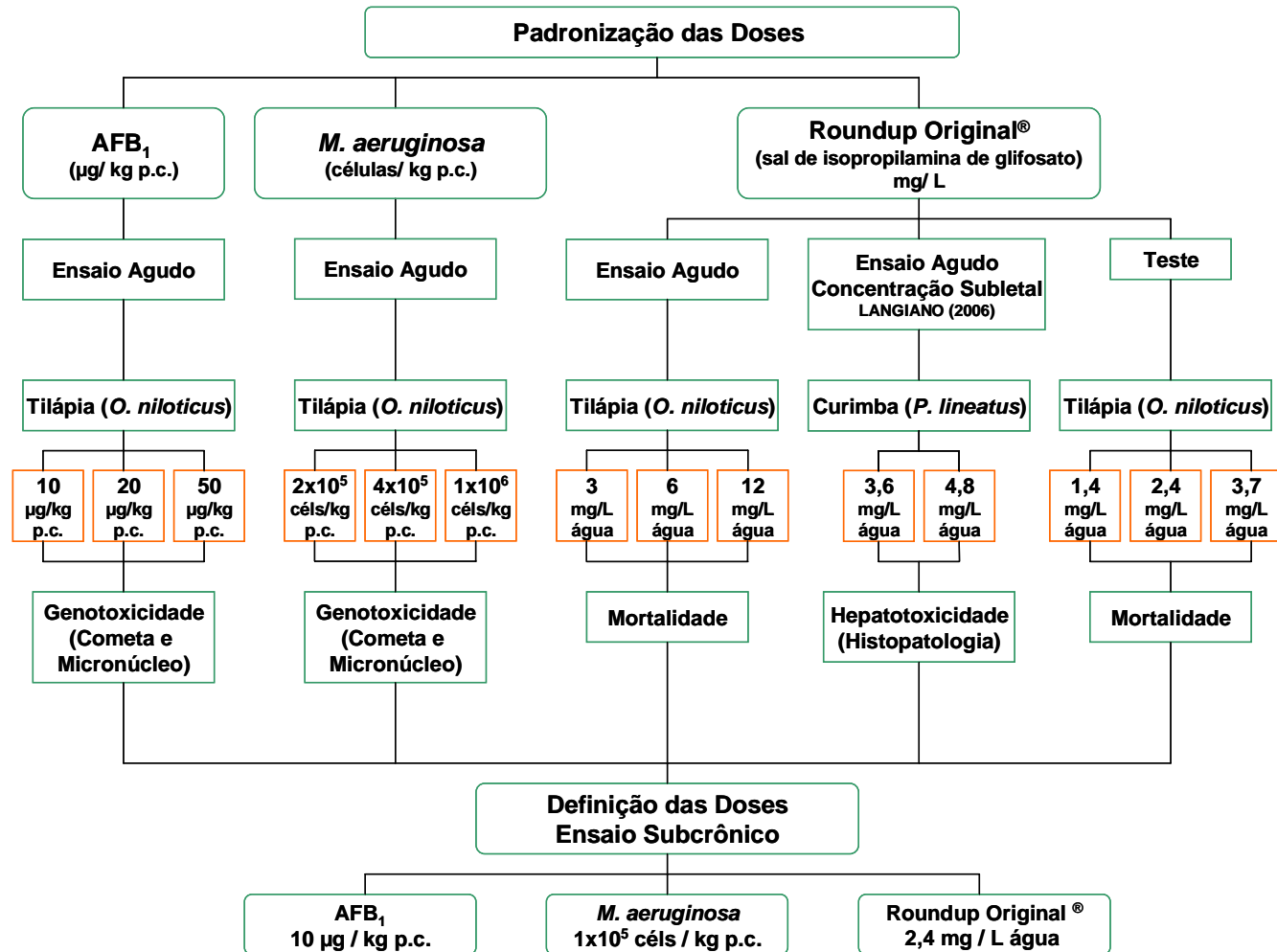


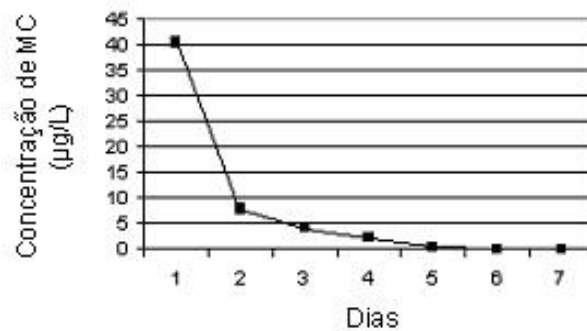
Figura 10 – Fluxograma referente à padronização das doses experimentais de AFB₁, *M. aeruginosa* e Roundup® para ensaio subcrônico com *O. niloticus*.

Tabela 1 – Escore médio de cometa obtido após análise de 100 nucleóides por animal para definição da dose i.p. de aflatoxina B₁ em tilápia

Tratamentos	N	Coleta de Sangue		
		8 h	24 h	48 h
Controle Negativo	6	5,8±2,8 ^{d, A}	7,5±1,9 ^{e, A}	8,3±2,5 ^{e, A}
Ciclofosfamida 20 mg/kg p.c.	6	108,8±12,3 ^{a, A}	100±6,4 ^{b, A}	105,3±10,9 ^{a, A}
AFB ₁ 10 µg/kg p.c.	6	31,3±12 ^{c, A}	44,5±17,5 ^{d, A}	41,7±11,5 ^{d, A}
AFB ₁ 20 µg /kg p.c.	6	53±6,4 ^{b, B}	70,2±6,2 ^{c, A}	62,7±7,1 ^{c, AB}
AFB ₁ 50 µg/kg p.c.	6	95,8±5 ^{a, B}	116,7±8,9 ^{a, A}	89,2±8,8 ^{b, B}

Ciclofosfamida: Controle Positivo

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

**Figura 11** – Concentração de MC em água contaminada com extrato celular de *M. aeruginosa* BCCUSP 262 e monitorada por IC-ELISA durante 7 dias

Fonte: Hashimoto (2002).

Tabela 2 – Escore médio de cometa obtido após análise de 100 nucleóides por animal para definição da dose i.p. de *M. aeruginosa* BCCUSP 262 em tilápia

<i>M. aeruginosa</i>	N	Coleta de Sangue		
		8 h	24 h	48 h
Controle Negativo	6	6,3±5,4 ^{c, A}	5,5±4,6 ^{c, A}	4±3,2 ^{b, A}
2,0 x 10 ⁵ cel/kg	6	33,8±10,1 ^{b, A}	41,2±10 ^{b, A}	46,3±25,9 ^{a, A}
4,0 x 10 ⁵ cel/kg	6	52,3±13,3 ^{a, A}	50,5±12 ^{b, A}	46,2±11,3 ^{a, A}
1,0 x 10 ⁶ cel/kg	6	58,83±7,1 ^{a, A}	66,3±13,2 ^{a, A}	60,5±21,2 ^{a, A}

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Fonte: Hashimoto et al. (2007).

Tabela 3 – MC produzida por *M. aeruginosa* BCCUSP 262 e NPLJ 47

MC	Concentração de MC no liofilizado de <i>M. aeruginosa</i> (µg/g)*		Dose de MC em tilápia p.c.)**	
	BCCUSP 262	NPLJ 47	BCCUSP 262 (100%)	BCCUSP 262 (50%)+NPLJ 47 (50%)
-LR	4,10	3,21	$2,85 \times 10^{-4}$	$2,04 \times 10^{-4}$
-LF	2,46	-	$1,71 \times 10^{-4}$	$0,85 \times 10^{-4}$
-LW	1,63	-	$1,13 \times 10^{-4}$	$0,57 \times 10^{-4}$
7-desmetil-MC- LR	695,18	-	$482,33 \times 10^{-4}$	$241,17 \times 10^{-4}$
MC Total	703,37	3,21	$488,02 \times 10^{-4}$	$244,63 \times 10^{-4}$

(*): MC determinada por *ESI-LCMS* no extrato celular liofilizado de *M. aeruginosa* linhagens BCCUSP 262 e NPLJ 47 (µg MC/g liofilizado)

(**): MC inoculada i.p. em tilápia na dose de 1×10^5 céls de *M. aeruginosa*/kg p.c. (µg MC/kg p.c.)

Tabela 4 – Teste preliminar de mortalidade devido à exposição ao Roundup® em tilápia

Roundup® (µL/L)*	N	Mortalidade					
		1ª exposição		2ª exposição		3ª exposição	
		24 h Roundup®	24 h renovação (água)	24 h Roundup®	24 h renovação (água)	24 h Roundup®	24 h renovação (água)
3	3	-	-	-	-	-	-
5	3	-	-	-	-	-	-
7	3	-	-	-	1	-	1

(*): dose de Roundup® de 3, 5 e 7 µL/L correspondente a 1,4; 2,4 e 3,7 mg/L (sal isopropilamina de glifosato), respectivamente.

A exposição ao Roundup® foi realizada em 3 dias, procedendo 24 h de imersão em Roundup® (fluxo de água fechado para manter contato com Roundup®), intercalado com 24 h de renovação de água (fluxo de água aberto e sem adição do herbicida), para evitar acúmulo de amônia causado pela alta densidade.

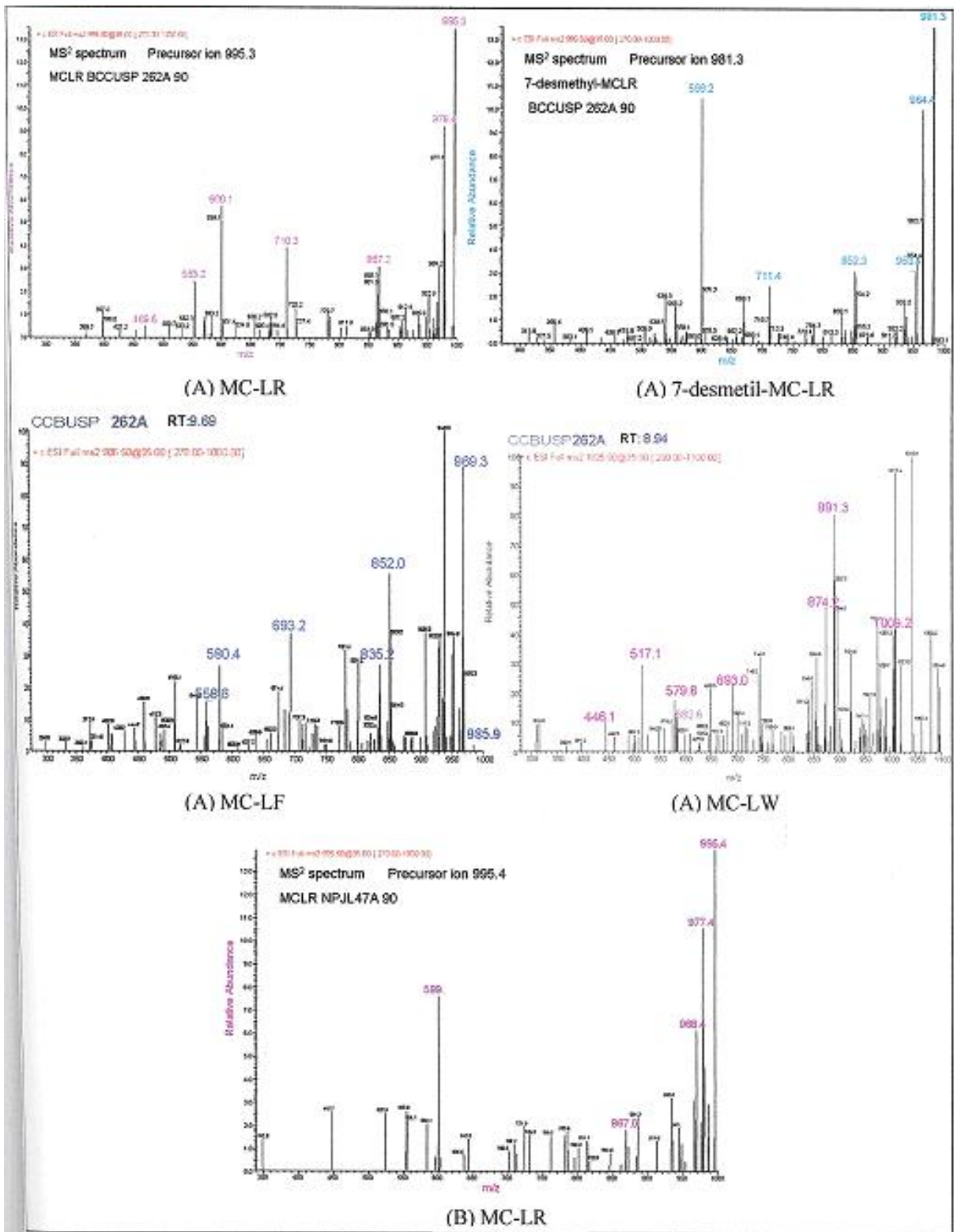


Figura 12 – Espectro de massa para caracterização de MC produzida pelos cultivos liofilizados de *M. aeruginosa* BCCUSP 262 (A) e NPLJ 47 (B) utilizando *ESI-LCMS*.

CAPÍTULO 2

**Genotoxicidade subcrônica induzida por *Microcystis aeruginosa*, aflatoxina B₁
e Roundup[®] em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

CAPÍTULO 2 – Genotoxicidade subcrônica induzida por *Microcystis aeruginosa*, aflatoxina B₁ e Roundup® em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

As tabelas 5 e 6 apresentam, respectivamente, as características físico-químicas da água dos tanques experimentais e de pesqueiros da região de Londrina. As tabelas 7 e 8 apresentam, respectivamente, os resultados obtidos no ensaio cometa e no teste do micronúcleo em sangue de tilápia exposta à aflatoxina B₁, *Microcystis aeruginosa* e Roundup®. A figura 13 representa graficamente os escores médios de cometa, enquanto a figura 14 mostra a frequência de cada classe de cometa (zero a três) correspondente ao escore médio obtido. A figura 15 representa graficamente a frequência média de micronúcleo. As lacunas nas tabelas 7 e 8 e figuras 13, 14 e 15 decorreram de problemas durante o experimento, de forma que a análise estatística no período t₄₃ não foi realizada devido à ausência do controle negativo (CN).

Conforme o monitoramento mensal de aflatoxina em ração utilizada no bioensaio, somente uma amostra, coletada no mês de outubro/2005, apresentou-se positiva para AFB₁ na concentração de 4,8 µg/kg, enquanto nas demais amostras não foi detectada a presença de aflatoxina. Todavia esta concentração esteve abaixo do limite de aflatoxina permitido pela legislação brasileira de 20 µg/kg (ANVISA, 2002). O monitoramento de micotoxinas, realizado entre 1997 a 2001, em 436 amostras de alimentos para consumo animal, provenientes dos estados do PR, SP, SC, RS, MT, MS, MG e GO, detectou zearalenona e aflatoxina como principais contaminantes, apresentando positividade de aflatoxina em 74 amostras de ração de 31,1% (NETTO et al., 2002). Durante o monitoramento de aflatoxina em 42 amostras de ração adquiridas em cinco pesqueiros da região de Londrina-PR, entre março a julho/2001, Hashimoto et al. (2003) constataram positividade em 28,6% das amostras. Os autores constataram aflatoxina em nível não detectável a 15,6 µg/kg, sendo AFB₁ detectada em maior frequência e concentração (n.d. a 13,13 µg/kg), e com 61,9% das amostras apresentando nível de aflatoxina <4 µg/kg (HASHIMOTO et al., 2003). Estes resultados indicam a contaminação com aflatoxina em nível relativamente baixo na alimentação de peixes.

Segundo o Conama (2005), os corpos d'água destinados à pesca ou cultivo de organismos aquáticos para fins de consumo (aqüicultura) pertencem à classe 2, cujos parâmetros de qualidade da água incluem: oxigênio dissolvido (≥ 5 mg/L), pH (6 a 9), amônia ($\leq 3,7$ mg/L) e

nitrito ($\leq 1,0$ mg/L). Castagnolli (1992) cita que o melhor desempenho da tilápia (*O. niloticus*) é obtido com a temperatura da água entre 26 a 28 °C e que, quando a temperatura é inferior a 15 °C, ocorre redução da alimentação. De acordo com a tabela 5, o teor médio de oxigênio dissolvido geral do experimento ($4,7 \pm 0,9$ mg/L) e durante a primeira exposição ao Roundup[®] ($4,4 \pm 0,5$ mg/L) apresentaram-se abaixo do limite recomendado pelo CONAMA (2005). Os demais parâmetros físico-químicos da água no decorrer de 185 dias (t_0 a t_{185}) mantiveram-se em nível aceitável, com temperatura de $23,3 \pm 2,9$ °C, pH de $6,9 \pm 0,2$, amônia de $0,4 \pm 0,4$ mg/L e nitrito de $0,11 \pm 0,14$ mg/L. A média de amônia durante as exposições ao Roundup[®] foi superior em relação à média geral (tabela 5): o nível de amônia atingiu $1,7 \pm 0,3$ mg/L na 1ª exposição ($t_{38, 40, 42}$), diminuindo posteriormente para $0,9 \pm 0,1$ mg/L (2ª exposição $t_{92, 94, 96}$) e $0,5 \pm 0,1$ mg/L (3ª exposição $t_{146, 148, 150}$), devido à redução gradativa na densidade de animais que foram colhidos para análise histológica.

O teor de oxigênio dissolvido, temperatura e pH da água do experimento (tabela 5) situaram-se dentro da faixa de variação natural observada nos pesqueiros da região de Londrina-PR por Pádua (2002) (tabela 6). O teor de nitrito em nosso experimento ($0,11 \pm 0,14$ mg/L, tabela 5) assemelhou-se ao do pesqueiro C ($0,11 \pm 0,13$ mg/L, tabela 6), atingindo maior valor durante exposição ao Roundup[®], devido ao acúmulo de matéria orgânica (tabela 5). O teor de amônia em nosso experimento ($0,4 \pm 0,4$ mg/L, tabela 5) foi inferior ao dos três pesqueiros (tabela 6), mesmo durante a exposição ao Roundup[®]. Pádua (2002) relatou que a elevada incorporação de amônia na água dos pesqueiros decorreu principalmente do arraçamento em excesso, predispondo a florações permanentes nos viveiros e produção de MC.

No contexto geral, o grupo controle negativo (CN) demonstrou escore médio de cometa elevado durante todo o período experimental (tabela 7, figura 13). O fato decorreu provavelmente da alta densidade animal de aproximadamente 5,6 g/L, alocando-se inicialmente 30 peixes ($74,95 \pm 15$ g) por tanque, sendo que se recomenda 1 g/L para ensaio toxicológico (APHA, 1981). A densidade elevada também tem sido descrita em outros experimentos, a exemplo de 3,75 g/L em ensaio para detecção de genotoxicidade induzida por Roundup[®] em peixe-dourado (*C. auratus*) (ÇAVAS; KÖNEN, 2007). Beveridge e McAndrew (2000) admitem densidade entre 25-40 kg/m³ (equivalente a 25-40 g/L) em cultivo intensivo de tilápia, sendo este fator a base de cálculo utilizada em nosso experimento.

Procedendo análise detalhada do escore médio de cometa do CN, pode-se visualizar na figura 14 a classificação de cometa (0, 1, 2 e 3) correspondente aos escores médios obtidos pelo CN. Percebe-se que, embora os escores médios de cometa do CN estivessem elevados (figura 13), apresentaram predominância de classes 0 e 1 (figura 14), com a soma destas classes atingindo frequência relativa >60% durante o período experimental, exceto no período t_{97} . Salienta-se que as classes 0 e 1 apresentam maior probabilidade de reparo, enquanto a classe 3 consiste de dano praticamente irreversível (informação pessoal com Profa. Ilce Cólus). Estes dados foram acompanhados por frequência média de micronúcleo do CN entre $0,3 \pm 0,5$ a $1,2 \pm 1,6$ em 2000 eritrócitos por animal (tabela 8), durante todo o período experimental, indicando que os danos genotóxicos observados no ensaio cometa não representaram danos mutagênicos. Grisolia e Starling (2001) também obtiveram dados semelhantes perante o controle negativo com baixa frequência de micronúcleo em *O. niloticus*.

Avaliando-se no período t_1 o escore médio de cometa (tabela 7, figura 13) e a frequência média de micronúcleo em 2000 eritrócitos por animal (tabela 8, figura 15), observa-se que os animais inoculados i.p. com $10 \mu\text{g AFB}_1/\text{kg p.c.}$ (T1) diferiram significativamente do CN ($p < 0,05$), indicando o potencial mutagênico da AFB_1 . A *International Agency for Research on Cancer* classifica a AFB_1 no grupo 1, i.e. carcinogênico para o homem (IARC, 1993). A genotoxicidade da AFB_1 é desencadeada pela biotransformação hepática, envolvendo o citocromo P450 (CYP 450), formando AFB_1 -epóxido (ABD-ALLAH et al., 1999). Este intermediário reage com o DNA, formando o aducto $\text{AFB}_1\text{-N}^7\text{-Gua}$, o que representa a etapa inicial de carcinogênese induzida por AFB_1 (NAKATSURU et al., 1989). Descreve-se que peixes e aves são extremamente sensíveis à AFB_1 e que a dose efetiva para indução de hepatoma situa-se entre $10\text{-}30 \mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_1 na dieta (WOGAN, 1992b apud OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

O. niloticus mostrou-se relativamente resistente à AFB_1 , já que durante a definição da dose i.p. (capítulo 1) não se relatou morte de animais em $10, 20$ ou $50 \mu\text{g AFB}_1/\text{kg p.c.}$ Tuan et al. (2002) obtiveram sobrevivência de 100% em tilápias alimentadas com dose equivalente a $0,3 \text{ mg AFB}_1/\text{kg p.c.}$, que foi mantida em 97%, quando alimentadas com dose equivalente a $17,3 \text{ mg AFB}_1/\text{kg p.c.}$ O mecanismo de biotransformação da AFB_1 varia amplamente entre espécies e entre indivíduos da mesma espécie (FERREIRA et al., 2006). Apontam-se a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) como espécie extremamente sensível e o bagre-de-canal (*Ictalurus punctatus*) como resistente à AFB_1 (ABD-ALLAH et al., 1999; TUAN

et al., 2002). A susceptibilidade da truta arco-íris se deve à alta atividade do citocromo P450 (CYP 2K1) na biotransformação da AFB₁ em AFB₁-epóxido e à ausência de glutathione S-transferase (GST) constitutiva ou induzida por moduladores, aliada ao lento reparo do aducto AFB₁-DNA (GALLAGHER; EATON, 1995; BAILEY et al., 1996). Em peixes, o principal metabólito da biotransformação da AFB₁ é o AFL, formado pela redutase citosólica NADPH-dependente (GALLAGHER; EATON, 1995), o qual representa um mecanismo de detoxicação, quando conjugado com ácido glucurônico e excretado, mas também de reserva de AFB₁, quando re-convertido à AFB₁ por oxidação microsomal (TROXEL et al., 1997).

No período t₁₈, ocorreu aumento acentuado do escore médio de cometa no tratamento T1 (AFB₁) (figura 13) juntamente com frequência média de micronúcleo de 1,5±1,1 em 2000 eritrócitos por animal (figura 15), demonstrando que os danos genotóxicos avaliados pelo ensaio cometa representaram danos mutagênicos em frequência relativamente baixa, porém superior ao CN (p<0,05). Relata-se que espécies reativas de oxigênio e danos oxidativos no DNA também contribuem para o mecanismo de genotoxicidade desencadeado por AFB₁, sugerindo-se a existência de múltiplas vias na indução de danos causados por esta micotoxina (SHEN et al., 1994; SHEN et al., 1995; SHEN; ONG, 1996; ABD-ALLAH et al., 1999). Madhusudhanan et al. (2004) detectaram que a AFB₁ provocou oxidação, mediada por radicais livres, a lipídeos e proteínas do fígado, rim e cérebro de peixe *rohu* (*Labeo rohita*) inoculado i.p. com dose única de 100 µg AFB₁/100 g p.c. Produtos da peroxidação lipídica, como malonaldeído e diene conjugado, foram detectados em fígado de rato após inoculação i.p. de AFB₁ (100 µg AFB₁/100 g p.c), tendo o malonaldeído atingido pico 3 dias após a inoculação e mantido concentração elevada por até 14 dias (SHEN et al., 1994). Os resultados obtidos em nosso experimento poderiam, portanto, ter ocorrido em resposta ao efeito genotóxico causado por danos oxidativos no DNA.

No período t₉₇ (figura 15), a frequência média de micronúcleo apresentada pelos grupos T2 (*M. aeruginosa* 262), T3 (Roundup), T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T6 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262/47) foi superior ao CN (p<0,05). O mesmo ocorreu em t₁₅₁ nos tratamentos T1 (AFB₁) e T3 (Roundup) (p<0,05) (figura 15). Estes dados sugerem a ocorrência de danos mutagênicos induzidos por exposição subcrônica aos contaminantes testados, seja em condição isolada, como em T1 (AFB₁), T2 (*M. aeruginosa* 262) e T3 (Roundup), ou de associação, como em T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T6 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262/47). O tratamento T5 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262), que empregou dose superior de MC (488,02x10⁻⁴ µg/kg p.c.) em relação ao T6 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262/47) (244,63 x

10^{-4} $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c.), não diferiu estatisticamente do CN. A MC inibe as proteínas serina/treonina fosfatases 1 e 2A, que desempenham papel crítico na progressão do ciclo celular (CAMPOS et al., 1996), sendo o evento diretamente relacionado à atividade promotora de tumor (GOLDBERG et al., 1995; FUJIKI et al., 1996; SEKIJIMA et al., 1999). A genotoxicidade induzida por extrato celular de *Microcystis* spp. contendo MC-LR foi demonstrada pelo Teste de Ames (ensaio *Salmonella typhimurium*), ensaio cometa em hepatócitos de rato e teste do micronúcleo em eritrócitos de camundongo (DING et al., 1999). Além disso, Jos et al. (2005) verificaram aumento da peroxidação lipídica e da atividade enzimática antioxidante (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase) em fígado de tilápia (*Oreochromis* sp.) alimentada com extrato celular de *M. aeruginosa* contendo MC-LR (60 μg MC-LR/peixe/dia), durante 21 dias, sugerindo que o estresse oxidativo participe da toxicidade induzida por MC.

No presente trabalho, utilizou-se o extrato celular de *M. aeruginosa* produtora de MC e não a toxina purificada, visando simular a condição natural de exposição à floração de cianobactérias e, provavelmente, da ocorrência simultânea de microcistina com outros componentes tóxicos, como lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular de cianobactérias. LPS, estruturas características de bactéria Gram-negativa, são geralmente tóxicos, pirogênicos e altamente inflamatórios (WATANABE et al., 1996; CHORUS; BARTRAM, 1999). A exposição de ovo fertilizado de paulistinha (*Danio rerio*) em água contaminada com LPS purificado de cianobactéria inibiu a atividade da GST (BEST et al., 2002). O Teste de Ames demonstrou mutagenicidade induzida por extrato celular de *Microcystis* spp. contendo MC-LR, mas não por MC-LR purificada, sugerindo atividade mutagênica de outros compostos celulares além da MC-LR (DING et al., 1999). Best et al. (2003) relataram que a exposição simultânea de truta arco-íris (*O. mykiss*) a LPS de *E. coli* (i.p.) com suspensão aquosa de extrato celular de *Microcystis* spp. contendo MC-LR aumentou o volume hepático e o conteúdo de água intestinal, sugerindo que a ingestão de LPS bacteriano aumentou a ingestão de água e, conseqüentemente, a exposição à MC, podendo eventualmente aumentar a exposição do peixe a outros toxicantes, como pesticidas.

Conforme a figura 13, no período t_{117} os escores médios de cometa apresentados pelos tratamentos T1 (AFB_1), T2 (*M. aeruginosa* 262), T3 (Roundup), T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T6 (AFB_1 +Roundup+*M. aeruginosa* 262/47) foram superiores ao CN ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu em t_{151} no tratamento T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262) e, em t_{171} , nos tratamentos T2 (*M. aeruginosa* 262), T3 (Roundup), T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262), T5 (AFB_1 +Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T6 (AFB_1 +Roundup+*M. aeruginosa* 262/47) ($p < 0,05$).

Estes dados endossam a genotoxicidade em caráter subcrônico dos contaminantes testados isoladamente, como em T1 (AFB₁), T2 (*M. aeruginosa* 262) e T3 (Roundup), ou em associação, como em T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262), T5 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T6 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262/47). Estes dados sugerem que os testes do cometa e micronúcleo apresentaram sensibilidade para detecção de efeito genotóxico em eritrócitos de peixe exposto a tratamentos subcrônicos com AFB₁, *M. aeruginosa* e Roundup[®].

A concentração de Roundup Original[®] em nosso experimento (isopropilamina de glifosato 2,4 mg/L) foi de 1000-4000 vezes inferior à concentração recomendada pelo fabricante para aplicação a campo na maioria das plantas (isopropilamina de glifosato 2,4–9,6 g/L) (Monsanto do Brasil). Çavas e Könen (2007), expondo peixe-dourado (*C. auratus*) ao Roundup[®] na concentração de 5, 10 e 15 mg/L (sal isopropilamina de glifosato), demonstraram aumento na frequência de micronúcleo, anormalidade nuclear e danos no DNA de eritrócitos após 48, 72 e 96 h. Grisolia (2002) demonstrou aumento na frequência de micronúcleo em eritrócitos de tilápia (*Tilapia rendalli*) 4 dias após a inoculação intra-abdominal de Roundup[®] em doses únicas de 42, 85 e 170 mg/kg p.c. (sal isopropilamina de glifosato). Langiano (2006) detectou que curimba (*P. lineatus*) exposto a doses subletais de Roundup[®], equivalentes a 3,6 e 4,8 mg/L (sal isopropilamina de glifosato), apresentaram alteração histológica em fígado, sendo as mais frequentes: degeneração celular e nuclear, núcleos picnóticos e vacuolização citoplasmática. Observou também aumento das proteínas totais do sangue (em ambas as doses, após 24 h) e da atividade da catalase hepática (em 4,8 mg/L, após 24 h) (LANGIANO, 2006).

Em organismos aquáticos, a fórmula comercial do herbicida apresenta maior toxicidade do que o composto ativo isoladamente (glifosato) (FOLMAR et al., 1979; TSUI; CHU, 2003; MARC et al., 2005), observando-se sinergismo entre glifosato e componentes surfactantes e permeabilizantes da fórmula (MARC et al., 2002; MARC et al., 2004a). Demonstrou-se que herbicidas à base de glifosato interferiram na regulação do ciclo celular do embrião de ouriço-do-mar, por provocarem inibição da síntese de DNA na fase S e, conseqüentemente, inibição da ativação do complexo CDK1/ciclina B, prevenindo a transição das fases G2/M do ciclo celular (MARC et al., 2004a; MARC et al., 2004b). Os autores também relataram que a dose mínima para provocar disfunção no ciclo de pelo menos uma célula foi estimada em 80-120 µM de Roundup Biovert[®] ou Roundup 3plus[®] (equivalente ao sal isopropilamina de glifosato entre 18,2-27,4 mg/L), que corresponde a uma concentração até 500 vezes menor que a recomendada pelo

fabricante para pulverização (40 mM equivalente ao sal isopropilamina de glifosato de 9,1 mg/L), portanto, concluindo que herbicidas à base de glifosato constituem risco a longo prazo para humanos (MARC et al., 2004a). Assim, herbicidas à base de glifosato constituem motivo de preocupação, principalmente devido ao aumento do uso deste herbicida em cultivos de soja resistente (BENBROOCK et al., 2001; MRE, 2007), podendo ser detectado resíduo de glifosato em soja transgênica no Paraná acima do limite permitido pela ANVISA de 10 mg/kg (AEN, 2006).

Sob aspecto geral, a frequência de micronúcleo entre t_{97} a t_{171} tendeu à redução, observada nos tratamentos T2 (*M. aeruginosa* 262), T3 (Roundup), T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262), T5 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T6 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262/47) (figura 15). Esta tendência esteve provavelmente associada ao processo de apoptose, em decorrência de danos cumulativos no DNA incompatíveis com a sobrevivência das células alteradas (seleção celular). No entanto, a viabilidade celular não foi analisada, impossibilitando conclusão a esse respeito.

Tendo em vista a toxicidade dose e tempo dependente induzida por MC (KOTAK et al., 1996; SOLTER et al., 1998), aflatoxina B₁ (GALLAGHER; EATON, 1995; ABD-ALLAH et al., 1999) e Roundup® (GRISOLIA, 2002; MARC et al., 2002; MARC et al., 2004b; MARC et al., 2005), supôs-se a promoção de danos genotóxicos devido à interação entre os toxicantes durante exposição subcrônica em tilápia (figuras 8 e 9). Empregando o teste do cometa e micronúcleo, avaliou-se o dano genotóxico em sangue no decorrer de 185 dias experimentais. Nosso experimento não demonstrou diferença significativa entre os tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6, nem caracterizou qualquer interação sinérgica ou somatória entre AFB₁, *M. aeruginosa* e Roundup® em sangue de tilápia ($p < 0,05$). I.e., o efeito genotóxico induzido nos tratamentos que empregaram associação de contaminantes, T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262), T5 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T6 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262/47), não foi significativamente superior aos demais tratamentos T1 (AFB₁), T2 (*M. aeruginosa* 262) e T3 (Roundup) (tabelas 7 e 8).

No entanto, a avaliação minuciosa do ensaio cometa no período t_{151} (figura 14) mostra que as classes com maior dano (2 e 3) ocorreram com maior frequência nos tratamentos empregando associação, i.e. T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262), T5 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T6 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262/47), sugerindo que a co-exposição à AFB₁, Roundup® e MC poderia aumentar a proporção de nucleóides com danos no DNA classe 2 e 3. Esta constatação poderia ser justificada conforme resultados obtidos por Sekijima et al. (1999). Os autores relataram a

ocorrência de sinergismo tóxico entre iniciador (AFB₁) e promotor de tumor (MC-LR), em rato inoculado i.p. com AFB₁ (0,5 mg/kg p.c.) e, após 2 semanas, com MC-LR (1 µg/kg p.c.) 2x por semana, durante 6 semanas (SEKIJIMA et al., 1999). Hashimoto et al. (2007) também observaram aumento do escore médio de cometa e frequência média de micronúcleo em tilápia (*O. niloticus*) co-exposta à AFB₁ (10 µg/kg p.c.) e extrato celular de *M. aeruginosa* BCCUSP 262 (2x10⁵, 4x10⁵ e 1x10⁶ células/kg p.c.). Este fato sugere o perigo da co-exposição a contaminantes ambientais, devendo-se prosseguir o estudo com ensaios a médio e longo prazo utilizando doses sub-letais próximas à faixa de contaminação natural.

Salienta-se que nossos ensaios de cometa e micronúcleo foram realizados somente em material sanguíneo, não envolvendo células hepáticas. Abd-Allah et al. (1999) observaram no ensaio cometa diminuição de danos no DNA de sangue total, contrastando com danos progressivos no DNA de células hepáticas, após 24 h da inoculação i.p. de AFB₁ (0,5 mg/kg p.c.) em truta (*O. mykiss*), e indicando diferença de genotoxicidade atribuída ao acúmulo de AFB₁ no sistema hepato-biliar. Ding et al. (1999) observaram danos no DNA de hepatócito de rato induzidos por extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR, sendo o bioacúmulo de MC freqüente em fígado de animais aquáticos (FISCHER; DIETRICH, 2000; MAGALHÃES et al., 2001; MAGALHÃES et al., 2003; LI et al., 2004). Diante do exposto, recomenda-se incluir o fígado na avaliação de genotoxicidade subcrônica induzida por AFB₁, *M. aeruginosa* e Roundup[®]. Desta forma, a análise histológica conduzida em tecido hepático poderia elucidar a toxicidade da associação entre AFB₁, *M. aeruginosa* toxigênica e Roundup[®] em tilápia (*O. niloticus*).

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos da água dos tanques durante período experimental.

Parâmetros	Bioensaio			
	Média ± Desvio Padrão (faixa)			
	Geral	Exposição ao Roundup®		
	t ₀ a t ₁₈₅	1 ^a (t _{38, 40, 42})	2 ^a (t _{92, 94, 96})	3 ^a (t _{146, 148, 150})
Oxigênio dissolvido (mg/L)	4,7±0,9 (2,1-6,8)	4,4±0,5 (3,8-5,0)	5,1±0,4 (4,2-5,5)	6,4±0,4 (5,8-6,8)
Temperatura (°C)	23,3±2,9 (17,2-28,6)	25,5±0,1 (25,1-25,4)	21,5±0,1 (21,4-21,6)	18,3±0,2 (18,1-18,5)
Amônia (mg/L)	0,4±0,4 (0,1-2,0)	1,7±0,3 (1,4-2,0)	0,9±0,1 (0,6-0,9)	0,5±0,1 (0,4-0,6)
Nitrito (mg/L)	0,11±0,14 (0,03-0,74)	0,55±0,16 (0,33-0,74)	0,23±0,07 (0,14-0,35)	0,16±0,04 (0,11-0,21)
pH	6,9±0,2 (6,5-7,3)	7,2±0,1 (7,0-7,3)	7,1±0,1 (7,0-7,2)	7,0±0,2 (6,7-7,2)

Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos de água em três pesqueiros da região de Londrina-PR, durante monitoramento realizado no período de 2002 a 2003

Parâmetros	Pesqueiro		
	Média ± Desvio Padrão (faixa)		
	A	B	C
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,3±1,8 (1,2-9,0)	4,8±1,9 (1,0-9,0)	5,2±1,8 (1,4-8,2)
Temperatura (°C)	22,3±4,0 (10-29)	22,2±3,9 (16-28)	22,3±4,5 (10-29)
Amônia (mg/L)	4,5±3,0 (0,6-13,8)	4,7±2,7 (n.d.-11,8)	4,6±2,8 (n.d.-12,8)
Nitrito (mg/L)	0,06±0,07 (n.d.-0,26)	0,10±0,09 (n.d.-0,43)	0,11±0,13 (n.d.-0,75)
pH	6,8±0,5 (5,7-7,8)	7,2± 0,6 (6,3-9,8)	7,4± 0,3 (6,9-8,2)

Fonte: Pádua (2002)
n.d.: não detectado.

Tabela 7 – Escores Médios de Cometa obtidos após análise de 600 nucleóides por tratamento no Ensaio Cometa em sangue de tilápia exposta à AFB₁, Roundup[®] e *M. aeruginosa*

Dias	Escore Médio de Cometa (média ± desvio padrão)						
	Controle	T1 (AF)	T2 (M262)	T3 (R)	T4 (R+M262)	T5 (AF+R+M262)	T6 (AF+R+M262/ 47)
t ₁	19 ± 8 ^b	76 ± 16 ^a	-	-	-	-	-
t ₁₈	54 ± 28 ^b	269 ± 12 ^a	-	-	-	-	-
t ₄₃	-	-	-	170 ± 27	106 ± 31	163 ± 38	157 ± 14
t ₆₃	-	-	-	-	-	-	-
t ₉₇	190 ± 39 ^a	155 ± 21 ^a	174 ± 34 ^a	177 ± 34 ^a	151 ± 35 ^a	196 ± 10 ^a	193 ± 19 ^a
t ₁₁₇	108 ± 16 ^c	177 ± 36 ^{a, b}	181 ± 40 ^{a, b}	222 ± 28 ^a	178 ± 33 ^{a, b}	163 ± 32 ^{b, c}	191 ± 23 ^{a, b}
t ₁₅₁	120 ± 21 ^b	140 ± 24 ^{a, b}	159 ± 32 ^{a, b}	152 ± 45 ^{a, b}	177 ± 23 ^a	165 ± 26 ^{a, b}	168 ± 14 ^{a, b}
t ₁₇₁	101 ± 15 ^b	129 ± 14 ^{a, b}	144 ± 28 ^a	154 ± 33 ^a	145 ± 19 ^a	147 ± 24 ^a	160 ± 15 ^a

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Não consta a estatística em t₄₃ por ausência do valor referente ao Controle.

(-): ausência de dados devido a problemas durante coleta de amostra e/ou processamento da análise.

AF: AFB₁ ip, **M262:** *M. aeruginosa* BCCUSP 262 ip, **R:** Roundup[®] imersão, **M262/ 47:** *M. aeruginosa* BCCUSP 262 e *M. aeruginosa* NPLJ 47 ip.

Tabela 8 – Frequências Médias de Micronúcleo obtidas após análise de 2000 eritrócitos por animal no Teste do Micronúcleo em sangue de tilápia exposta à AFB₁, Roundup[®] e *M. aeruginosa*.

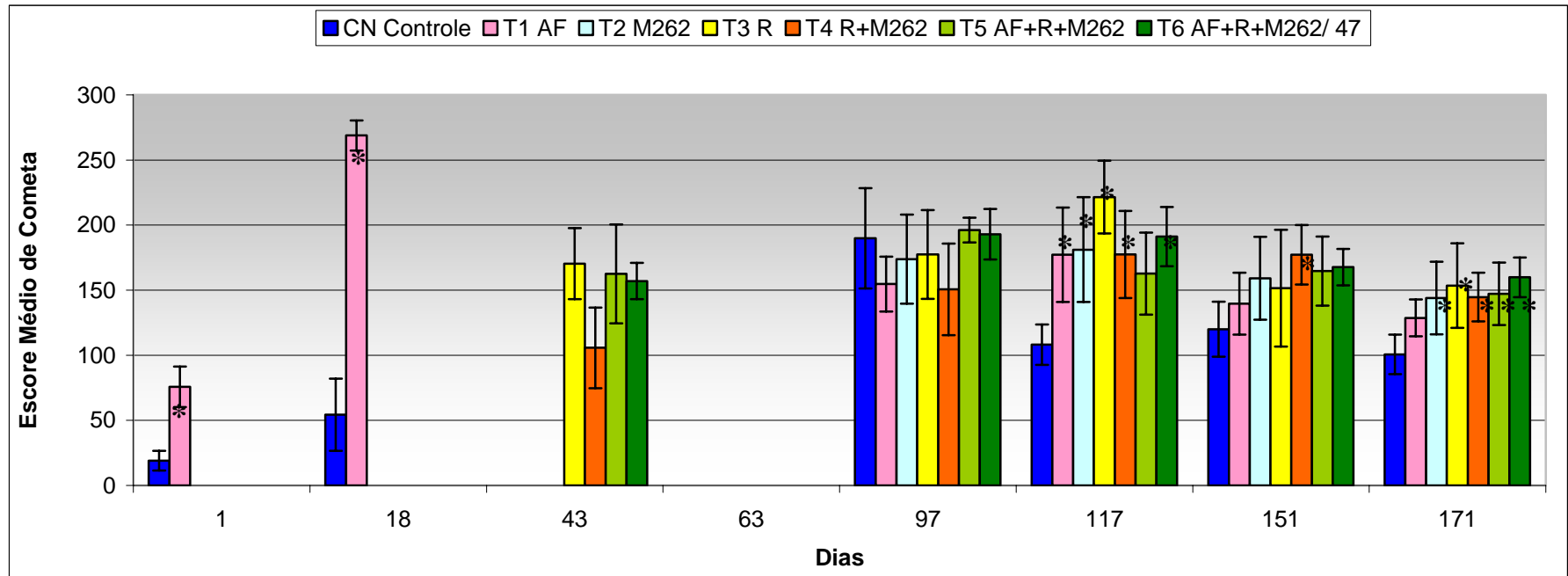
Dias	Frequência Média de Micronúcleo (média ± desvio padrão)						
	Controle	T1 (AF)	T2 (M262)	T3 (R)	T4 (R+M262)	T5 (AF+R+M262)	T6 (AF+R+M262/ 47)
t ₁	1,2 ± 1,6 ^b	11,3 ± 3,9 ^a	-	-	-	-	-
t ₁₈	0,3 ± 0,5 ^b	1,5 ± 1,1 ^a	-	-	-	-	-
t ₄₃	-	-	-	0,3 ± 0,5	1,5 ± 1,5	2 ± 1,4	1,7 ± 2,3
t ₆₃	0,5 ± 0,8 ^a	-	1,2 ± 1 ^a	-	0,8 ± 1 ^a	0,3 ± 0,5 ^a	0,3 ± 0,5 ^a
t ₉₇	0,7 ± 1,2 ^d	0,8 ± 1 ^{c, d}	5,2 ± 2,2 ^a	3,7 ± 1,9 ^{a, b, c}	3,8 ± 0,8 ^{a, b}	2,2 ± 1,6 ^{b, c, d}	6 ± 2,1 ^a
t ₁₁₇	-	-	-	-	-	-	-
t ₁₅₁	0,7 ± 0,5 ^c	3,3 ± 1 ^{a, b}	2,3 ± 1,2 ^{a, b, c}	4,3 ± 1,4 ^a	0,8 ± 0,4 ^c	1,7 ± 1,2 ^{b, c}	1,7 ± 1,9 ^{b, c}
t ₁₇₁	0,3 ± 0,5 ^a	1,8 ± 2,3 ^a	1,5 ± 1,6 ^a	2,3 ± 2,5 ^a	2,3 ± 1,5 ^a	1,7 ± 0,8 ^a	0,7 ± 0,8 ^a

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Não consta a estatística em t₄₃ por ausência do valor referente ao Controle.

(-): ausência de dados devido a problemas durante coleta de amostra e/ou processamento da análise.

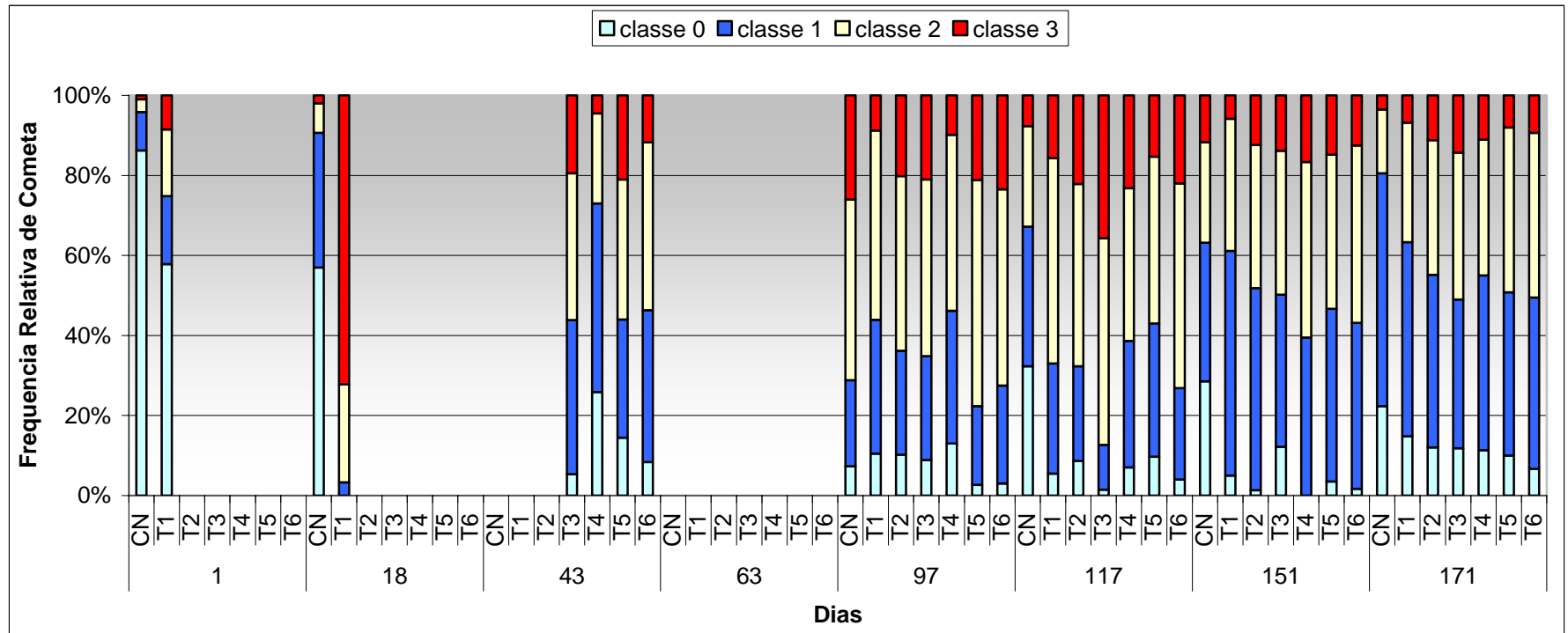
AF: AFB₁ ip, **M262:** *M. aeruginosa* BCCUSP 262 ip, **R:** Roundup[®] imersão, **M262/ 47:** *M. aeruginosa* BCCUSP 262 e *M. aeruginosa* NPLJ 47 ip.



(*) tratamento que difere do CN pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

AF: AFB₁ ip, M262: *M. aeruginosa* BCCUSP 262 ip, R: Roundup[®] imersão, M262/ 47: *M. aeruginosa* BCCUSP 262 e *M. aeruginosa* NPLJ 47 ip.

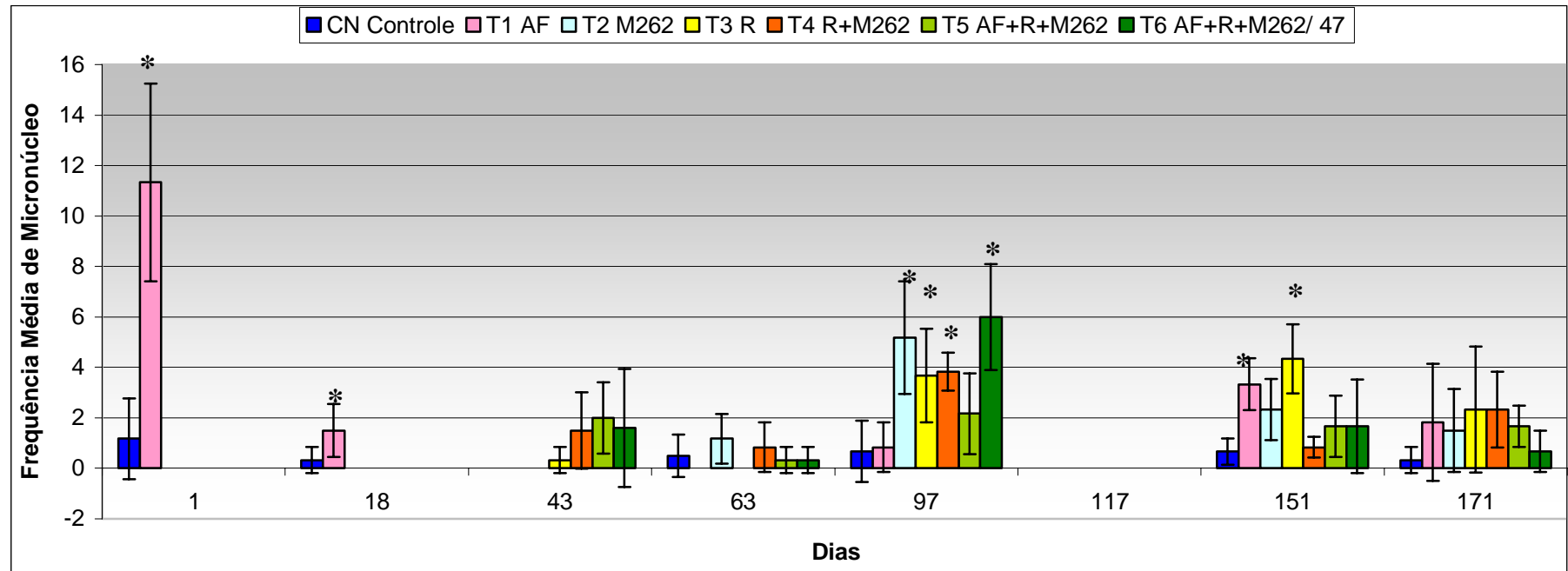
Figura 13 – Escores Médios de Cometa obtidos após análise de 600 nucleóides por tratamento no Ensaio Cometa em sangue de tilápia exposta à AFB₁, Roundup[®] e *M. aeruginosa*



Classificação de cometa em classes 0, 1, 2 e 3.

CN: Controle, T1: AFB₁ ip, T2: *M. aeruginosa* BCCUSP 262 ip, T3: Roundup[®] imersão, T4: Roundup[®] imersão + *M. aeruginosa* BCCUSP 262 ip, T5: AFB₁ i.p.+ Roundup[®] imersão + *M. aeruginosa* BCCUSP 262 ip, T6: AFB₁ ip + Roundup[®] imersão + *M. aeruginosa* BCCUSP 262 e *M. aeruginosa* NPLJ 47 ip.

Figura 14 – Frequências relativas de classes de cometa obtidas após análise de 600 nucleóides por tratamento no Ensaio Cometa em sangue de tilápia exposta à AFB₁, Roundup[®] e *M. aeruginosa*



(*): tratamento que difere do CN pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

AF: AFB₁ ip, M262: *M. aeruginosa* BCCUSP 262 ip, R: Roundup[®] imersão, M262/ 47: *M. aeruginosa* BCCUSP 262 e *M. aeruginosa* NPLJ 47 ip.

Figura 15 – Frequências médias de micronúcleo obtidas após análise de 2000 eritrócitos por animal no Teste do Micronúcleo em sangue de tilápia exposta à AFB₁, Roundup[®] e *M. aeruginosa*

NOTA DE PESQUISA

**Histopatologia em tecido hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)
exposta a *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 262**

Nota de Pesquisa – Histopatologia em tecido hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposta a *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 262

A tabela 9 apresenta a alteração histológica em fígado de tilápia inoculada i.p. com *M. aeruginosa* BCCUSP 262 (T2) e a tabela 10 mostra o peso dos animais durante o período experimental.

As tilápias apresentaram leve redução de movimento natatório e diminuição no apetite 24 h após inoculação i.p. de AFB₁ (10 µg/kg p.c) e de *M. aeruginosa* BCCUSP 262 isolada (488,02x10⁻⁴ µg MC/kg p.c.) ou associada com NPLJ 47 (244,63x10⁻⁴ µg MC/kg p.c.). Variavelmente, tilápias (*Oreochromis* sp.) alimentadas com extrato de *M. aeruginosa* (60 µg MC-LR/peixe/dia) durante 21 dias não apresentaram diferença no movimento natatório ou apetite (JOS et al., 2005). Ressalta-se que a via oral constitui a rota de exposição natural do peixe à MC e AFB₁ e, provavelmente, a via de exposição eleita em nosso experimento, i.e. inoculação intraperitoneal, esteve associada à alteração comportamental.

Conforme a tabela 10, o peso médio dos animais do tratamento T1 (AFB₁), T2 (*M. aeruginosa* 262), T3 (Roundup), T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262), T5 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T6 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262/ 47) não diferiu do grupo controle negativo (CN) ao final do experimento. Li et al. (2004) observaram inibição do crescimento de carpas (*C. carpio* L.) alimentadas com extrato de *Microcystis* spp. (equivalente a 50 µg MC/kg p.c.) em ensaio subcrônico de 28 dias, relatando graves alterações ultraestruturais no fígado, como perda de junção celular, edema de organelas endomembranas (retículo endoplasmático, mitocôndria e aparelho de Golgi) e vacuolização do citoplasma, capazes de desencadear necrose hepática. No entanto, a dose de 50 µg MC/kg p.c. foi extremamente superior à utilizada em nosso ensaio, i.e. 488,02x10⁻⁴ µg MC/kg p.c. no T2 (*M. aeruginosa* 262), T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T5 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262) e 244,63x10⁻⁴ µg MC/kg p.c. no tratamento T6 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262/ 47) (capítulo 1, tabela 3).

O tecido hepático, renal, branquial e muscular de tilápia foi coletado em todos os tratamentos no período t₇₇, t₁₃₁ e t₁₈₅ (figura 9), correspondendo a 15 dias após a última inoculação de *M. aeruginosa*. Até o momento, foi analisado o tecido hepático coletado em t₇₇, referente ao animal controle (CN) e inoculado i.p. com *M. aeruginosa* BCCUSP 262 na dose de

1×10^5 células/kg p.c. (T2), sob execução da Me. Ana Paula M. E. Santos e orientação da Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense.

O CN não apresentou alteração histológica, enquanto o T2 (*M. aeruginosa* 262) apresentou distúrbios circulatórios, alteração morfológica de hepatócitos (picnose, ausência de núcleo, megalocitose), infiltrado inflamatório (células mononucleares, melanomacrófagos, células granulocíticas), necrose e, mais frequentemente, apoptose (tabela 9, dados não publicados). Estes dados condizem com os descritos por Fischer e Dietrich (2000) em carpa (*C. carpio*) alimentada com dose subletal única de *M. aeruginosa* toxigênica PCC 7806 (equivalente a 400 µg MC-LR/kg p.c.). Após ingestão, as cianobactérias sofrem lise estomacal, sendo a MC absorvida principalmente no lúmen intestinal e conduzida até o fígado por receptores de ácidos biliares, onde inibe a atividade das PF1 e 2 A (RUNNEGAR et al., 1981; ERIKSSON et al., 1990; FALCONER, 1991; RUNNEGAR et al., 1993). O desencadeamento de hiperfosforilação de proteínas funcionais causa perda na integridade do citoesqueleto, conduzindo à necrose ou apoptose dos hepatócitos, sendo o mecanismo provavelmente envolvido na promoção de tumor hepático (MACKINTOSH et al., 1990; MATSUHIMA et al., 1990; YOSHIZAWA et al., 1990; GOLDBERG et al., 1995; FUJIKI et al., 1996). A mortalidade em peixe intoxicado com MC tem sido atribuída principalmente à necrose hepática, diferindo-se da freqüente hemorragia intrahepática em mamífero (FALCONER et al., 1994; TENCALLA et al., 1994; CARBIS et al., 1997; FISCHER; DIETRICH, 2000). Solter et al. (1998) postularam que alterações histológicas em fígado, ex. apoptose e vacuolização, seriam decorrentes de indução lenta de hepatotoxicidade provocada por inibição prolongada da proteína fosfatase, enquanto necrose e hemorragia intrahepática seriam características de toxicidade aguda.

As alterações histológicas constatadas em fígado de tilápia exposta à *M. aeruginosa* BCCUSP 262 (T2) reforçaram os dados de genotoxicidade induzida em sangue apresentados no capítulo 2. Dessa forma, a análise histológica conduzida em tecido hepático poderia elucidar a toxicidade da associação entre AFB₁, *M. aeruginosa* e Roundup® em tilápia (*O. niloticus*).

Tabela 9 – Análise histológica em fígado de tilápia exposta à *M. aeruginosa* BCCUSP 262 no período t₇₇.

Alterações Histológicas*	Características	Proporção (N= 6)
Congestão passiva de veia centrolobular, hepatopâncreas ou capilares sinusóides	Discreta e focal	3/6
	Moderada e focal	3/6
Morfologia dos hepatócitos	Normais mesclados a picnóticos	6/6
	Megalocitose moderada e multi-focal	1/6
	Mal delimitados e com núcleo	4/6
	Mal delimitados e sem núcleo	2/6
Infiltrado Inflamatório Mononuclear	Discreto e focal	3/6
	Moderado e focal	1/6
	Intenso e multi-focal	1/6
Infiltrado de Células Granulocíticas	Discreto e focal	2/6
	Intenso e multi-focal	2/6
Presença de Melanomacrófagos	Discreta e multi-focal	4/6
	Moderada e multi-focal	1/6
Apoptose e/ ou figuras apoptóticas	Moderada e multi-focal	4/6
Necrose	Discreta e focal	4/6
	Moderada e focal	1/6

(*) observadas 15 dias após inoculação i.p. de *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 262 na dose de 1×10^5 células/kg p.c. (dados não publicados, sob execução da Me. Ana Paula M. E. Santos e orientação da Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense).

Tabela 10 – Peso médio de tilápia exposta em ensaio subcrônico à AFB₁, Roundup[®] e *M. aeruginosa*

Dias	N	Peso Médio (g) (média ± desvio padrão)						
		Controle	T1 (AF)	T2 (M262)	T3 (R)	T4 (R+M262)	T5 (AF+R+M262)	T6 (AF+R+M262/ 47)
t ₁₈	6	88 ± 12	93 ± 24	83 ± 22	84 ± 12	78 ± 15	87,3 ± 22,2	97,0 ± 28,2
t ₄₃	6	119 ± 19	121 ± 23	116 ± 14	118 ± 39	120 ± 15	135,3 ± 30,9	110,6 ± 13,6
t ₆₃	6	130 ± 22	124 ± 14	128 ± 34	133 ± 21	131,9 ± 40,4	109,0 ± 18,4	125,6 ± 23,2
t ₉₇	6	-	-	-	-	-	-	-
t ₁₁₇	6	131 ± 26	134 ± 17	140 ± 34	117 ± 26	129,4 ± 16,9	146,6 ± 35,6	114,7 ± 14,1
t ₁₅₁	6	146 ± 53	118 ± 24	111 ± 18	115 ± 26	116,3 ± 16,5	145,5 ± 48,0	127,3 ± 15,4
t ₁₇₁	6	152 ± 54	125 ± 30	115 ± 18	127 ± 21	124,2 ± 25,8	144,0 ± 47,8	124,2 ± 9,9

Não houve diferença estatística entre os tratamentos experimentais no mesmo período.

(-): ausência de dados devido a problemas com equipamento.

AF: AFB₁ ip, **M262:** *M. aeruginosa* BCCUSP 262 ip, **R:** Roundup[®] imersão, **M262/ 47:** *M. aeruginosa* BCCUSP 262 e *M. aeruginosa* NPLJ 47 ip.

6 CONCLUSÃO

A genotoxicidade e mutagenicidade induzida por exposição subcrônica à AFB₁, *M. aeruginosa* e Roundup[®] em tilápia (*O. niloticus*) foi demonstrada, respectivamente, pelo teste do micronúcleo e ensaio do cometa em sangue, não sendo observada diferença estatística nos tratamentos que utilizaram associação, como em T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262), T5 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T6 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262/47), em relação aos demais tratamentos T1 (AFB₁), T2 (*M. aeruginosa* 262) e T3 (Roundup).

No entanto, pôde-se observar no final do experimento (t₁₅₁) uma tendência de maior frequência de cometa classe 2 e 3 nos tratamentos que utilizaram associação, como T4 (Roundup+*M. aeruginosa* 262), T5 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262) e T6 (AFB₁+Roundup+*M. aeruginosa* 262/47), sugerindo o perigo da co-exposição a contaminantes ambientais, devendo-se prosseguir o estudo com ensaios a médio e longo prazo utilizando doses sub-letais próximas a faixa de contaminação natural.

REFERÊNCIAS

AL-SABTI, K. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. **Cytobios**, v.47, p.147-154, 1986.

ABD-ALLAH, G.A.; EL-FAYOUMI, R.I.; SMITH, M.J.; HECKMANN, R.A.; O'NEILL, K.L. A comparative evaluation of aflatoxina B₁ genotoxicity in fish models using the comet assay. **Mutation Research**, v.446, p.181–188, 1999.

AEN – AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTÍCIAS DO GOVERNO DO PARANÁ. Emater propõe ampliação de produção e lucratividade da piscicultura. Publicado em 02/02/2005. Acesso: <<http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=943>> em 28 de abril de 2007. 2005.

AEN – AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTÍCIAS DO GOVERNO DO PARANÁ. Soja transgênica do PR tem resíduo de agrotóxico acima do permitido. Publicado em 23/08/2006. Acesso: <<http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=23023>> em 23 de maio de 2007. 2006.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p.121-135, 1995.

AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v.25, n.4, p.589-593, 2002.

AMMIDA, N. H. S.; MICHELI, L.; PALLESCHI, G. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxina B₁ in barley. **Analytica Chimica Acta**, v.520, p.159-164, 2004.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Acesso: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/g01.pdf>>, em 23 de maio de 2007. 2007.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RDC Nº 274, de 15 de outubro de 2002. Acesso: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1653&word=>>>, em 23 de maio de 2007. 2002.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 15 ed. Washington D.C., 1981.

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

BAILEY, G.S.; WILLIAM, D.E.; HENDRICKS, J.D. Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. **Environmental Health Perspectives**, v.104, n.1, p.5-21, 1996.

BAYLIS, A. D. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weakness and prospects. **Pest Manag. Sci.**, v.56, p.299-308, 2000.

BENBROOK, C.M. Troubled times amid commercial success for roundup ready soybeans. AgBioTech InfoNet Technical Paper n.4, 2001. Acesso:<<http://www.biotech-info.net/troubledtimes.html>> em 13 set 2006. 2001.

BEST, J.H.; EDDY, F.B.; CODD, G.A. Effects of *Microcystis* cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Aquatic Toxicology**, v.64, n.4, p.419-426, 2003.

BEST, J.H.; PFLUGMACHER, P.; WIEGAND, C.; EDDY, F.B.; METCALF, J.S.; CODD, 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.

BEVERIDGE, M.C.M.; McANDREW, B.J. In: Tilapias: Biology and Exploitation. Eds. BEVERIDGE, M.C.M.; McANDREW, B.J. Fish and Fisheries Series n.25. Kluwer Academic Publishers. 2000.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Development of *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and its taxonomic implications. **Algological Studies**, v.99, p.29-37, 2000.

BOECK, M.D.; TOUIL, N.; VISSCHER, G.D.; VANDE, P.A.; VOLDERS, M.K. Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. **Mutat. Res.**, v.469, p.181-197, 2000.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M.; FURUYA, W.M.; MEURER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1391-1396, 2001.

BRAGA, P.B.; TEIXEIRA, V.R.; CHAMMAS, R. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. In: DAN LINETZKY WAITZBERG (Ed.). *Dieta, Nutrição e Câncer*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, p.79-87, 2004.

CAMARGO, S.G.O.; POUHEY, J.L.O.F. Aquicultura – um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.11, n.4, p.393-396, 2005.

CAMPOS, M.; FADDEN, P.; ALMS, G.; QIAN, Z.; HAYSTEAD, T.A.J. Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.45, p.28478–28484, 1996.

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 Diseases**, v.20, p.81-91, 1997.

CARLSON, D. B., WILLIAMS, D. E., SPITSBERGEN, J. M., ROSS, P. F., BACON, C. W., MEREDITH, F. I., AND RILEY, R. T. Fumonisin B₁ promotes aflatoxina B₁ and *N*-Methyl-*N'*-nitronitrosoguanidine-initiated liver tumors in rainbow trout. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.172, p.29–36, 2001.

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

CARMICHAEL, W.W. Toxic *Microcystis* and the environment. In: WATANABE, M.F.; HARADA, K.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (Eds.). *Toxic Microcystis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p.1-11, 1996.

CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.7, 2001.

CARNEIRO, P.C.F.; MARTINS, M.I.E.G.; CYRINO, J.E.P. Estudo de caso de criação comercial de tilápia vermelha em tanques-rede – avaliação econômica. **Inf. Econ.**, v.29, n.3, p.52-61, 1999.

CASTAGNOLLI, N. Criação de peixes de água doce. Jaboticabal, FUNEP, 189 pp., 1992.

ÇAVAS, T.; KÖNEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, p.1-6, 2007.

CHIAVARO, E.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; BIANCARDI, A.; GAMBARELLI, E.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. **Journal of Chromatography A**, v.937, p.31-40, 2001.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E & FN Spon on behalf of WHO, London, 416 pp., 1999.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2005.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. Mycotoxins and phytoalexins. CRC Press, p.103-143, 1991.

COX, C. Glyphosate (Roundup). **J. Pestic. Reform**, v.18, p.3-17, 1998.

COX, C. Glyphosate. **J. Pestic. Reform**, v.24, n.4, p.10-15, 2004.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F.D.; COELHO, R.S.; PEREIRA, J.D.; DALSENTER, P.R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v.142, p.45-52, 2003.

DIDTAQ – DIRETORIA DE DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA. Aquicultura. Presidência da República Federativa do Brasil.. Acesso: <<http://200.198.202.145/seap/didtaq/html2/index.html>>, em 28 de abril de 2007. 2007.

DING, W-X.; SHEN, H-M.; ZHU, H-G.; LEE, B-L.; ONG, C-N. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. **Mutation Research**, v.442, p.69-77, 1999.

ELER, M.N.; CECCARELLI, P.S.; BUFON, A.G.M.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Mortandade de peixes (matrinxã, *Brycon cephalus*, e pacu, *Piaractus mesopotamicus*) associada a uma floração de cianobactérias em pesque-pague, município de Descalvado, Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.14, p.35-45, 2001.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. A EMBRAPA e a Aqüicultura. Demandas e prioridades de pesquisa. Eds. QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C. Brasília : **Embrapa Informação Tecnológica**, 35 pp., 2002.

ERIKSSON, J.E.; GRÖNBERG, L.; NYGÅRD, S.; SLOTTE, J.P.; MERILUOTO, J.A. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR a cyclic peptide toxin. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1025, n.1, p.60-66, 1990.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.; O'NEIL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v.339, p.37-59, 1995.

FALCONER, I. R. Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae. In: Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Ed. I.R. FALCONER. Academic Press, London, p.165-176, 1993.

FALCONER, I.R. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v.6, p.177-184, 1991.

FALCONER, I.R.; BURCH, M.D.; STEFFENSEN, D.A.; CHOICE, M.; COVERDALE, O.R. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v.9, n.2, p.131-139, 1994.

FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.2, n.1, p.43-50, 2005.

FENECH, M; HOLLAND, N.; CHANG, W.P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The human micronucleus Project – an international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damages in humans. **Mutat. Res.**, v.428, p.271-283, 1999.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H.F.; MONTEIRO, M.C. Aflatoxinas: um risco à saúde humana e animal. *Ambiência. Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais*, v.2, n.1, 2006.

FISCHER, W.J.; DIETRICH, D.R. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.164, p.73-81, 2000.

FOLMAR, L.C.; SANDERS, H.O.; JULIN, A.M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environm. Contain. Toxicol.*, v.8, p.269-278, 1979.

FUJIKI, H.; SUEOKA, E.; SUGANUMA, M. Carcinogenesis of microcystins. In: WATANABE, M.F.; HARADA, K.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (Eds.): *Toxic Microcystis*. Boca Raton, Florida, CRC Press, p.203-232, 1996.

GALLAGHER, E.P.; EATON, D.L. In vitro biotransformation of aflatoxina B₁ (AFB₁) in channel catfish liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.132, p.82-90, 1995.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. ACADCOM, 66 pp., 2005.

GARDEN, S. R.; STRACHAN, N. J. C. Novel colorimetric immunoassay for the detection of aflatoxin B₁. *Analytica Chimica Acta*, v.444, p.187-191, 2001.

GOLDBERG, J., HUANG, H., KWON, Y., GREENGARD, P., NAIRN, A.C., KURIYAN, J. Three dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*, v.376, p.745-753, 1995.

GOLDSBOROUGH, L.G.; BECK, A.E. Rapid dissipation of glyphosate in small forest ponds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.18, p.537-544, 1989.

GONTIJO, A.M.M.C.; BARRETO, R.E.; SPEIT, G.; REYES, V.A.V.; VOLPATO, G.L.; SALVADORI, D.M.F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat Res.*, v.534, n.1-2, p.165-172, 2003.

GRADELET, S.; LE BON, A-M.; BERGÈS, R.; SUSCHETET, M.; ASTORG, P. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B₁-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B₁ metabolism. **Carcinogenesis**, v.19, n.3, p.403-411, 1998.

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.

GRISOLIA, C.K.; STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, v.491, p.39-44, 2001.

HARADA, K.; MURATA, H.; QIANG, Z.; SUZUKI, M.; KONDO, F., Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. **Toxicon**, v.34, n.6, p.701-710, 1996.

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

HASHIMOTO, E.H. Interação microcistina-fumonisina-aflatoxina e o impacto na piscicultura. Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina. 115 pp. 2002.

HASHIMOTO, E.H.; HASEGAWA, M.; SANTOS, A.P.M.; VANZELLA, T.P.; FRANCOBANDIERA, A.I.; CÓLUS, I.M.S.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; ITANO, E.N.; ONO, E.Y.S.; KURODA, E. Biomonitoring assay in analysis of co-occurring microcystin and aflatoxin in aquaculture. XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Istanbul, Turquia, junho de 2007.

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, n.1, p.123-132, 2003.

HAYASHI, C. Breves considerações sobre as tilápias. In: RIBEIRO, R.P.; HAYASHI, C.; FURUYA, W.M. (Eds.) Curso de piscicultura – Criação racional de tilápias, p.4, 1995.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N., SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutat.Res.**, v.399, p.125-133, 1998.

HIROOKA, E.Y.; PINOTTI, M.H.P.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA. **Natural Toxins**, v.7, p.103-109, 1999.

HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S.; UENO, Y. The natural occurrence of fumonisin in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v.13, p.173-183, 1996.

HOOSER, S.B.; BEASLEY, V.R.; WAITE, L.L.; KUKLENSCHMIDT, M.S.; CARMICHAEL, W.W.; HASCHEK, 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.

HUISMAN, J.; MATTHIJS, H.C.P.; VISSER, P.M. In: Harmful Cyanobacteria. Eds. Huisman, J.; Matthijs, H.C.P.; Visser, P.M Aquatic Ecology Series, v.3. Springer, 241p. 2005.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, p.101-134, 2001.

HUWIG, A. FREIMUND, S.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v.122, p.179-188, 2001.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Aflatoxins. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v.56, p.245-395, 1993.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Estatística da Pesca 2005. Brasil Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília, 2007. 108 p. 2007.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUAETRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia. **Science Asia**, v.28, p.121-127, 2002.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; MELO FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v.338, n.13, p.873-878, 1998.

JOHNSON, W.W.; GUENGERICH, F.P. Reaction of AFB₁ exo-8,9-epoxide with DNA: kinetic analysis of covalent binding and DNA-induced hydrolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.6121-6125, 1997.

JOS, A.; PICHARDO, S.; PRIETO, A.I.; REPETTO, G.; VÁZQUEZ, C.M.; MORENO, I.; CAMEÁN, A.M. Toxic cyanobacterial cells containig microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v.72, n.3, p.261-271, 2005.

KAMOGAE, M. HASHIMOTO, E.H.; PÁDUA, C.G.; SOARES, F.S.; BRACARENSE, A.P.F.L.; YABE, M.J.S.; ONO, E.Y.S.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; SANT'ANA, C.L.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; UENO, Y., HARADA, K-I., HIROOKA, E.Y. Monitoring microcystin and physicochemical parameters: role of agricultural-aquaculture activity in the water quality. In: *Mycotoxins and Phycotoxins – Advances in determination, toxicology and exposure management*. Eds. NJAPAU, H., TRUJILLO, S.; EGMOND, H.P.V.; PARK, D.L. Wageningen Academic Publishers, p.321-331, 2006.

KICHOU, F; WALSER, M.M. The natural occurrence of aflatoxina B₁ in Moroccan poultry feeds. **Vet. Human Toxicol**, v.35, n.2, p.105-8, 1993.

KJÆR, J.; OLSEN, P.; ULLUM, M.; GRANT, R. Leaching of glyphosate and amino-methylphosphonic acid from Danish agricultural field sites. **J. Environ. Qual.**, v.34, p.608–620, 2005.

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 Comm.**, v.3, p.103-115, 1995.

KOTAK, B.G.; SEMALULU, S.; FRITZ, D.L.; PREPAS, E.E.; HRUDEY, S.E.; COPPOCK, R.W. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicon**, v.34, n.5, p.517-525, 1996.

LAMB, D.C.; KELLY, D.E.; HANLEY, S.Z.; MEHMOOD, Z.; KELLY, S.L. Glyphosate is an inhibitor of plant cytochrome P450: functional expression of *Thlaspi arvensae* Cytochrome P45071B1/Reductase Fusion Protein in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.244, p.110-114, 1998.

LAMBERT, T.W.; BOLAND, M.P.; HOLMES, C.F.B., HRUDEY, S.E. Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphate bioassay. **Environ. Sci.Tecnol.**, v.28, n.4, p.753-755, 1994.

LANGIANO, V.C. Toxicidade do Roundup e seus efeitos para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. 62 pp. 2006.

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

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.

LOVSHIN, L.L. Tilapia farming: a growing worldwide aquaculture industry. IN: Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Peixes, v.1, 1997. Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: CBNA, p.137, 1997.

LOVSHIN, L.L.; CYRINO, J.E.P. Status of commercial freshwater fish culture in Brazil. In: Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes, v.2. 1998, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: CBNA, p.1-20. 1998.

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

MACKINTOSH, R.W.; DALBY, K.N.; CAMPBELL, D.G.; COHEN, P.T.W.; COHEN, P.; MACKINTOSH, C. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. **FEBS Lett.**, v.371, p.236– 240, 1995.

MADHUSUDHANAN, N.; KAVITHALAKSHMI, S.N.; SHANMUGASUNDARAM, K.R.; SHANMUGASUNDARAM, E.R.B. Oxidative damage to lipids and proteins induced by aflatoxin B₁ in fish (*Labeo rohita*) – protective role of Amrita Bindu. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.17, p.73-77, 2004.

MAEDA, H.; SILVA, P.C.; AGUIAR, M.S.; MACHADO, D.; PADUA, C.; OLIVEIRA, R.P.C.; MACHADO, N.P.; RODRIGUES, V.; SILVA, R.H. Efeitos da densidade de estocagem na segunda alevinagem de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), em sistema *raceway*. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.3, p.265-272, 2006.

MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba bay (Brazil, RJ). **Toxicon**, v.42, p.289-295, 2003.

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, p.1077-1085, 2001.

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.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Embrapa Meio Ambiente. Problemas e oportunidades. Acesso:<
<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/index.php3?sec=aquic:::29>>, em 21 de maio de 2007.
2007.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88 publicada no Diário Oficial da União em 09 de novembro de 1988, Seção I, p.21.968, 1988.

MARC, J.; BELLÉ, R.; MORALES, J.; CORMIER, P.; MULNER-LORILLON, O. Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. **Toxicological Sciences**, v.82, p.436-442, 2004 (b).

MARC, J.; BRETON, M.L.; CORMIER, P.; MORALES, J.; BELLÉ, R.; MULNER-LORILLON, O. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. **Toxicology and Pharmacology**, v.203, p.1-8, 2005.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BELLÉ, R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biology of the Cell**, v.96, p.245-249, 2004 (a).

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BOULBEN, S.; HUREAU, D.; DURAND, G.; BELLÉ, R. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chem. Res. Toxicol.**, v.15, p.326-331, 2002.

MATSUHIMA, R.; YOSHIGAWA, S.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.; FURUSAWA, M.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. *In vitro* and *in vivo* effects of protein phosphatases inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.171, n.2, p.867-874, 1990.

McELHINEY, J.; LAWTON, L.A.; PORTER, A.J.R. Detection and quantification of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) with recombinant antibody fragments isolated from a naïve human phage display library. **FEMS Microbiology Letters**, v.193, p.83-88, 2000.

MELO, M. M.; NASCIMENTO, E. F.; OLIVEIRA, N. J. F. Intoxicação de bovinos por aflatoxina B₁ presente em polpa cítrica: relato de um surto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.6, 1999.

MERCANTE, C.T.J.; COSTA, S.V.; SILVA, D.; CABIANCA, M.A.; ESTEVES, K.E. Qualidade da água em pesque-pague da região metropolitana de São Paulo (Brasil): avaliação através de fatores abióticos (período seco e chuvoso). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.27, n.1, p.1-7, 2005.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R. Digestibilidade aparente de alguns alimentos protéicos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1801-1809, (Supl. 2) 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNASA. Portaria nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000. **Norma de qualidade da água para consumo humano**. 32 pp. 2001. Acesso:<
<http://www.opas.org.br/ambiente/UploadArq/port1469.pdf>>, em 23 de maio de 2007. 2001.

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

MIYAJI, C.K.; JORDÃO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; CÓLUS, I.M.S. Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the Comet assay. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.1, p.108-114, 2004.

MOHAMED, Z.A.; HUSSEIN, A.A. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: a laboratory study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.63, n.3, p.424-429, 2006.

MRE - MINISTÉRIO DAS RELAÇÕES EXTERIORES. Noticiário – Seleção Diária de Notícias Nacionais – 22/Maio/2007. Avanço da soja transgênica amplia uso de glifosato. Valor Econômico. 23/04/2007. Acesso:<
http://www.mre.gov.br/portugues/noticiario/nacional/selecao_detalhe3.asp?ID_RESENHA=331713>, em 22 de Maio de 2007. 2007.

NAKATSURU, Y.; QIN, X.; MASAHITO, P.; ISHIKAWA, T. Immunological detection of *in vitro* aflatoxin B₁-DNA adduct formation in rats, rainbow trout and coho salmon. **Carcinogenesis**, v.11, n.9, p.1523-1526, 1989.

NEAL, G.E. Genetic implications in the metabolism and toxicity of mycotoxins. **Toxicology Letters**, v.82-83, p.861-867, 1995.

NETTO, D.P.; ZANLUCHI, A.T.; SASSAHARA, M.; YANAKA, E.K. Micotoxinas em alimentação animal no período de maio/1997 a março/2001 no Laboratório de Toxicologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina – Londrina – PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v.23, n.1, p.63-69, 2002.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGUNUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.118, n.6, p.420-424, 1992.

O GLOBO. Análise da Feema revela: peixes das lagoas da Barra estão contaminados. Tilápias, vendidas na Ceasa, têm toxina acima do recomendado para consumo. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2007.

OLIVEIRA C.A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: câncer hepático celular. **Saúde Pública**, v.31, n.4, p.417-424, 1997.

ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y. Hazards of *Fusarium verticillioides*, a mycotoxigenic fungus. In: KUSHWAHA, R.K.S. (Ed.) Fungi in Human and Animal Health. Scientific Publishers, p.355-385, 2002.

ONO, E.Y.S.; SUGIURA, Y.; HOMECHIN, M.; KAMOGAE, M.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic condition on natural mycoflora and fumonisin in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.147, n.3, p.139-148, 1999.

ONO, E.Y.S.; SASAKI, E.Y.; HASHIMOTO, E.H.; HARA, L.N.; CORRÊA, B.; ITANO, E.N.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisina contamination. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.11, p.1081-1090, 2002.

PÁDUA, C.G. Monitoramento na qualidade das águas destinadas à piscicultura no município de Londrina. Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 136 pp. 2002.

PAERL, H.W.; TUCKER, C.S. Ecology of blue-green algae in aquaculture ponds. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.26, n.2, p.109-131, 1995.

PARANHOS, R. Alguns Métodos para Análise da Água. Cadernos Didáticos UFRJ, n.19, Rio de Janeiro, 200 pp., 1996.

POPMA, T.J.; PHELPS, R.P. Status report to commercial tilapia producers on monosex fingerling productions techniques. In: AQUICULTURA BRASIL'98, Recife. *Anais...* Recife: SIMBRAQ, p.127-145, 1998.

RAMOS, A.J.; HERNÁNDEZ, E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. **Animal Feed Science Technology**, v.65, p.197-206, 1997.

RANEY, K.D.; SHIMADA, T.; KIM, J.D-H.; GROOPMAN, J.D.; HARRIS, T.M.; GUENGERICH, F.P. Oxidation of aflatoxins and sterigmatocystin by human liver microsomes: significance of aflatoxin Q₁ as a detoxication product of aflatoxin B₁. **Chem. Res. Toxicol.**, v.5, p.202-210, 1992.

RASTOGI, S.; DAS, M.; KHANNA, S.K. Quantitative determination of aflatoxin B₁-oxime by column liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*, v.933, n.1-2, p.91-97, 2001.

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 emend. Elekin. **Proceedings and Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B. Biological Sciences**, v.293, n.1068, p.419-477, 1981.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. In: **Mutagênese Ambiental**. Ed. ULBRA. 356 pp, 2003.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of Gen. Microbiol.**, v.111, p.1-61, 1979.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.1-11, 2002.

RUBIO, F.; VELDHUIS, L.J.; CLEGG, B.S.; FLEEKER, J.R.; HALL, J.C. Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for glyphosate determinations in water. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.691-696, 2003.

RUNNEGAR, M.T.; FALCONER, I.R. Effects of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. **Toxicon**, v.24, n.2, p.109-115, 1986.

RUNNEGAR, M.T.; FALCONER, I.R.; SILVER, J. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. **Archives of Pharmacology**, v.317, p.268-272, 1981.

RUNNEGAR, M.T.; KONG, S.; BERNDT, M. Protein phosphatase inhibition and *in vivo* hepatotoxicity of microcystins. **Am. J. Physiol**, v.265, p.224-230, 1993.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, n.1, p.1-12, 2000.

SCHUETTE, J. Environmental Fate of Glyphosate. Environmental Monitoring & Pest Management. Department of Pesticide Regulation, California, 1998.

SCUDAMORE, K.A.; HETMANSKI, M.T., CHAN, H.K., COLLINS, S. Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. **Food Addit Contam.**, v.14, n.2, p.157-73, 1997.

SEAP – SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA. Aqüicultura no Brasil. Presidência da República Federativa do Brasil. Acesso:<
http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/aqui/>, em 28 de abril de 2007. 2007.

SEKIJIMA, M.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, T.; HARADA, T.; TASHIRO, F.; CHEN, G.; YU, S-Z.; UENO, Y. Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by microcistin-LR in aflatoxin B₁-iniciated rats. **Carcinogenesis**, v.20, n.1, p.161-165, 1999.

SHEN, H.M.; ONG, C.N. Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis. **Mutation Research**, v.366, n.1, p.23-44, 1996.

SHEN, H.M.; ONG, C.N.; LEE, B.L.; SHI, C.Y. Aflatoxin B₁-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. **Carcinogenesis**, v.16, n.2, p.419-422, 1995.

SHEN, H.M.; SHI, C.Y.; LEE, H.P.; ONG, C.N. Aflatoxin B₁-induced peroxidation in rat liver. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.127, n.1, p.145-150, 1994.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SOARES, L.M.V.; RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods using multi-toxin thinlayer chromatographic method. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v.72, n.1, p.22-26, 1989.

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

SOLTER, P.F.; WOLLENBERG, G.K.; HUANG, X.; CHU, F.S.; RUNNEGAR, M.T. Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. **Toxicological Sciences**, v.44, p.87-96, 1998.

SONG, L.; SANO, T.; LI, R.; WATANABE, M.M.; LIU, Y.; KAYA, K. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. **Phycological Research**, v.46, p.19-23, 1998.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology, DNA-repair Protocols: Eucaryotic Systems*. v.113, 1999.

TAKAHASHI, N.; MIRANDA, C.L.; HENDERSON, M.C.; BUHLER, D.R.; WILLIAMS, D.E.; BAILEY, G.S. Inhibition of *in vitro* aflatoxin B₁- DNA binding in rainbow trout by CYP1A inhibitors: α -naphthoflavone, β -naphthoflavone and trout CYP1A1 peptide antibody. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.110C, n.3, p.273-280, 1995.

TANAKA, M.A.S.; MAEDA, J.A.; PLAZAS, I.H.A.Z. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. **Scientia Agricola**, v.58, n.3, p.501-508, 2001.

TAVARES, L.H.S. Utilização de biofiltros em sistemas de cultivo de peixes. **Informe Agropecuário**, v.21, n.203, p.28-43, 2000.

TENCALLA, F. G.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol**, v.30, p.215–224, 1994.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J-C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

TROXEL, C.M.; REDDY, A.P.; O'NEAL, P.E.; HENDRICKS, J.D.; BAILEY, G.S. *In vivo* aflatoxin B₁ metabolism and hepatic DNA adduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.143, p.213-220, 1997.

TSUI, M.T.K.; CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v.52, p.1189-1197, 2003.

TU, M.; HURD, C.; RANDALL, J.M. In: Weed Control Methods Handbook: Tools and Techniques for Use in Natural Areas. Wildland Invasive Species Program. The Nature Conservancy, 2001.

TUAN, N.A.; GRIZZLE, J.M.; LOVELL, R.T.; MANNING, B.B.; ROTTINGHAUS, G.E. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B₁. **Aquaculture**, v.212, p.311-319, 2002.

UENO, Y. Mycotoxins in food. In: KROGH, P. (Ed.). Toxicological Aspects on Food. Elsevier Science, p.139-204, 1991.

UENO, Y.; YABE, T.; HASHIMOTO, H.; SEKIJIMA, M.; MASUDA, T.; KIM, D.J.; HASEGAWA, R. Enhancement of GST-P positive liver foci by nivalenol, a trichotecene mycotoxin. **Carcinogenesis**, v.13, p.787-791, 1992.

ULUPINAR, M; OKUMUS, I. Detection of mutagenic-carcinogenic pollutants in aquatic systems using cytogenetic methods in fish. **Turk. J. Zool.**, v.26, p.141-148, 2002.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Glyphosate Herbicide Information Profile. Forest Service Pacific Northwest Region, 2000.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006. Acesso:<<http://www.epa.gov/OGWDW/dwh/t-soc/glyphosa.html>>, em 25 de maio de 2007. 2006.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Registration eligibility document, Glyphosate, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC., 1993.

WANG, J-S.; GROOPMAN, J.D. DNA damage by mycotoxins. **Mutation Research**, v.424, p.167–181, 1999.

WATANABE, M.F.; HARADA, K-I.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. In: Toxic *Microcystis*. (Eds.) WATANABE, M.F.; HARADA, K-I.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. 262 pp. 1996.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Glyphosate. Environmental Health Criteria. Publication n° 159, Geneva, Switzerland, 1994.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking-water quality. 2nd ed. Geneva: WHO; 1993.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites - a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.203, p.201-218, 2005.

WILLIAMS, G.M.; KROES, R.; MUNRO, I.C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.31, p.117-165, 2000.

WOGAN, G.N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.374, p.123-137, 1992 (b).

WOGAN, G.N. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. **Cancer Research**, v.52, p.2114-2118, 1992 (a).

XAVIER, M.B. *Euglena sanguinea* Ehrenberg bloom in a fish-breeding tank (Pindamonhangaba, São Paulo, Brazil). **Algol. Stu.**, v.62, p.133-142, 1991.

YOSHIZAWA, S.; MATSUHIMA, R.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.; ICHIHARA, A.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. Inhibition of protein phosphatase by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. **J. Cancer Res. Cli. Oncol.**, v.116, p.609-614, 1990.

YU, S-Z. Drinking water and primary liver cancer. In: TANG, Z.Y.; WU, M.C.; XIA, S.S. (Eds.): Primary Liver Cancer. China Academic Publishers, Beijing Springer-Verlag, Berlin, p.30-37, 1989.

YU, S-Z. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.10, p.674-682, 1995.

ZHANG, L.; ZHAO, S.; DEANS ZIRATTU, S.; LEE, E.Y.C. Mutagenesis of the catalytic subunit of rabbit muscle protein phosphatase-1. **Mol. Cell. Biochem.**, v.127, p.113-119, 1993.