

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS

VINÍCIUS DE CARVALHO SOARES DE PAULA

**AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE E ECOTOXICIDADE DO  
EXTRATO BRUTO DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2016

VINÍCIUS DE CARVALHO SOARES DE PAULA

**AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE E ECOTOXICIDADE DO  
EXTRATO BRUTO DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA***

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais, do Departamento Acadêmico de Química e Biologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial de obtenção do grau de tecnólogo.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane Martins de Freitas.

CURITIBA

2016

**VINÍCIUS DE CARVALHO SOARES DE PAULA**

**AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE E ECOTOXICIDADE DO  
EXTRATO BRUTO DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA***

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

**Membro 1 – PROF. DR<sup>a</sup>. LUCIA REGINA ROCHA MARTINS**  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

**Membro 2 – PROF. DR<sup>a</sup>. MARLENE SOARES**  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

**Orientador – PROF. DR<sup>a</sup>. ADRIANE MARTINS DE FREITAS**  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

**Coordenador de Curso – PROF. Me ALESSANDRO FEITOSA MACHADO**

Curitiba, 25 de novembro de 2016.

Esta Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado sabedoria, paciência e determinação para enfrentar as dificuldades que encontrei pelo caminho.

À minha família, pelo apoio incondicional, carinho, compreensão e dedicação.

À Laura, por me apoiar sempre, ter paciência, companheirismo, amor e carinho.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por me proporcionar uma formação gratuita e de qualidade.

À Pró-Reitoria de Graduação e Educação Profissional (PROGRAD - UTFPR) pela concessão da Bolsa Auxílio TCC via Programa de Bolsas de Fomento às Ações de Graduação.

À professora Adriane Martins de Freitas, pelas oportunidades, ensinamentos, dedicação e confiança.

À professora Marlene Soares, pela disponibilização dos respirômetros e ajuda valiosa com os experimentos, além de aceitar participar da banca avaliadora.

À professora Lúcia Regina Rocha Martins, pelas oportunidades e por aceitar ser banca avaliadora.

À professora Wanessa Algarte Ramsdorf, pelas contribuições como banca avaliadora do tcc I.

À Joicy, pela ajuda com os cultivos de *M. aeruginosa*, dedicação e parceria.

À Rhaissa, pela ajuda com os ensaios com *D. subspicatus*.

Aos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR, Camila, Eliane, Juliana, Luís, Monike, Regiane, Rhaissa, e Yorrannys, pela convivência, apoio, respeito e bons momentos.

Ao Instituto Ambiental do Paraná, pela oportunidade de realizar estágio em suas dependências e flexibilização de meus horários para a realização deste trabalho.

Aos queridos do Laboratório de Ecotoxicologia IAP, Elenize Motter, Márcia Bosa e Rhael Saporiti, por todo apoio, confiança, amizade e valiosas contribuições para minha formação.

Às colegas de estágio, Mazepa e Michelle, pela amizade, apoio, paciência e boas risadas.

À Viviane, pela amizade, incentivo e protocooperação desde o início da graduação.

Aos meus amigos, em especial, aos da graduação e da Colônia Rosariana, pelo apoio, boas conversas e momentos.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Obrigado a todos, vocês fizeram deste trabalho realidade.

*“I tell you folks, it’s harder than it looks. It’s a long way to the top if you wanna rock and roll. If you think it’s easy doing one night stands, try play in a rock roll band. It’s a long way to the top if you wanna rock and roll” (SCOTT, Bon; YOUNG, Angus e YOUNG, Malcolm 1975).*

## RESUMO

PAULA, Vinícius de Carvalho Soares de. **Avaliação da fitotoxicidade e ecotoxicidade do extrato bruto de *Microcystis aeruginosa***. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso – Tecnologia em Processos Ambientais. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Florações de cianobactérias causadas pela espécie *Microcystis aeruginosa*, produtora da toxina microcistina-LR, ocorrem frequentemente em corpos hídricos eutrofizados, podendo causar danos a organismos aquáticos e plantas terrestres. Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a fitotoxicidade aguda em *Lactuca sativa* (alface) e *Sinapis alba* (mostarda), a ecotoxicidade aguda em *Daphnia magna* e crônica em *Desmodesmus subspicatus* do extrato bruto de *M. aeruginosa*, obtido a partir de cultivo em laboratório. Nos ensaios de fitotoxicidade foram avaliados: germinação e crescimento radicular, ainda, foi medida a produção de CO<sub>2</sub> pelo método respirométrico. Os testes de toxicidade aguda com *D. magna* e crônica com *D. subspicatus* foram realizados de acordo com as normas ABNT 12713:2016 e 12648:2011, respectivamente. O extrato bruto de *M. aeruginosa* inibiu significativamente o crescimento das radículas de mostarda com  $p < 0,01$  no Teste T de Student, esta resposta pode estar relacionada à inibição de fitormônios que regulam o desenvolvimento inicial. Enquanto que para as sementes de alface não houve inibição no alongamento radicular, possivelmente ligado à oxidação, por enzimas detoxificantes, da microcistina-LR ou outros metabólitos secundários. Na respirometria a inibição do desenvolvimento inicial em mostarda foi confirmada com menor produção de CO<sub>2</sub> comparada ao controle negativo. Em alface foi observada alteração na taxa respiratória, evidenciando efeitos fisiológicos em seu desenvolvimento. Em *D. magna* o extrato bruto de *M. aeruginosa* foi tóxico apenas em sua forma pura, causando 76% de imobilidade. Para *D. subspicatus* houve inibição do crescimento nas concentrações de 25%, 50% e 100% de extrato.

**Palavras-chave:** Cianobactéria. *Lactuca sativa*. *Sinapis alba*. *Daphnia magna*. *Desmodesmus subspicatus*.

## ABSTRACT

PAULA, Vinícius de Carvalho Soares de. **Evaluation of phytotoxicity and ecotoxicity of crude extract of *Microcystis aeruginosa***. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso – Tecnologia em Processos Ambientais. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Cyanobacterial blooms caused by the species *Microcystis aeruginosa*, producer of the microcystin-LR toxin, occur frequently in eutrophic water bodies, can cause damage to aquatic organisms and terrestrial plants. The objective of this work was to evaluate the acute phytotoxicity in *Lactuca sativa* (lettuce) and *Sinapis alba* (mustard), the acute ecotoxicity in *Daphnia magna* and chronic in *Desmodesmus subspicatus* of the crude extract of *M. aeruginosa* obtained from laboratory culture. In the phytotoxicity assays, germination and root growth were evaluated, and CO<sub>2</sub> production was measured by the respirometric method. The acute toxicity tests with *D. magna* and chronic *D. subspicatus* were performed according to ABNT standards 12713: 2016 and 12648: 2011, respectively. The crude extract of *M. aeruginosa* significantly inhibited the growth of mustard rootlets with  $p < 0.01$  in the Student's T-Test, this response may be related to inhibition of phytohormones that regulate the initial development. While for the lettuce seeds there was no inhibition in root elongation, possibly linked to oxidation, by detoxifying enzymes, microcystin-LR or other secondary metabolites. In the respirometry the inhibition of the initial development in mustard was confirmed with lower CO<sub>2</sub> production compared to the negative control. In lettuce it was observed a change in the respiratory rate, evidencing physiological effects in its development. In *D. magna* the crude extract of *M. aeruginosa* was toxic only in its pure form, causing 76% immobility. For *D. subspicatus* there was inhibition of growth in concentrations of 25%, 50% and 100% of extract.

**Keywords:** Cyanobacterium. *Lactuca sativa*. *Sinapis alba*. *Daphnia magna*. *Desmodesmus subspicatus*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
2.1 OBJETIVO GERAL .....	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	9
3.1 EUTROFIZAÇÃO DE CORPOS HÍDRICOS .....	9
3.2 CIANOBACTÉRIAS.....	10
3.3 CIANOTOXINAS .....	12
3.4 LEGISLAÇÃO.....	14
3.5 MONITORAMENTO ECOTOXICOLÓGICO .....	16
3.5.1 <i>Sinapis alba</i> .....	18
3.5.2 <i>Lactuca sativa</i> .....	19
3.5.3 <i>Daphnia magna</i> .....	20
3.5.4 <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	21
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	23
4.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Microcystis Aeruginosa</i> ...23	
4.2 TESTE DE FITOTOXICIDADE AGUDA COM <i>L. sativa</i> E <i>S. alba</i> .....	23
4.3 ANÁLISE RESPIROMÉTRICA DE <i>L. sativa</i> E <i>S. alba</i> .....	25
4.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>D. magna</i> .....	27
4.5 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM <i>D. subspicatus</i> .....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
5.1 TESTE DE FITOTOXICIDADE AGUDA COM <i>L. sativa</i> E <i>S. alba</i> .....	29
5.2 ANÁLISE RESPIROMÉTRICA DE <i>L. sativa</i> E <i>S. alba</i> .....	33
5.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>D. magna</i> .....	36
5.4 TESTE DE ECOTOXICIDADE CRÔNICA EM <i>D. subspicatus</i> .....	37
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41
<b>APÊNDICE</b> .....	49
<b>ANEXOS</b> .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de eutrofização artificial é um problema ambiental causado por influência antrópica, desencadeado pelo excesso de nutrientes e matéria orgânica em ambientes aquáticos, que propicia o crescimento descontrolado de fitoplâncton, conhecido como floração. Este fato gera desequilíbrio entre os organismos da cadeia alimentar e causa altas taxas de mortalidade, as quais ocorrem devido ao consumo de oxigênio dissolvido durante a decomposição de matéria orgânica.

Quando estas florações são predominantemente compostas por cianobactérias, que são microrganismos procarióticos fotossintetizantes, pode ocorrer o fenômeno conhecido como floração tóxica. Algumas espécies de cianobactérias produzem metabólitos secundários, chamados de cianotoxinas, que podem ser altamente tóxicos ao ser humano e animais em geral.

As cianotoxinas são divididas em três grupos principais, conforme os danos causados em mamíferos: dermatoxinas (atacam pele e mucosas), neurotoxinas (agem no sistema nervoso central) e hepatotoxinas (células do fígado e enzimas fosfatases). As hepatotoxinas são as mais estudadas por apresentarem alta incidência global, elevada toxicidade, danos à saúde humana, prejuízos econômicos e ambientais.

A espécie *Microcystis aeruginosa* apresenta como subproduto de metabolismo, predominantemente, a microcistina-LR, considerada a mais tóxica dentre as hepatotoxinas. Devido à recorrência de contaminações em águas de abastecimento e o possível uso na irrigação de áreas agrícolas, assim como os efeitos sobre espécies zooplanctônicas e fitoplanctônicas, são necessários estudos que considerem a importância ambiental dos efeitos desta cianotoxina em plantas terrestres e organismos aquáticos.

Nesse sentido, foram empregados ensaios ecotoxicológicos agudos em *Daphnia magna*, crônicos em *Desmodesmus subspicatus*, e de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Sinapis alba* (mostarda) para avaliar germinação, alongamento de raiz e produção de CO<sub>2</sub> durante o desenvolvimento inicial. Estes testes foram ferramentas importantes para demonstrar os danos causados aos organismos e populações expostas a águas contaminadas por *M. aeruginosa*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a fitotoxicidade aguda em *Lactuca sativa* e *Sinapis alba*, a ecotoxicidade aguda em *Daphnia magna* e crônica em *Desmodesmus subspicatus*, do extrato bruto de *Microcystis aeruginosa*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a fitotoxicidade aguda do extrato bruto de *Microcystis aeruginosa*, obtido a partir de cultivo em laboratório, em sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Sinapis alba* (mostarda), utilizando ensaio de germinação e alongamento de raiz;

Avaliar o efeito da presença ou ausência de luz em ensaio de germinação e alongamento de raiz com *Lactuca sativa* e *Sinapis alba*;

Comparar efeitos de substratos diferentes, papel filtro e ágar bacteriológico, em ensaio de germinação e alongamento de raiz em *Lactuca sativa* e *Sinapis alba*;

Avaliar a produção de CO<sub>2</sub> através do método respirométrico durante o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* e *Sinapis alba* expostas a extrato bruto de *Microcystis aeruginosa*;

Avaliar a ecotoxicidade aguda e crônica do extrato bruto de *Microcystis aeruginosa* em *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus*, respectivamente.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 EUTROFIZAÇÃO DE CORPOS HÍDRICOS

Segundo Smol (2009), eutrofização é o processo de aumento da concentração de nutrientes em um ecossistema aquático. Na definição de Brönmark e Hansson (2005), a eutrofização é o aumento da concentração de fósforo em lagos e lagoas devido a incorporação de esgoto doméstico ou fertilizantes agrícolas, por exemplo. Também pode ser definida como um processo que torna o ecossistema mais produtivo, devido ao enriquecimento de nutrientes, que estimula a produção primária (DODDS, 2002; BATTARBEE, 2010).

Há dois tipos de classificação quanto à eutrofização, a natural e a artificial. A eutrofização natural ocorre devido ao acúmulo de nutrientes transportados ao longo do tempo pelo curso da água ou chuvas. Já a eutrofização artificial ou cultural, ocorre por influência antrópica e se desenvolve pelo incremento de fósforo e nitrogênio (ESTEVES, 1998). É um processo considerado relativamente rápido e de difícil reversão, recorrente em áreas com moderada a alta densidade de atividades humanas que geram perturbações em bacias hidrográficas, como desmatamento e liberação de efluentes com alta carga de matéria orgânica (DODDS, 2002).

Este processo artificial pode ser considerado uma forma de poluição, pois altera significativamente as características químicas e físicas do meio, gerando um aumento na produtividade do ecossistema (ESTEVES, 1998). Fósforo e Nitrogênio são elementos limitantes na produção primária de ecossistemas aquáticos, visto que são nutrientes essenciais ao processo de fotossíntese (BRÖNMARK; HANSSON, 2005; SMOL, 2009). O aumento desses elementos desencadeia um grande crescimento nas populações de produtores primários, que são as algas, bactérias autotróficas e cianobactérias (SMOL, 2009). Quando ocorre a eutrofização artificial, o equilíbrio homeostático do meio é perdido, ou seja, a relação entre as taxas de produção, consumo e decomposição de matéria orgânica é modificada, portanto, o ecossistema passa a produzir mais do que pode consumir e decompor (ESTEVES, 1998).

A alteração das relações de equilíbrio no ecossistema possibilita o aparecimento de florações de algas ou cianobactérias, ou seja, o crescimento descontrolado desses organismos causado pelo excesso de nutrientes presentes no meio (BRÖNMARK; HANSSON, 2005). Algumas florações podem gerar compostos tóxicos, produzidos por cianobactérias, que são nocivos aos ecossistemas aquáticos (OREN, 2013). Esses organismos se tornam os produtores primários dominantes, o que pode estar relacionado a mecanismos que conferem competição interespecífica, como por exemplo: toxicidade, morfologia e baixa qualidade alimentar que oferecem a possíveis predadores (CHISLOCK et al., 2013).

A alta densidade de cianobactérias faz com haja diminuição da penetração de luz na água, aumentando sua turbidez (LEJTINIEMI; ÖST; VIITASALO, 2005), levando também ao aumento do pH (CHISLOCK, et al., 2013). Pode ocorrer mortalidade de peixes, pelo aumento do pH, e redução do crescimento ou morte de macrófitas submersas com folhas flutuantes, em função da diminuição da disponibilidade de luz (ESTEVES, 1998; CHISLOCK et al., 2013).

Assim, originam-se grandes quantidades de organismos mortos que se acumulam nos sedimentos (BRÖNMARK; HANSSON, 2005). Estes detritos orgânicos são decompostos no hipólímnio, camada profunda, na qual há alto consumo de oxigênio pelas bactérias decompositoras, podendo gerar regiões anóxicas ou zonas mortas, sem suprimento de oxigênio para a maioria dos seres vivos (BRÖNMARK; HANSSON, 2005; CHISLOCK et al., 2013).

### 3.2 CIANOBACTÉRIAS

São microrganismos procariontes, fotossintetizantes e surgiram no início da Era Pré-Cambriana (SEDMAK et al., 2009; TORTORA et al., 2012; KOMÁREK, 2013). No passado, muitas espécies foram descritas como algas por apresentarem pigmentos fotossintéticos, como clorofila e ficobiliproteínas (DODDS, 2002; OREN, 2013). A partir do século XIX, em virtude das diferenças morfológicas observadas, em comparação a outras espécies de procariotos e eucariotos, passou-se a usar termos como: cianofíceas e algas azuis, para classificar esses organismos (OREN,

2013). Atualmente, pertencem ao Domínio Bactéria e compõe o Filo *Cyanobacteria* (TORTORA et al., 2012).

As cianobactérias apresentam morfologia diversificada, são encontradas em formas filamentosas, colônias ou unicelulares (CHORUS, et al., 2000; SEDMAK et al., 2009). Reproduzem-se por fissão binária simples ou múltipla e fragmentação de filamentos (TORTORA et al., 2012). A figura a seguir demonstra alguns gêneros e suas respectivas morfologias:

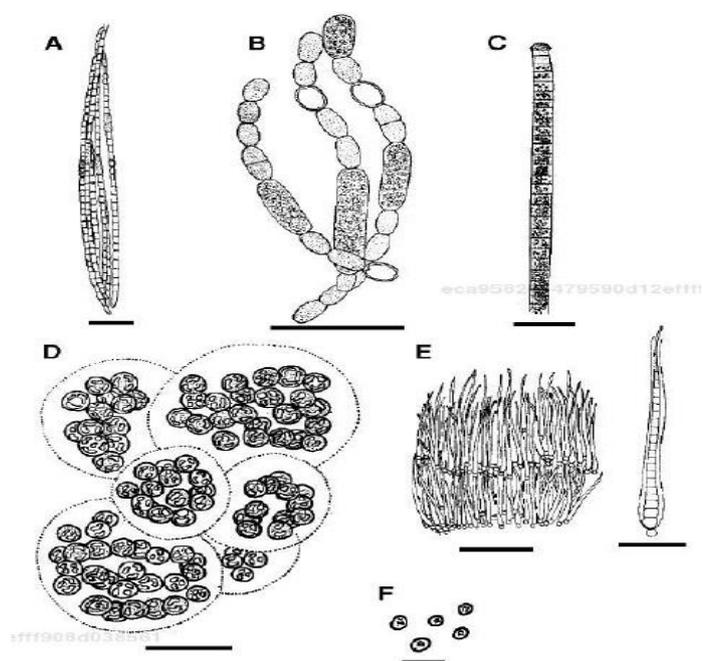


Figura 1: Morfologia de diferentes gêneros de cianobactérias: A - *Aphanizomenon* 30  $\mu\text{m}$ ; B - *Anabaena* 20  $\mu\text{m}$ ; C - *Oscillatoria*, 20  $\mu\text{m}$ ; D - *Microcystis*, 20  $\mu\text{m}$ ; E - *Rivularia* 50  $\mu\text{m}$  e 25  $\mu\text{m}$ ; F - Gênero indefinido 3  $\mu\text{m}$ .  
Fonte: Dodds (2002, p. 132).

Com alta capacidade adaptativa, algumas espécies de cianobactérias vivem bem em ambientes considerados extremos, com temperaturas elevadas ou muito baixas, alta salinidade e pH abaixo de 4,0 (DODDS, 2002). Considera-se que devido a estas habilidades de adaptação e por produzirem oxigênio, estes microrganismos desempenharam importante função ecológica no período em que surgiram, visto que as condições ambientais da Terra primitiva eram inóspitas à maioria das formas de vida conhecidas atualmente (TORTORA et al., 2012).

De modo geral, as cianobactérias apresentam algumas estruturas especializadas, como akenites, para resistência a baixas temperaturas e falta de umidade e heterocistos, que permitem a fixação de nitrogênio atmosférico (DODDS, 2002). Possuem também vesículas de gás, que são vacúolos proteicos que controlam a posição na coluna da água, conforme a disponibilidade de luz e nutrientes (CHORUS et al., 2000; OREN, 2013). Esses vacúolos também conferem flutuabilidade para formar filmes ou camadas de até um metro de espessura na superfície da água, o que pode gerar forte odor e má aparência (DODDS, 2002).

Esses mecanismos conferem alta vantagem competitiva sobre outros organismos fitoplanctônicos, principalmente em condições eutróficas, permitindo melhor captação de luz solar para fotossíntese e fixação de nutrientes (DODDS, 2002). Juntamente a estas vantagens adaptativas, está a produção de cianotoxinas, que pode sugerir função protetora contra herbívoros (KOMÁREK, 2013), mas ainda não se sabe com clareza as funções fisiológicas destas toxinas (DIETRICH et al., 2008).

### 3.3 CIANOTOXINAS

São subprodutos do metabolismo das cianobactérias e podem causar toxicidade a organismos eucariontes, o que inclui os seres humanos (WOODHOUSE; RAPADAS; NEILAN, 2013). Segundo Dietrich et al. (2008), cianotoxinas são metabólitos constituídos basicamente por peptídeos e alcaloides, que compõe estruturas complexas formadas a partir da produção de energia pelas cianobactérias. Os alcaloides são compostos orgânicos heterocíclicos que contém ao menos uma ligação carbono-nitrogênio (CHORUS; BARTRAM, 1999), enquanto que os peptídeos são cadeias de aminoácidos, ou seja, a ligação entre vários grupos carboxila (-COOH) e amino (-NH<sub>4</sub>) (TORTORA et al., 2012).

As cianotoxinas são encontradas no interior das células das cianobactérias. Ao ocorrer a morte celular e o rompimento de sua membrana, o conteúdo que estava armazenado é liberado para o meio e a toxina é dissolvida. Se houver grande quantidade de células em suspensão na água, a degradação da toxina é lenta e grandes concentrações são geradas (CHORUS et al., 2000).

Os principais gêneros produtores de cianotoxinas são: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindropermopsis*, *Gloeotrichia*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Schizothrix* e *Synechocystis* (CHORUS et al., 2000; ETTOUMI et al., 2011). Estas toxinas são classificadas de acordo com sua ação em mamíferos (ETTOUMI et al., 2011), sendo divididas em neurotoxinas (sistema nervoso), dermatoxinas (tecido epitelial) e hepatotoxinas (fígado) (CHORUS et al., 2000).

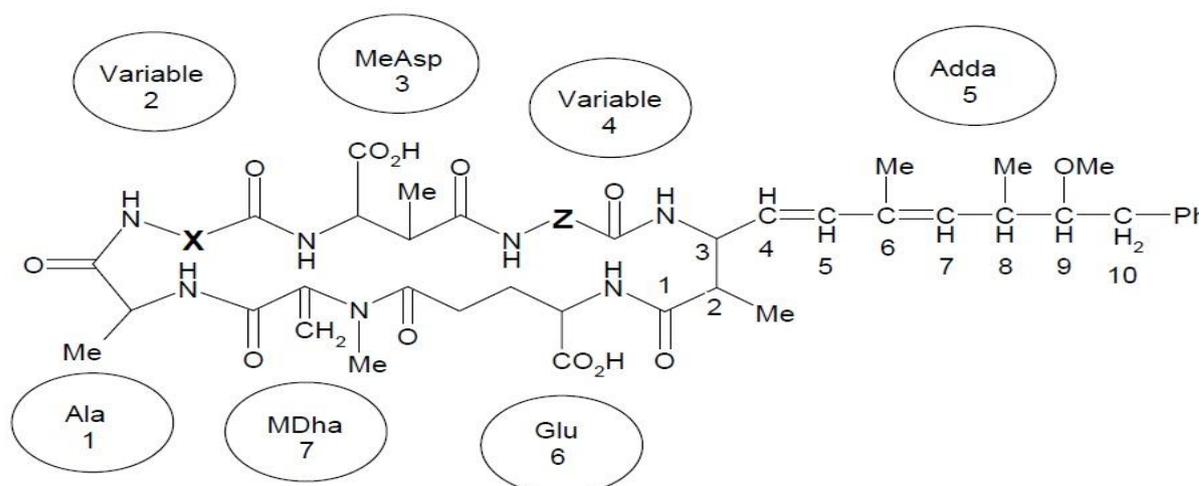
Os modos de exposição humana às cianotoxinas são geralmente por ingestão de água contaminada, contato direto de partes do corpo com águas superficiais, mucosas e olhos, por exemplo, ou por inalação de aerossóis (DIETRICH et al., 2008). Algumas toxinas são persistentes ao sistema de tratamento de águas convencional, a exemplo das microcistinas (CHORUS et al., 2000). Desta forma, observa-se a necessidade do monitoramento constante de rios e águas de captação, além do controle da carga orgânica no lançamento de efluentes industriais e domésticos para evitar processos de eutrofização (CHORUS; BARTRAM, 1999; WOODHOUSE; RAPADAS; NEILAN, 2013).

Dentre os grupos de cianotoxinas, as hepatotoxinas são consideradas as mais tóxicas devido aos problemas ambientais e de saúde pública que causam. Isso ocorre pela sua composição e estabilidade química, pois são solúveis em água, persistentes a aquecimento, hidrólise e oxidação (ETTOUMI et al., 2011). Há dois tipos principais de hepatotoxinas, as microcistinas e as nodularinas, ambas compostas por peptídeos cíclicos e diferenciadas pela quantidade de aminoácidos formadores, sendo sete para microcistinas e cinco para as nodularinas (WOODHOUSE; RAPADAS; NEILAN, 2013).

O principal modo de ação das hepatotoxinas é sobre os hepatócitos. Esta inibição pode causar inúmeras consequências ao organismo, como por exemplo: lesões no fígado, interferência na divisão celular e potencial estímulo para crescimento de tumores (CHORUS et al., 2000; ETTOUMI et al., 2011).

As microcistinas são inibidoras de enzimas que participam do processo de desfosforilação, (retirada de grupos  $PO_4^{-3}$ ), de fosfoproteínas (MACKINTOSH et al., 1990). Estas enzimas são conhecidas como proteínas fosfatases e são divididas conforme sua origem genética em: tipo 1 (PP1), 2A (PP2A), 2B (PP2B), 5 (PP5) e 7 (PP7) (FIORINI, 2003). Sendo que microcistinas possuem maior efeito inibitório em fosfatases tipo 1 e 2A (MACKINTOSH et al., 1990).

As microcistinas são formadas basicamente por sete aminoácidos, sendo dois com posições variáveis, o que confere alta diversidade, aproximadamente 80 combinações de estruturas distintas (WOODHOUSE; RAPADAS; NEILAN, 2013). A microcistina-LR é uma das variações moleculares das microcistinas, possuindo uma leucina (L) e uma arginina (R), nas posições de variação estrutural (MCELHINEY et al., 2001) (Fig. 2).



**Figura 2: Estrutura geral da molécula de microcistina. Variable 2 e 4: Aminoácidos variáveis. Abreviações: Masp – β-metil ácido aspártico; Mdha - N-metil dehidroalanina; Adda - 3-amino-9-metóxi-2,6,8-trimetil-10- difenil deca-4,6-ácido dienóico. Fonte: Hawkins et al. (2006, p. 3).**

### 3.4 LEGISLAÇÃO

Devido aos inúmeros problemas causados pelas florações de cianobactérias, vários países observaram a necessidade de prevenir, monitorar e controlar a incidência desses organismos e suas toxinas em águas (DEBERDET et al., 2004). Em geral, um órgão público é responsável pelo controle da qualidade da água, seus usos e monitoramento ambiental, com o objetivo de identificar possíveis problemas, por exemplo, florações. A partir disto são feitos estudos e criadas comissões de investigação. Dependendo da gravidade da situação, são levadas para órgãos superiores, pois a responsabilidade em garantir os interesses da sociedade é do governo (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Nos Estados Unidos, as leis federais 105-383/1998 e 108-456/2004 dispõem sobre as diretrizes e autorização para criação do “Harmful Algal Bloom and Hypoxia Research and Control”, que é um programa destinado ao desenvolvimento de pesquisas, controle de florações perigosas e baixas concentrações de oxigênio em ecossistemas aquáticos. Este programa deve estabelecer as causas, consequências, impactos econômicos, definir prioridades e fazer recomendações ao governo para melhorar o trabalho das agências federais no controle das florações (WILLIAMS, 2010).

A Austrália possui o “Australian Drinking Water Guidelines”, um guia com parâmetros de qualidade da água distribuída para consumo humano. Neste documento é recomendado que as autoridades de saúde sejam notificadas quando a concentração de microcistina-LR for superior a  $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$  (NHMRC; NRMCC, 2011). No “Guidelines for Canadian Drinking Water Quality”, do Canadá, que também dispõe sobre os parâmetros de potabilidade da água, o valor máximo aceitável para microcistina-LR é de  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$  (HEALTH CANADA, 2014).

Na República Tcheca, a Lei 252/2004 determina o monitoramento de microcistinas em água potável e a concentração máxima deve ser de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Em muitos países europeus, a exemplo de Finlândia, Bélgica, Itália, França, Holanda e Alemanha, o valor máximo permitido para microcistina-LR em água tratada é de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , conforme a recomendação da Organização Mundial da Saúde (CHORUS, 2005).

No Brasil, as normas que envolvem cianobactérias e cianotoxinas, abrangem tanto a questão ambiental quanto os critérios de potabilidade da água (DEBERDT et al., 2004).

A Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, (CONAMA), dispõe sobre a classificação de corpos de água e os padrões ambientais para o enquadramento. Nesta resolução, são considerados valores limites para densidade de cianobactérias em água doce. Para águas de Classe 1,  $20.000 \text{ cel. mL}^{-1}$ , Classe 2,  $50.000 \text{ cel. mL}^{-1}$  e Classe 3,  $100.000 \text{ cel. mL}^{-1}$  (CONAMA, 2005). Em outra resolução do CONAMA, 274/2000, sobre critérios de balneabilidade, recomenda-se que em locais com florações não haja recreação de contato primário (DEBERDT et al., 2004; CONAMA, 2000).

Para definição dos parâmetros de potabilidade da água, a norma vigente é a Portaria 2.914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). Nesta norma, estabelece-se que, para fins de abastecimento público, o monitoramento semestral

nos pontos de captação de água, a identificação de cianobactérias e a análise de clorofila-a, devem ser feitas como indicadores do possíveis florações. Caso ocorra a detecção de espécies produtoras de cianotoxinas, o valor máximo permitido para estes compostos é de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (BRASIL, 2011).

### 3.5 MONITORAMENTO ECOTOXICOLÓGICO

A partir da pressão feita pela opinião pública sobre governos e indústrias, durante as décadas de 1960 e 1970, surgiu a necessidade de avaliar efeitos causados por acidentes com produtos químicos, uso excessivo de agrotóxicos, contaminação por metais pesados e outros acontecimentos que causaram danos à saúde pública e ao meio ambiente. Desta maneira iniciou-se o monitoramento ambiental, como forma de verificar os níveis de contaminação nos ecossistemas (MORIARTY, 1999; WRIGHT; WELBOURN, 2002; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos surgem como ferramentas de avaliação, fundamentados em conceitos de toxicologia, para observar os efeitos causados por substâncias em organismos, e de ecologia, na representatividade e relevância ambiental das espécies utilizadas como bioindicadores (WRIGHT; WELBOURN, 2002; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). São os ensaios ecotoxicológicos que demonstram os efeitos agudos ou crônicos causados em organismos ou populações. A partir disto, pode-se quantificar e qualificar o grau de perturbação causado pelos poluentes, contaminantes e substâncias químicas nos seres vivos (KNIE; LOPES, 2004).

Em ensaios ecotoxicológicos, deve-se estabelecer uma relação quantitativa entre a exposição dos organismos-teste à amostra e os efeitos causados, em relação a organismos não expostos (controles), por exemplo: Análise estatística do crescimento, imobilidade, reprodução ou outros fatores relacionados à biologia de cada espécie (HANSEN, 1995; WRIGHT; WELBOURN, 2002; CONNELL et al., 2009).

Os ensaios agudos demonstram efeitos tóxicos em um curto período de tempo, geralmente esses efeitos são irreversíveis, expressos em mortalidade e imobilidade (WRIGHT; WELBOURN, 2002; KNIE; LOPES, 2004; ZAGATTO;

BERTOLETTI, 2008). É o bioensaio mais utilizado devido ao baixo custo, reprodutibilidade, curto período e resultados significativos (WRIGHT; WELBOURN, 2002; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os bioensaios crônicos consistem na exposição dos organismos a concentrações subletais, que não causarão mortalidade, mas poderão mostrar seus efeitos ao longo do ciclo de vida ou após várias gerações de uma espécie (KNIE; LOPES, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Este tipo de teste apresenta respostas mais sensíveis aos agentes químicos testados, pois demonstra os efeitos causados por baixas concentrações, como, por exemplo, aumento ou inibição reprodutiva, danos ao DNA, inibição de enzimas (WRIGHT; WELBOURN, 2002; KNIE; LOPES, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Segundo Hereman (2010), estudos têm sido conduzidos, considerando a possibilidade do uso de águas contaminadas na agricultura, para avaliar os efeitos causados por cianotoxinas em plantas terrestres.

Siegl, MacKintosh e Stitt (1990), observaram diminuição na produção de sacarose e fixação de CO<sub>2</sub> causada por microcistina-LR em *Spinacia oleracea* (espinafre). No estudo de Kós et al., (1995), foi relatada inibição no crescimento total de *Sinapis alba*, (mostarda), em concentrações a partir de 0,1 µg mL<sup>-1</sup> de microcistina. Kurki-Helasma e Meriluoto (1998), também reportaram inibição no crescimento e má formação de mostardas expostas à microcistina-RR e LR. Em *Lepidium sativum* (agrião), observou-se diminuição no comprimento de raiz e massa fresca, além de estresse oxidativo, a partir de 1 mg L<sup>-1</sup> de microcistina-LR (GEHRINGER et al., 2003). Em *Lactuca sativa*, (alface), foi apontada inibição no crescimento de radícula, aparecimento de necroses, diminuição no teor de clorofila e estresse oxidativo em concentrações de 75 e 100 µg L<sup>-1</sup> de microcistina-LR (HEREMAN, 2010).

Em culturas de *Oryza sativa* (arroz), foi relatada inibição no desenvolvimento e diminuição da produtividade quando irrigadas com água contaminada por microcistina-LR (LIANG; WANG; WANG, 2016). Hereman (2010) observou bioacumulação em tecidos de *Lactuca sativa* (alface) quando expostas a água de irrigação com 0,5 µg L<sup>-1</sup> de microcistina-LR, durante quinze dias. Neste estudo, a autora concluiu que a irrigação utilizando águas com 1 µg L<sup>-1</sup> desta toxina, concentração permitida em água de abastecimento no Brasil, não é segura para alimentação humana.

Os organismos zooplanctônicos são os consumidores primários em um ecossistema aquático, se alimentam de partículas em suspensão e fitoplâncton. Justamente por isso, são os primeiros seres afetados pelas toxinas produzidas por cianobactérias, sofrendo efeitos de bioacumulação, diminuição da filtragem de alimentos, que pode causar mortalidade ou consequências ao longo de gerações (DAO; DO-HONG; WIEGAND, 2010).

O gênero *Daphnia* é o mais usado em estudos de toxicidade de cianotoxinas, devido a importância ecológica, disponibilidade e facilidade para manejo em laboratório (RODRIGUÉZ; DAO; WIEGAND, 2012). Pesquisas apontam que as microcistinas causam inibição da atividade alimentar (ROHRLACK et al., 2001), diminuição no crescimento, baixo índice de reprodução, má formação de filhotes, diminuição do tempo de vida, estresse oxidativo e aumento da tolerância às toxinas ao longo de gerações (DAO; DO-HONG; WIEGAND, 2010; RODRIGUÉZ; DAO; WIEGAND, 2012).

### 3.5.1 *Sinapis alba*

É uma planta originária da Europa, com ocorrência anual, pertencente à família Brassicaceae, muito utilizada na alimentação humana e medicina, popularmente conhecida como mostarda (Fig. 3) (LUST, 1983; NRCS, 2016). É usada como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos, tendo como principais indicadores de toxicidade: taxa de germinação das sementes e alongamento radicular (KÓS et al., 1995).



**Figura 3: Sementes de *Sinapis alba*.**  
**Fonte: Adaptado de Natural Resources Conservation Service (2016).**

### 3.5.2 *Lactuca sativa*

Hortaliça largamente usada na alimentação humana no mundo todo, chamada genericamente de alface, pertence à família Asteraceae (MAGALHÃES, 2006). Em ensaios ecotoxicológicos é uma espécie bem descrita e utilizada, possui algumas metodologias padronizadas, como por exemplo, o protocolo 600/3-88/029 (USEPA, 1989) que descreve os parâmetros para teste de germinação e comprimento de radículas para alface. A Figura 4 ilustra sementes de alface:



**Figura 4: Sementes de *Lactuca sativa*.**

**Fonte: Adaptado de Natural Resources Conservation Service (2016).**

### 3.5.3 *Daphnia magna*

Pertence ao subfiló Crustacea, ordem Cladocera, vive em ambientes dulcícolas, alimenta-se por filtração, consumindo células de algas e matéria orgânica particulada (KNIE; LOPES, 2004). Ocupa importante posição na cadeia alimentar, é considerada consumidora primária e apresenta alta relevância ecológica (ESTEVES, 1998; ORTIZ-RODRIGUÉZ et al., 2012).

O gênero *Daphnia* é o mais usado em estudos de toxicidade de cianotoxinas (ORTIZ-RODRÍGUEZ, 2012). É uma espécie internacionalmente reconhecida e estudada como organismo-teste para ensaios ecotoxicológicos, apresenta características favoráveis a este tipo de pesquisa, como: uniformidade genética, resposta sensível a várias substâncias químicas, fácil cultivo e manejo em laboratório (KNIE; LOPES, 2004) (Fig. 5).



Figura 5: Fêmea adulta de *Daphnia magna* com embriões.

Fonte: Disponível em Wikimedia Commons: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Daphnia\\_magna-female\\_adult.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Daphnia_magna-female_adult.jpg)

#### 3.5.4 *Desmodesmus subspicatus*

É uma microalga fitoplanctônica, compõe o grupo dos produtores primários e faz parte da base da cadeia alimentar. Com isso, participam ativamente dos ciclos biogeoquímicos na ciclagem de nutrientes. Devido a sua importância ecológica e altas taxas de reprodução são utilizadas como indicadores em testes de toxicidade (KNIE; LOPES, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008) (fig. 6).

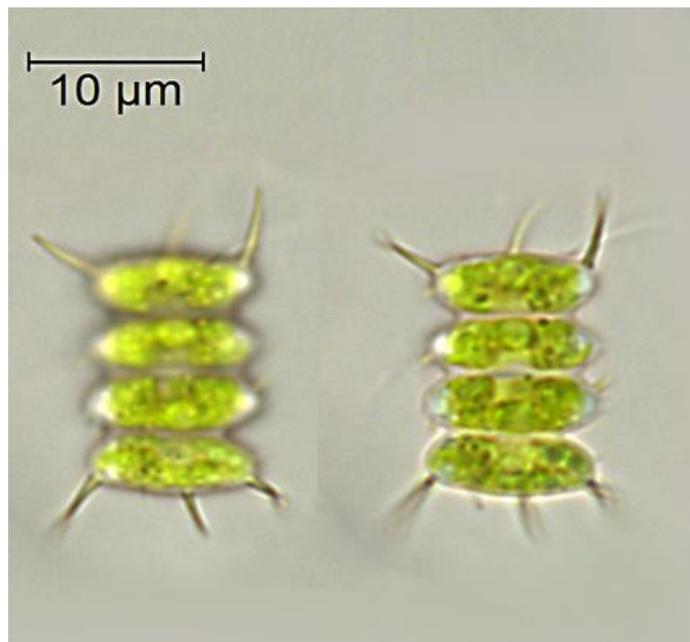


Figura 6: Células de *Desmodesmus subspicatus*.  
Fonte: Adaptado de Algae Base (2016).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *Microcystis Aeruginosa*

O extrato bruto utilizado neste trabalho foi proveniente do cultivo da cepa *Microcystis aeruginosa* BB005, isolada do Reservatório de Barra Bonita (São Paulo) e doada pelo Prof. Dr. Armando Augusto H. Vieira, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos. Esta cepa foi cultivada no Laboratório de Limnologia, Ecologia e Cromatografia da UTFPR nas seguintes condições: em erlenmeyers contendo 1,8 L de meio ASM-1 (Anexo A) autoclavado foi inoculada a densidade celular de  $1 \times 10^5$  cel. mL<sup>-1</sup>, e que foi mantida por 21 dias, com fotoperíodo de 14 horas em intensidade luminosa de  $2150 \pm 230$  lux e temperatura entre 23 e 30°C, sem aeração (SOARES et al., 2004; JIANG et al., 2008).

Após o período de crescimento, os cultivos foram submetidos à centrifugação a 10 000 G, durante 20 min a fim de separar as células do meio de cultivo. Em seguida, os pellets formados na centrifugação foram resuspendidos em 500 mL de água de osmose, como forma de aumentar a concentração da amostra, que foi denominada extrato bruto (MICHELETTO, 2016). Por fim, a amostra passou por três ciclos de congelamento/descongelamento para romper as células de *Microcystis aeruginosa* e tornar a toxina disponível ao meio extracelular (SILVEIRA, 2012).

### 4.2 TESTE DE FITOTOXICIDADE AGUDA COM *L. sativa* E *S. alba*

Sementes de *L. sativa* (variedade Boston branca) e *S. alba* (variedade amarela) foram expostas ao extrato bruto de *Microcystis aeruginosa* contendo microcistina-LR, para avaliação dos possíveis efeitos tóxicos. Os ensaios foram realizados segundo metodologias descritas no protocolo 600/3-88/029 (USEPA, 1989), no trabalho de Kós et al. (1995) e de Sobrero e Ronco (2008).

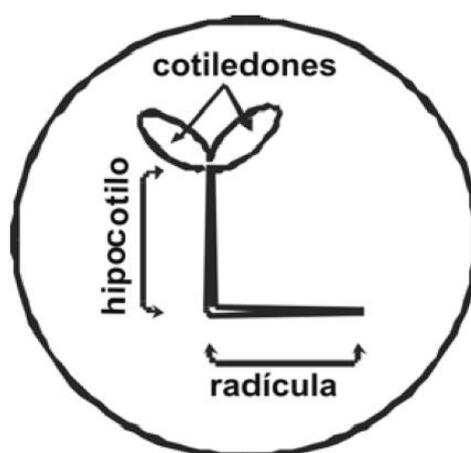
Nestes ensaios, para fins de comparação, duas variações de substrato foram utilizadas. A primeira foi o papel filtro qualitativo (Unifil, gramatura 80 g m<sup>-2</sup>, diâmetro

12,5 cm), que foi cortado no tamanho das placas de Petri. O outro substrato utilizado foi ágar bacteriológico (Dinâmica, 1%).

O procedimento experimental para cada espécie e substrato seguiu o seguinte delineamento: Em uma placa de Petri foi colocado substrato, adicionado extrato bruto (4 mL em papel filtro e 2,5 ml em ágar) e em seguida quinze sementes foram dispostas. Nas mesmas condições foram feitos os controles negativo e positivo, expondo as sementes à água de osmose reversa e solução de glifosato comercial 6% (Dipil), respectivamente.

O ensaio teve duração de 120 horas, em câmara incubadora tipo DBO, a  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Todas as amostras e controles foram feitas em triplicata e duas condições de luminosidade foram avaliadas: ausência total de luz e fotoperíodo (16/8 h) (USEPA, 1989; SOBRERO; RONCO, 2008).

Após o período de exposição o número de sementes germinadas foi contabilizado e as raízes das plântulas foram medidas, com auxílio de uma régua (USEPA, 1989; SOBRERO; RONCO, 2008). Sementes em que as radículas não eram aparentes ou menores que 0,2 mm não foram consideradas germinadas (SOBRERO; RONCO, 2008). A figura a seguir demonstra o esquema geral de *Lactuca sativa* após o período de exposição:



**Figura 7: Ilustração geral de *Lactuca sativa* com divisões de tecidos.**  
Fonte: Adaptado de Sobrero e Ronco (2008, p. 63).

Os dados provenientes das medições foram utilizados para os cálculos de Índice de Germinação (IG) (Equação 1) (GARCIA et al., 2009) e Índice de Crescimento Relativo (ICR) (Equação 2) (YOUNG et al., 2012).

$$IG\% = \frac{\text{Número de sementes germinadas}}{\text{Número total de sementes}} \times 100 \quad (1)$$

$$ICR = \frac{\text{Média das raízes da amostra}}{\text{Média das raízes do controle}} \quad (2)$$

Os valores obtidos a partir do cálculo do ICR foram utilizados para classificar os efeitos sobre crescimento radicular, considerando os seguintes parâmetros (YOUNG et al., 2012):

**Tabela 1. Classificação dos efeitos.**

<b>Classificação</b>	<b>ICR</b>
Inibição no alongamento de raiz	< 0,8
Sem Efeito	≥ 0,8 ou ≤ 1,2
Estimulação no alongamento de raiz	> 1,2
<b>Classificação</b>	<b>IG (%)</b>
Inibição de germinação	< 90

Fonte: Adaptado de Young et al. (2014).

Para observar a significância estatística os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste t Student, (SOBRERO; RONCO, 2008). O software BioEstat 5.0 foi utilizado como ferramenta de análise.

#### 4.3 ANÁLISE RESPIROMÉTRICA DE *L. sativa* E *S. alba*

Este experimento seguiu a descrição da norma 14283:1999 (ABNT, 1999), com as seguintes adaptações: ao invés de realizar a medição de CO<sub>2</sub> proveniente da atividade microbiológica de solos, como descrito na norma, foi feita a análise de CO<sub>2</sub> produzido durante o desenvolvimento inicial de *L. sativa* e *S. alba* em substrato de papel filtro. Os experimentos foram feitos em respirômetros de Bartha (Fig.8)

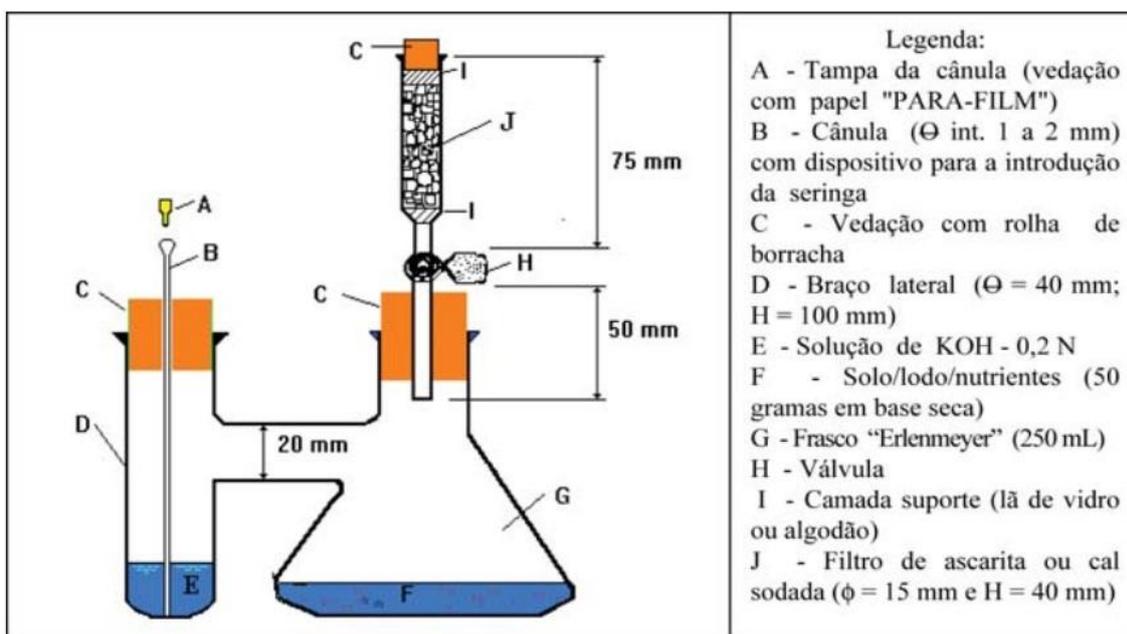


Figura 8: Esquema geral de um respirômetro de Bartha.

Fonte: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1999 (apud Mello et al., 2007).

No fundo do respirômetro foi colocado um papel filtro (Unifil, gramatura 80 g m<sup>-2</sup>, diâmetro 12,5 cm) com 4 mL de amostra (extrato bruto) e água de osmose reversa (controle negativo) e 20 sementes. No braço lateral do equipamento foram colocados 10 mL de solução 0,2 mol L<sup>-1</sup> de hidróxido de potássio (KOH), que serviram para adsorção do CO<sub>2</sub> produzido. O sistema foi fechado e vedado para não sofrer entrada de CO<sub>2</sub> atmosférico. O experimento foi feito em duplicata e levado à câmara incubadora com 16 horas diárias de luz e 8 horas diárias de escuro a 20±2 °C, ao total forma 96 horas de exposição (ABNT, 1999).

A cada 24 horas, durante quatro dias, a solução de KOH foi retirada e preparada para titulação. Foram adicionadas duas gotas de indicador de pH fenolftaleína, 30 mL de água isenta de CO<sub>2</sub> e 1 mL de cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>) 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Após estas etapas, a solução foi titulada com ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L<sup>-1</sup> e o volume até o ponto de viragem de cor da solução foi contabilizado. Após cada titulação, uma nova solução de KOH 0,2 mol L<sup>-1</sup> foi reposta no braço lateral do respirômetro, que foi levado novamente a incubadora (ABNT, 1999; MELLO et al., 2007; CRIVELARO et al., 2010).

Antes das medições, foram feitas titulações em branco, para correção dos erros associados a CO<sub>2</sub> externo (ABNT, 1999; MELLO et al., 2007; CRIVELARO et al., 2010).

O cálculo da produção de CO<sub>2</sub> foi feito a partir da equação 3:

$$\mu\text{mol de CO}_2 = (A - B) \times 50 \times f_{\text{HCl}} \quad (3)$$

Em que: A = Volume de HCl usado para titular o branco; B = Volume de HCl para titular a solução de KOH proveniente do respirômetro; 50 = fator de transformação em  $\mu\text{mol de CO}_2$ ;  $f_{\text{HCl}}$  = Fator de correção da solução de HCl (MELLO et al., 2007).

#### 4.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM *D. magna*

Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita na norma 12713:2016 (ABNT, 2016). Os neonatos (6-24h) selecionados para o teste foram expostos as diluições de 100, 50, 25 e 12,5% (volume:volume) de extrato bruto de *M. aeruginosa* durante 48 horas. Para a diluição da amostra e controle negativo foi utilizado meio básico (ANEXO B), composto por quatro soluções nutrientes para *D. magna*.

Os organismos selecionados para o teste foram originados por cultivos que apresentaram boas condições de alimentação, fotoperíodo, temperatura, pH e dureza da água, sem altas taxas de mortalidade ou doenças. Estes fatores foram comprovados por meio de uma carta controle de sensibilidade ao dicromato de potássio (APÊNDICE A) (ABNT, 2009).

A exposição dos organismos foi da seguinte maneira: dez filhotes foram distribuídos nas quatro concentrações de extrato bruto e controle negativo. O ensaio foi realizado em triplicata e submetido à incubadora a  $20 \pm 2$  °C, no escuro.

Após 48 horas os organismos que apresentavam capacidade natatória comprometida foram contados em todas as réplicas das concentrações. Os dados

obtidos foram expressos em percentual de imobilidade em relação ao controle (KNIE; LOPES, 2004; ABNT, 2009).

#### 4.5 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *D. subspicatus*

Para esta avaliação, foram seguidos os métodos contidos na norma 12648:2011 (ABNT, 2011). Este ensaio consistiu na exposição da microalga *D. subspicatus* por 72 horas a quatro diluições do extrato bruto (80, 50, 25 e 12,5% vol/vol).

Três dias antes do início do ensaio foi feito um inóculo em meio líquido para pré-cultura (ANEXO C). Após esse período, foi feita a contagem celular em câmara de Neubauer e inoculada a densidade celular de  $10^5$  células mL<sup>-1</sup> nos frascos de teste, com meio nutriente DIN (ANEXO D), água de osmose reversa e amostra (ABNT, 2011).

Todos os frascos e meios nutrientes foram previamente autoclavados e os procedimentos foram feitos em câmara de fluxo laminar. O ensaio ocorreu nas seguintes condições: em sala climatizada (23-25°C), os frascos de teste foram colocados em agitação constante (mesa de agitação orbital tipo shaker, (Tecnal, modelo TE-1400) a 175 rpm e luminosidade de aproximadamente 7000 lux, medida através de luxímetro (Homis). Todas amostras e controles foram feitos em triplicata (ABNT, 2011).

Após 72 horas, foi feita contagem celular de todas as réplicas em câmara de Neubauer. As médias de densidade celular das concentrações da amostra e controle passaram por ensaio estatístico ANOVA e Teste de Dunnet nos software BioEstat 5.0. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento relativo ao controle negativo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TESTE DE FITOTOXICIDADE AGUDA COM *L. sativa* E *S. alba*

Ao todo foram realizados oito ensaios utilizando variações nos substratos e condições de luminosidade, conforme o método descrito no item 5.2. Os resultados estão elencados na Tabela 2:

**Tabela 2: Fitotoxicidade do extrato bruto de *Microcystis aeruginosa*.**

Ensaio	Semente	Substrato	Luminosidade	DP	ICR	IG%	Efeito Crescimento Radicular
1	M	PF	F	0,61	0,50	100	I
2	M	PF	E	1,15	0,68	100	I
3	M	AG	F	0,38	0,41	91,1	I
4	M	AG	E	1,31	0,48	100	I
5	A	PF	F	1,41	0,94	100	SE
6	A	PF	E	0,85	0,85	97,8	SE
7	A	AG	F	1,38	1,13	97,8	SE
8	A	AG	E	0,69	1,20	100	SE

**Legenda:** (DP) Desvio Padrão; (M): Mostarda; (A): Alface; (PF): Papel Filtro; (AG): Agar; (F): Fotoperíodo; (E): Escuro; (I): Inibição; (SE): Sem Efeito.

A partir da análise dos dados obtidos, verificou-se que o extrato bruto de *M. aeruginosa* inibiu o crescimento radicular de *Sinapis alba* em todas as condições testadas, com  $p < 0,01$  no Teste T de Student.

No estudo de Kós et al., (1995), foi relatada inibição no crescimento total de *Sinapis alba*, em concentrações a partir de  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de microcistina.

Kurki-Helasmo e Meriluoto (1998), também reportaram inibição no crescimento e má formação de mostardas expostas à microcistina-RR e LR. Em *Lepidium sativum* (agrião), foi observada diminuição no comprimento de raiz e massa fresca, além de estresse oxidativo, a partir de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de microcistina-LR (GEHRINGER et al., 2003). Em culturas de *Oryza sativa* (arroz), foi relatada inibição no desenvolvimento e diminuição da produtividade quando irrigadas com água contaminada por microcistina-LR (LIANG, et al., 2016).

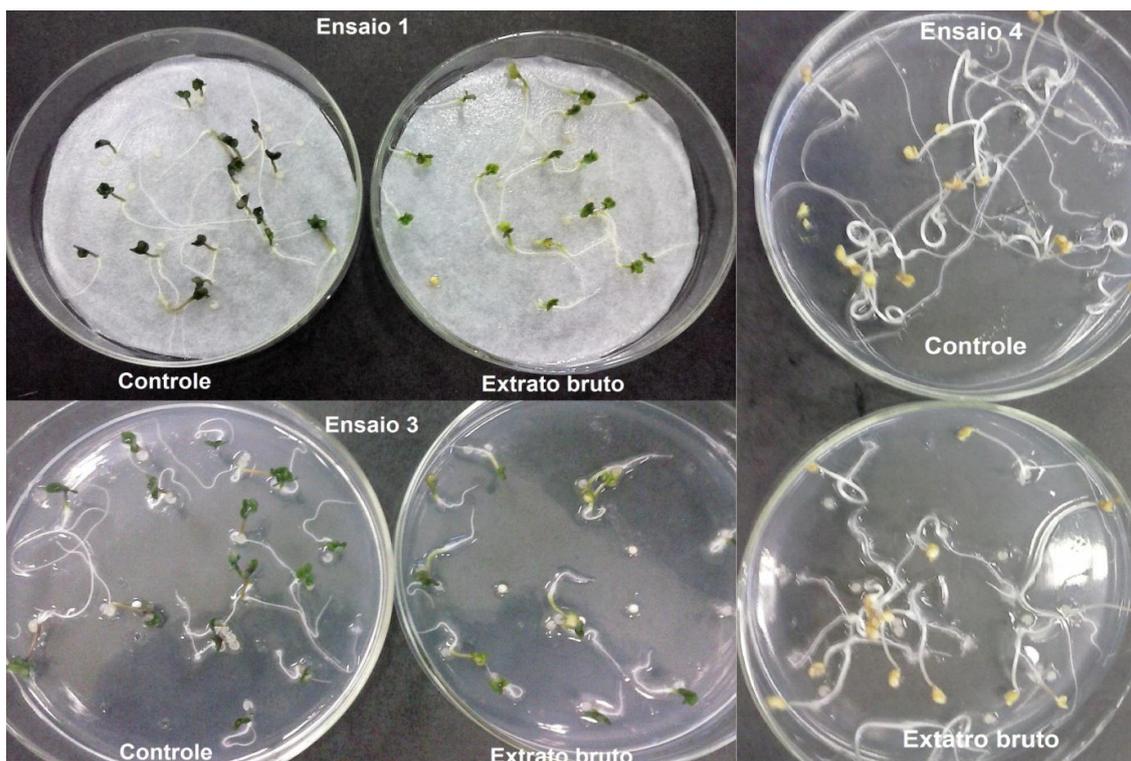
A inibição do crescimento radicular pode estar relacionada ao bloqueio da ação de citocina e auxina, fitormônios que influenciam em processos de desenvolvimento, como ativação de genes, taxas de expansão e divisão celular (RAVEN et al., 2010). Além da microcistina-LR, outra possível fonte de toxicidade é o lipolissacarídeo, presente na parede celular de *M. aeruginosa*, sendo um provável desregulador osmótico (BEST et al., 2013).

Também foi possível visualizar a influência do substrato nos níveis de inibição de crescimento, pois as sementes de mostarda que se desenvolveram sobre ágar sofreram maior percentual de inibição em relação às submetidas ao papel filtro.

Segundo Salvatore et al. (2008), testes utilizando agar são mais sensíveis comparados a papel filtro. Esse fato pode ser explicado pela possível interação entre a estrutura do papel e amostra, reduzindo a biodisponibilidade dos contaminantes para as plântulas (RATSCH; JHONDRO, 1984). Além disso, o ágar possibilita maior superfície de contato entre a radícula e poluente, obtendo-se uma exposição completa, que não ocorre no papel filtro (WANG, 1994).

Ainda para *S. alba*, em ambos substratos, houve maior sensibilidade quando o ensaio foi realizado na presença de luz, sendo o ensaio 3 (agar, fotoperíodo) o que apresentou maior inibição, com ICR = 0,41. Para Christie e Murphy (2013), estes organismos são mais complexos fisiologicamente, pois houve desenvolvimento e produção de clorofila.

Com isso, os testes que ocorreram na presença de luminosidade, possibilitaram a observação de parâmetros morfofisiológicos. Foram verificadas mudanças na coloração dos cotilédones das plântulas expostas ao extrato bruto, efeito que não foi possível visualizar nos ensaios realizados na ausência de luz devido à falta de pigmentos fotossintéticos nas plântulas (fig. 9).



**Figura 9. Comparação entre ensaios com *S. alba*.**

Em *L. sativa* não foram observados efeitos sobre o crescimento radicular, uma vez que o ICR dos ensaios 5 a 8 ficou dentro da faixa considerada sem efeito ( $ICR \geq 0,8$  ou  $\leq 1,2$ ) (YOUNG et al., 2012). Nos testes estatísticos também não houve diferenças significativas entre controle negativo e extrato bruto.

Os valores de ICR obtidos nos ensaios 7 (1,13) e 8 (1,20), realizados em ágar, demonstram uma possível tendência dos organismos expostos ao extrato bruto e a esse substrato sofrerem efeito estimulante, visto que estão próximos ao valor máximo considerado sem efeito (1,20). Enquanto que nos ensaios 5 (0,94) e 6 (0,85), com papel filtro, foi observado o inverso, a tendência está mais próxima ao limite inferior de ICR, Sem Efeito  $\geq 0,80$ .

Nos ensaios 5 e 7, realizados com fotoperíodo, não foram verificadas diferenças na coloração das folhas ou em outros aspectos morfológicos (fig. 10).



Figura 10. Plântulas de *L. sativa* após período de exposição.

Os mecanismos de absorção e metabolização de microcistina-LR, presente no extrato bruto, não são totalmente conhecidos. Porém, sabe-se que as enzimas glutatona S-transferase e glutatona peroxidase funcionam como agentes de desintoxicação e defesa contra xenobióticos (DIXON et al., 1998; PFLUGMACHER et al., 1998).

Desta maneira, infere-se que a microcistina-LR ou outros subprodutos presentes no extrato podem ser oxidados por estas enzimas, sendo metabolizados pelas plântulas (GEHRINGER et al., 2003). Hereman (2010) observou aumento da atividade enzimática de peroxidases e bioacumulação de microcistina-LR em tecidos de alfaces expostas a extrato bruto de *M. aeruginosa*. Segundo Salvatore et al. (2008), a inibição do crescimento radicular depende de alguns fatores, como: tipo de amostra, concentração e espécies testadas. Esses fatos, possivelmente, explicam a ausência de efeitos inibitórios do extrato bruto sobre as radículas de *L. sativa*.

Cada tipo de semente responde de maneira diferente quando exposta à luz, pode ocorrer estímulo (fotoblastismo positivo) ou inibição (fotoblastismo negativo) na germinação. São consideradas fotoblásticas neutras sementes em que os índices de germinação não se alteram com a presença ou ausência de luz (PONS, 2000). Para as duas espécies testadas, não houve efeitos na germinação, os índices foram acima de 90% em todos os ensaios (1-8). Ou seja, ambas podem ser consideradas fotoblásticas neutras. Porém, a luminosidade apresentou influência sobre o crescimento radicular (Tabela 3).

**Tabela 3: Crescimento radicular no controle negativo.**

Ensaio	Semente	Substrato	Luminosidade	Média de Crescimento Controle Negativo (cm)
1	M	PF	F	4,90
2	M	PF	E	6,34
3	M	AG	F	3,68
4	M	AG	E	7,13
5	A	PF	F	5,76
6	A	PF	E	3,09
7	A	AG	F	3,20
8	A	AG	E	1,38

**Legenda:** (M): Mostarda; (A): Alface; (PF): Papel Filtro; (AG): Agar; (F): Fotoperíodo; (E): Escuro.

Desta maneira, verifica-se que o crescimento de *S. alba* foi maior nos ensaios 2 (papel filtro/escuro) e 4 (agar/escuro) comparados aos ensaios 1 (papel filtro/fotoperíodo) e 3 (agar/fotoperíodo), respectivamente. A presença de luz influenciou negativamente sobre o desenvolvimento inicial da mostarda.

Para alface foi observado o comportamento inverso, nos ensaios 5 (papel filtro, fotoperíodo) e 7 (agar, fotoperíodo) as plântulas apresentaram maior alongamento radicular do que nos ensaios 6 (papel filtro, escuro) e 8 (agar, escuro). Ou seja, o fotoperíodo possibilitou maior desenvolvimento no comprimento radicular de *L. sativa*.

Segundo Raven et al. (2010), o fitormônio responsável pela expansão radicular, auxina, geralmente, responde de duas maneiras diferentes quando o desenvolvimento inicial ocorre na presença de luz. Sendo uma resposta pode ser o estímulo a sua produção e, conseqüentemente, maior crescimento radicular. A outra reação pode ser a degradação deste fitormônio nos tecidos da planta, ou seja, o tipo de resposta depende de cada espécie.

## 5.2 ANÁLISE RESPIROMÉTRICA DE *L. sativa* E *S. alba*

Assim como nas análises de fitotoxicidade, a determinação do CO<sub>2</sub> produzido durante o desenvolvimento inicial de *L. sativa* e *S. alba*, em contato com o extrato

bruto *M. aeruginosa*, possibilitou a visualização de comportamentos diferentes entre as duas espécies (fig. 11).

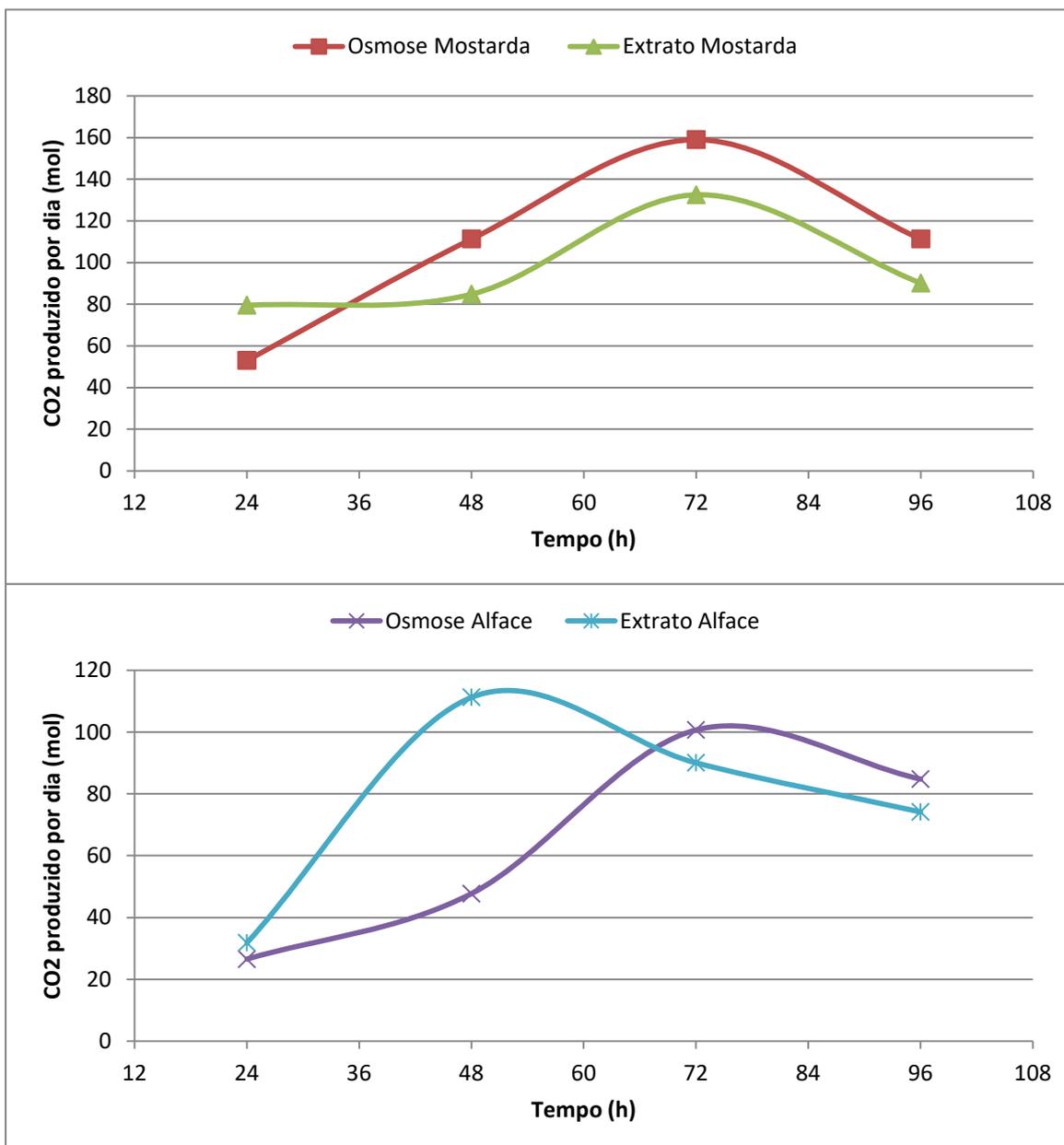
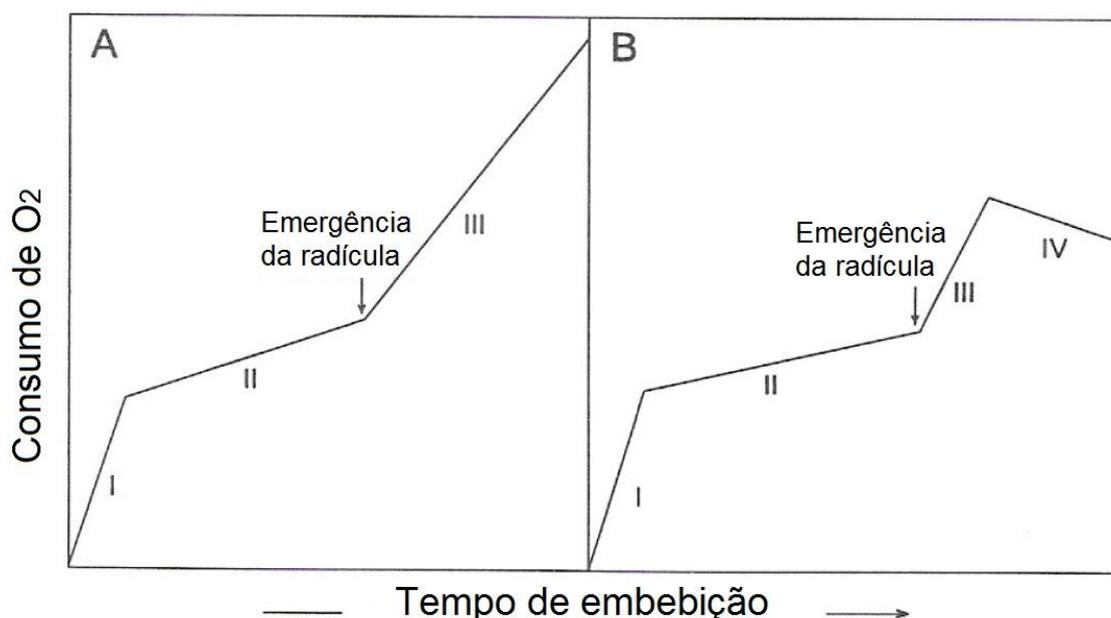


Figura 11. Produção diária de CO<sub>2</sub> durante germinação e desenvolvimento inicial de mostarda e alface.

O consumo de O<sub>2</sub> está diretamente relacionado com a produção de CO<sub>2</sub> durante o desenvolvimento inicial, principalmente na germinação, período em que as plantas respiram mais (CARDOSO, 2004; RAVEN et al., 2010).

A germinação de sementes é caracterizada por processos específicos de desenvolvimento (CARDOSO, 2004). Ao realizar a comparação entre as séries

Osmose Mostarda e Osmose Alface (fig. 11) com o consumo de  $O_2$  (fig. 12), fica evidente a relação entre a produção diária de  $CO_2$  e as fases da germinação. Visto que as sementes apresentaram comportamento respiratório muito próximo ao descrito nas fases I a IV.



**Figura 12: Consumo de  $O_2$  durante as fases da germinação.**  
**Fonte: Adaptado de Bewley e Black (1994).**

Na Fase I, ocorre a embebição, caracterizada pela hidratação da semente e reativação do metabolismo, com a ativação de enzimas, aumento de taxas respiratórias e consumo de proteínas de reserva. Na Fase II a taxa respiratória aumenta constantemente, com o aparecimento da radícula. Por fim, na fase III a taxa de respiração tem aumento expressivo e a germinação é finalizada com a completa emergência da raiz (BEWLEY; BLACK, 1994; CARDOSO, 2004; PES; ARENHARDT, 2015).

Ainda, segundo Bewley e Black (1994), pode-se considerar mais uma etapa após a germinação, denominada Fase IV (fig. 12), em que ocorre a queda da taxa respiratória, devido à senescência dos tecidos de reserva.

Nesta etapa do desenvolvimento a planta entra em transição da fase heterotrófica, consumo dos tecidos de reserva, para a fase autotrófica, início da fotossíntese (CARDOSO, 2004; HUSSAIN, 2008; PES; ARENHARDT, 2015).

Foi verificada menor produção de CO<sub>2</sub> pelas mostardas expostas ao extrato bruto. Como já verificado nos ensaios de fitotoxicidade, as plântulas de mostarda sofreram efeitos inibitórios no crescimento radicular e segundo Cardoso (2004), a respiração é diretamente relacionada com a produção de energia pela planta e seu metabolismo, nesse caso, se houve maior crescimento, houve maior respiração.

As plântulas de alface expostas ao extrato bruto apresentaram estímulo na produção de CO<sub>2</sub> nas primeiras 48 horas, isso pode estar relacionado às respostas desses organismos ao agente estressor, como expressão de genes de tolerância, estímulo de fitormônios, alterações no equilíbrio osmótico e metabolismo, que influenciaram nas taxas de respiração (BEWLEY; BLACK, 1994; CARDOSO, 2004; HUSSAIN, 2008). Também se percebe que o consumo dos tecidos de reserva foi acelerado, devido diminuição da respiração após 48 horas (BEWLEY; BLACK, 1994).

Com isso, foi possível correlacionar os resultados dos ensaios de fitotoxicidade com *S. alba* com a produção de CO<sub>2</sub>. Como também a visualização de alterações nas taxas de respiração de *L. sativa*, comprovando que esta espécie sofreu efeitos fisiológicos causados pelo extrato bruto, mesmo não sendo visíveis morfológicamente nos ensaios de fitotoxicidade.

### 5.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM *D. magna*

Os organismos foram expostos às diluições do extrato bruto de *M. aeruginosa* e após 48 horas foi feita a contabilização dos organismos imóveis. A amostra apresentou toxicidade aguda para *D. magna* apenas em sua forma pura (100%), com 76% de imobilidade (Tabela 4).

**Tabela 4: Resultado teste agudo com *Daphnia magna*.**

Extrato bruto	Concentração (%)	Imobilidade (%)	Resultado
	100	76,67	T
	50	0	NT
	25	0	NT
	12,5	0	NT

**Legenda:** (T): Tóxico; (NT): Não Tóxico.

Os organismos zooplanctônicos são os consumidores primários em um ecossistema aquático, se alimentam de partículas em suspensão e fitoplâncton. Justamente por isso, são os primeiros seres afetados pelas toxinas produzidas por cianobactérias, sofrendo efeitos de mortalidade ou consequências ao longo de gerações (DAO et al., 2010).

Segundo Nizan et al., as análises de toxicidade aguda de extratos de *M. aeruginosa* em *D. magna* podem apresentar diferentes efeitos tóxicos, pois estes resultados dependem da cepa testada.

Alguns fatores são atribuídos à toxicidade de extratos de cianobactérias em zooplanctônicos, principalmente, a inadequação nutricional, diminuição da atividade de filtração, inibição de enzimas digestivas, bioacumulação e estresse oxidativo (FERRÃO-FILHO et al., 2000; ROHRLACK et al., 2001; DAO et al., 2010; ORTIZ-RODRIGUÉZ; WIEGAND, 2010).

DeMott et al. (1991), testaram microcistina-LR purificada em três espécies do gênero *Daphnia*. Foram encontrados diferentes níveis de sensibilidade entre os organismos: 21,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *Daphnia pulicaria*, 11,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em *Daphnia hyalina* e 9,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em *Daphnia pulex*.

Cabe resaltar que extratos de cianobactérias afetam organismos do gênero *Daphnia* tanto em exposições agudas, quanto crônicas (DAO et al., 2010; ORTIZ-RODRIGUÉZ; WIEGAND, 2010). Quando as concentrações são subletais, como foi o caso das diluições 50, 25 e 12,5%, pode ocorrer diminuição no crescimento, baixo índice de reprodução, má formação de filhotes, diminuição do tempo de vida, estresse oxidativo e aumento da tolerância às toxinas ao longo de gerações (DEMOTT et al., 1991; ROHRLACK et al., 2001, DAO et al., 2010; ORTIZ-RODRIGUÉZ et al., 2012).

#### 5.4 TESTE DE ECOTOXICIDADE CRÔNICA EM *D. subspicatus*

Quatro diluições de extrato bruto de *M. aeruginosa* foram testadas, apenas a maior diluição da amostra não foi tóxica para *D. subspicatus* (tabela 5).

**Tabela 5: Resultado teste crônico com *D. subspicatus*.**

Extrato bruto	Concentrações (%)	Inibição de crescimento (%)	Teste Dunnet (valor de p)	Resultado
	100	55,84	<0,01	T
	50	35,80	<0,01	T
	25	30,70	<0,01	T
	12,5	13,04	NS	NT

**Legenda:** (NS): Não Significativo (T): Tóxico; (NT): Não Tóxico.

As microcistinas podem inibir o crescimento de fitoplâncton em períodos de curta exposição. Em períodos longos de exposição, a tendência é que ocorra adaptação das microalgas a toxina (MOHAMED, 2008). Segundo Babica et al. (2006), as cianotoxinas também provocam alterações nos sistemas de defesa antioxidante, nos níveis de superóxido dismutase, peroxidase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e outras enzimas.

Além desses possíveis efeitos causados pela microcistina-LR em microalgas, devido a inibição das proteínas fosfatases, a atividade fotossintética é diretamente afetada, pois essas proteínas participam ativamente do processo de fotossíntese (PIETSCH et al., 2001; BABICA et al., 2006).

Como a produção de energia pela fotossíntese está diretamente relacionada ao crescimento, no gráfico da Figura 13 são demonstrados os percentuais de inibição de crescimento em função da diluição da amostra, esses dados permitem a visualização da relação, aproximadamente linear ( $R^2 = 0,9295$ ), de dose x resposta.

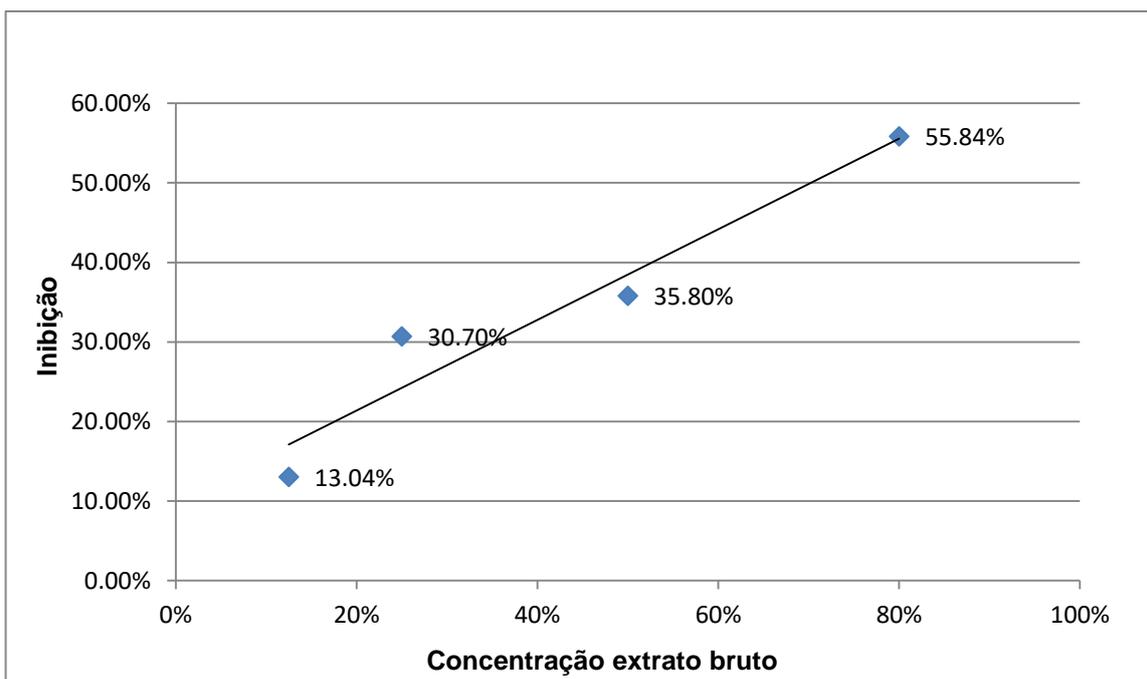


Figura 13: Relação dose x resposta de *D. subspicatus* exposta a extrato bruto.

Assim, infere-se que, provavelmente, a divisão celular e o metabolismo de *D. subspicatus* sofreram alterações devido à exposição ao extrato bruto, por isso ocorreu inibição da reprodução celular e conseqüentemente aumento da toxicidade em função da concentração (PIETSCH et al., 2001; BABICA et al., 2006; MOHAMED, 2008).

## 6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que o extrato bruto de *M. aeruginosa* causou efeitos tóxicos ou alterações fisiológicas em todos os organismos testados.

Nos ensaios de fitotoxicidade, foi visualizada a influência dos substratos e da luminosidade na sensibilidade dos organismos ao extrato bruto. Para *S. alba*, foi observada toxicidade em todas as condições testadas, mas os ensaios com luminosidade e ágar foram mais sensíveis. Já em *L. sativa* não foram observados efeitos, entretanto foi possível visualizar a influência da luminosidade no crescimento radicular, sendo maior com fotoperíodo.

Com o método respirométrico constatou-se a relação direta entre produção de CO<sub>2</sub> e absorção de O<sub>2</sub>, relatada na literatura, durante o desenvolvimento inicial das sementes em condições sem contaminação. Desta forma, a comparação foi realizada com os resultados da produção de CO<sub>2</sub> na exposição ao extrato bruto, verificou-se que para mostarda a atividade respiratória foi menor que o controle negativo, confirmando os resultados dos testes de fitotoxicidade, que mostraram inibição no crescimento radicular. Enquanto que para alface houve maior produção de CO<sub>2</sub> no início da germinação, possibilitando a observação de alteração na taxa respiratória, um possível mecanismo de defesa deste organismo. Além disso, o ensaio de respirometria se mostrou complementar aos testes de fitotoxicidade (germinação e alongamento radicular), gerando dados que facilitaram o entendimento das respostas dos organismos ao extrato bruto.

Para *D. magna* houve toxicidade aguda, mas ficou evidente a necessidade de um ensaio crônico com este organismo para confirmar os efeitos de longas exposições em concentrações subletais. Em *D. subspicatus* o extrato bruto apresentou elevada toxicidade, confirmando os efeitos crônicos causados pela amostra.

Desta forma, analisando estas constatações, ficou evidente que os efeitos tóxicos dependem de cada organismo, mas que de maneira geral, nas condições e concentrações testadas, as respostas dos organismos fotoautotróficos foram mais sensíveis ao extrato bruto de *M. aeruginosa*.

## REFERÊNCIAS

ALGAE BASE. **Desmodesmus subspicatus (Chodat) E. Hegewald & A. Schmidt**. 2016

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12684**. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*), 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12713**. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (*Cladocera, Crustacea*), 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 14283**. Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1999.

BABICA, P. et al. Exploring the natural role of microcystins – A review of effects on photoautotrophic organisms. **Journal of Phycology**. v. 42 p. 9-20. 2006.

BATTARBEE, R. W. Aquatic ecosystem variability and climate change - A paleological perspective. In: KERNAN, M.; BATTARBEE, R. W.; MOSS, B. R. (Ed.) **Climate Change Impacts on Freshwater**. Wiley-Blackwell: Oxford, United Kingdom, 2010. p. 15-37.

BEST, J. H. Effects of Microcystis cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Aquatic Toxicology**. v. 64 p. 419-426. 2003.

BEWLEY, J. D., BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2 ed. New York, Plenum Press, 1994.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. **Resolução n. 274, de 29 de novembro de 2000**.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. 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. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011.**

BRÖNMARK, C.; HANSON, L-A. **Biology of Lakes and Ponds.** Great Britain, Oxford: Oxford University Press, 2005.

CARDOSO, V. J. M. Germinação. In: KERBAUY, G. B. (Coord.) **Fisiologia Vegetal.** Great Britain, Wallingford: CAB International, 2000. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

CHISLOCK, M. F. et al. Eutrophication: Causes, Consequences, and Controls in Aquatic Ecosystems. **Nature Education Knowledge**, 2013.

CHORUS, I. (Ed.) Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. **Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt).** Berlim, jun. 2005.

CHORUS, I. et al. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. **Journal of Toxicology and Environmental Health.** v.3, part B, p. 323 – 347, 2000.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.) Toxic Cyanobacterial in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. **World Health Organization.** London: E & FN Spon, 1999.

CHRISTIE, J. M.; MURPHY, A. S. Shoot phototropism in higher plants: New light through old concepts. **American Journal of Botany.** v. 100, n. 1, p. 35-46, 2013.

CONNELL, D. et al. **Introduction to Ecotoxicology.** Blackwell Science, 2009.

CRIVELARO, S. H. R. et al. Evaluation of the use of vinasse as a biostimulation agent for the biodegradation of oily sludge in soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** v. 53 n. 5. p. 1217-1224. Curitiba, 2010.

DAO, T. S. et al. Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. **Toxicon**, v. 55, p. 1244 – 1254. 2010.

DEBERDT, G. L. B. et al. **Florações de Cianobactérias e sua Inserção na Legislação Brasileira**. SANASA, 2004.

DEMOTT, W. R. et al. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. **Limnology and Oceanography**. v. 36 p. 1346-1357. 1991.

DIETRICH, D. R. et al. Toxin mixture in cyanobacterial blooms - a critical comparison of reality with current procedures employed in human health risk assessment. In:

HUDNELL, K. H.; LJTHA, A.; PAOLETTI, R. (Ed.) **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms**. Springer-Verlag New York Inc. New York: 2008. p. 885-912.

DIXON, D. P. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. **Current Opinion in Plant Biology**. v.1 p. 258-266. 1998.

DODDS, W. K. **Freshwater Ecology: Concepts and environmental applications**. Academic Press, San Diego, California: 2002.

ESTEVEZ, F., A. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, FINEP, 1998.

ETTOUMI, A. et al. Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health. In: KATTEL, G. (Ed.) **Zooplankton and Phytoplankton: Types, Characteristics and Ecology**. Ed. Nova, 2011. p. 1-34.

FERRÃO-FILHO, A. S. et al. Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. **Freshwater Biology**. v. 45 p. 1-19. 2000.

FIORINI, L. C. **Identificação de genes codificadores de serina/treonina fosfatases em *Dictyostelium discoideum* e caracterização funcional da proteína fosfatase do tipo 4 (PP4)**. 2003, Tese (Doutorado). Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

GARCIA, J. C. et al. Evolutive follow-up of the photocatalytic degradation of real textile effluents in TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems and their toxic effects on *Lactuca sativa* seedlings. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, n. 9. São Paulo, 2009.

GEHRINGER, M. et al. The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR. **Toxicon**, v. 41, p. 871-876. 2003.

HANSEN, P. D. The potential and limitation of new technical approaches to ecotoxicology monitoring. In: RICHARDSON, M. (Ed.) **Environmental Toxicology Assessment**. CRC Press, 1995. p. 11-28.

HALKINS, B. et al. **Toxicological reviews of cyanobacterial toxins: microcystins LR, RR, YR and LA**. United States Environmental Protection Agency. National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development. 2006

HEALTH CANADA. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality**. Water and Air Quality Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario, 2014.

HEREMAN, T. C. **Efeitos do extrato bruto e da microcistina-LR em *Lactuca sativa* L. (Asteraceae)**. 2010. Dissertação. Instituto de Biociências – Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho.

HUSSAIN, I. **Plant Physiology**. Great Britain, Oxford: Oxford Book Co, 2008.

JIANG, Y. et al. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium—*Microcystis aeruginosa*. **Harmful Algae**, 7, p. 127-136, 2008.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos – métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis-SC: FATMA/GTZ, 2004.

KOMÁREK, J. Modern classification of cyanobacteria. In: SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J. (Ed.) **Cyanobacteria: An Economic Perspective**. Wiley-Blackwell, 2013. p. 21-39.

KÓŠ, P.; et al. Simple and Efficient Method for Isolation and Measurement of Cyanobacterial Hepatotoxins by Plant Tests (*Sinapis alba* L.). **Analytical Biochemistry**, n. 225, p. 49-53. 1995.

KURKI-HELASMO, K. K.; MERILUOTO, J. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1921-1926. 1998.

LEJTINIEMI, M. et al. Turbidity decreases anti-predator behavior in pike larvae, *Esox lucius*. **Environmental Biology of Fishes**. v. 73, p. 1-8. 2005.

LIANG, C. et al. Effect of irrigation with microcystins-contaminated water on growth, yield and grain quality of rice (*Oryza sativa*). **Environmental Earth Sciences**. v. 75 n. 505. 2016.

LUST, J. **The Herb Book**. 1ª ed. Bantam Books, 1983.

MACKINTOSH, C. et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **Febs Letters**, v. 264, n. 2, p. 187-192. 1990.

MAGALHÃES, A. G. **Caracterização de genótipos de alface (*Lactuca sativa* L.) em cultivo hidropônico sob diferentes valores de condutividade elétrica da solução nutritiva**. 2006. Dissertação. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MCELHINEY, J.; et al. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. **Toxicon**, v. 39, p. 1411-1420. 2010.

MELLO, G. S. L. et al. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 1, p. 71-78. 2007.  
microcystin-LR on *Daphnia magna*. **The Journal of Experimental Biology**. v. 215, p. 2795-2805. 2012.

MICHELETTO, J. **Avaliação da ecotoxicidade e da degradação de microcistina-LR por processo foto-Fenton solar**. 2016. 104 f. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

MOHAMED, Z. A. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. **Ecotoxicology**. v. 17. 2008.

MORIARTY, F. **Ecotoxicology – The study of pollutants in ecosystems**. San Diego, California: Academic Press, 1999.

NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE (NRCS). Plants Database. **United States Department of Agriculture**.

NHMRC, NRMCC. **Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy**. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, Canberra. 2011.

NIZAN, S. et al. Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. **Limnology and Oceanography**. v. 31 p. 497-502. 1986.

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

OREN, A. Cyanobacteria: biology, ecology and evolution. In: SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J. (Ed.) **Cyanobacteria: An Economic Perspective**. Wiley-Blackwell, 2013. p. 3-20.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD/OCD). **Test-211** - Guidelines for the testing of chemicals - *Daphnia magna* Reproduction, 2008.

ORTIZ-RODRIGUÉZ, R. O. et al. Transgenerational effects of microcystin-LR on *Daphnia magna*. **Journal of experimental biology**. v. 215 p. 2795-2805. 2012.

ORTIZ-RODRIGUÉZ, R.; WIEGAND, C. Age related acute effects of microcystin-LR on *Daphnia magna* biotransformation oxidative stress. **Toxicol**. v. 56 p. 1342-1349. 2010.

PES, L. Z.; ARENHARDT, M. H. **Fisiologia Vegetal**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Politécnico, Rede e-Tec Brasil, 2015.

PFLUGMACHER, S. et al. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR: the first step in detoxification. **Biochim. Biophys. Acta** 1425, 527–533. 1998

PIETSCH, C. et al. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. **Environmental Toxicology**. v. 16 p. 535-542. 2001.

PONS, T. J. Seed responses to light. In: FENNER, M. (Ed.) **Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities**. Great Britain, Wallingford: CAB International, 2000.

RATSCH, H. C.; JOHNDRO, D. Comparative toxicity of six test chemicals to lettuce using two root elongation teste methods. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 6 p. 267-276. 1986.

RAVEN, P. H. et al. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

ROHRLACK, T. et al. Effects of Cell-Bound Microcystins on Survival and Feeding of *Daphnia* spp. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 3523-3529. 2001.

SALVATORE, M. D. et al. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. **Chemosphere**. v. 73 p. 1461-1464. 2008.

SEDMAK, B. et al. The biological role of cyclic hepatotoxic and non-hepatotoxic cyanopeptides and its ecological consequences. In: SANTOS, E. B. (Ed.) **Ecotoxicology Research Developments**. Editora Nova, 2009. p. 269-300.

SILVEIRA, A. L. **Avaliação do efeito inibitório de extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* Kützing**. 2012. 114 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

SMOL, J. P. **Pollution of Lakes and Rivers: A Paleoenvironmental Perspective**. Second Edition. Wiley-Blackwell: Oxford, United Kingdon, 2009.

SOARES, R. M. et al. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 70, p. 1-10, 2004.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. In: ROMERO, P. R.; CANTÚ, A. M. (Ed.) **Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas em água y suelo - La experiencia en México**. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2008. p. 55-68.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 10<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites** – 600/3-88/029, Washington, DC. 1989.

WANG, W. Rice seed tests for organic and inorganic substances. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 29 p. 101-107. 1994.

WILLIAMS, P. E.(Ed.) **Marine and Freshwater Harmful Algal Blooms**. New York: Nova Science Publishers, 2010. p. 1-10

WOODHOUSE, J. N. et al. Cyanotoxins In: SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J. (Ed.) **Cyanobacteria: An Economic Perspective**. Wiley-Blackwell, 2013. p. 257-268.

WRIGHT, D. A.; WELBOURN, P.(Ed.) **Environmental Toxicology**. Cambridge University Press, 2002.

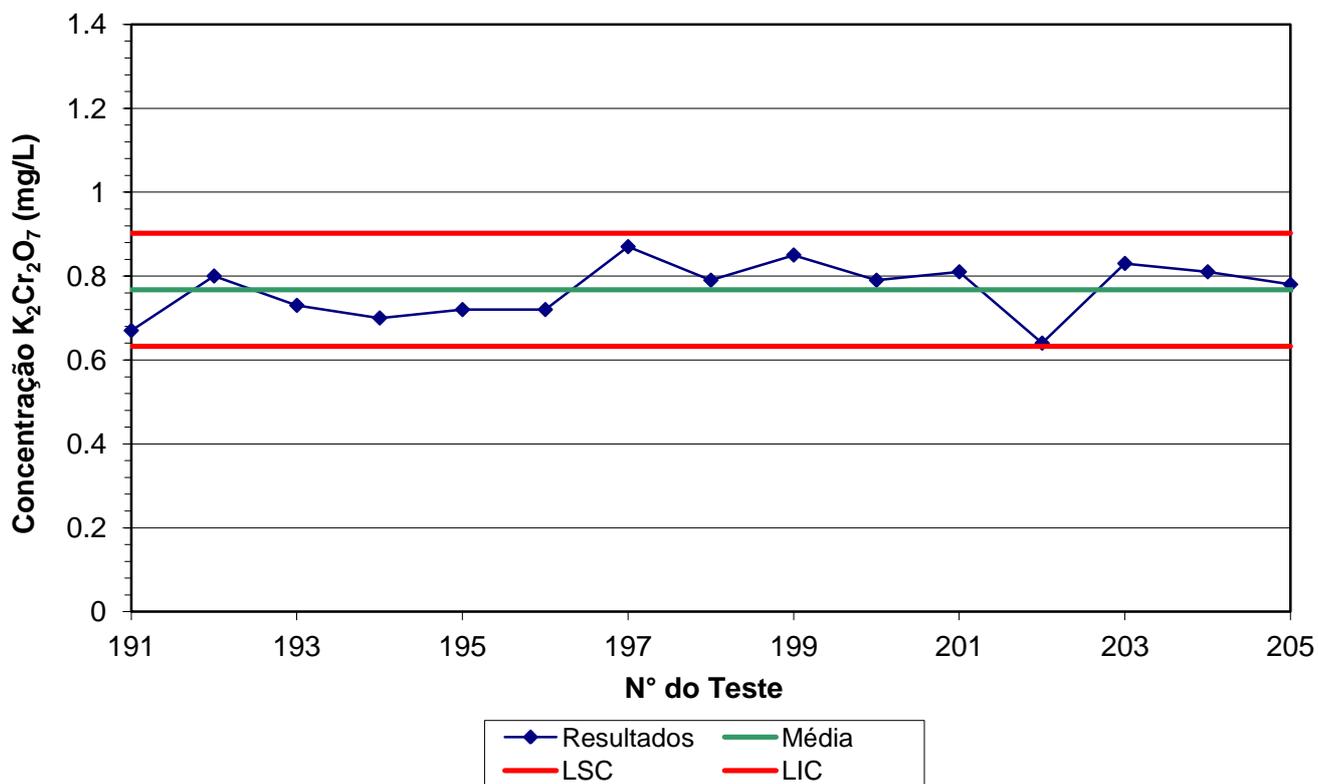
YOUNG, B. J. et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. n. 76, p. 182-186. 2012.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. 2<sup>a</sup> ed. São Carlos: Rima, 2008.

### APÊNDICE A – Carta Controle de sensibilidade de *D. magna* ao dicromato de potássio

Número teste	Data	CE <sub>50</sub> K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
191	21/07/2016	0.67
192	27/07/2016	0.80
193	28/07/2016	0.73
194	29/07/2016	0.7
195	06/08/2016	0.72
196	12/08/2016	0.72
197	19/08/2016	0.87
198	26/08/2016	0.79
199	02/09/2016	0.85
200	15/09/2016	0.79
201	22/09/2016	0.81
202	30/09/2016	0.64
203	07/10/2016	0.83
204	20/10/2016	0.81
205	28/10/2016	0.78

Carta Controle de Sensibilidade K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>



### ANEXO A - Composição do meio nutriente ASM-1.

Solução Estoque	Composição da Solução Estoque	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Volume a adicionar para 1 L de meio (mL)
Solução A	NaNO <sub>3</sub>	8,5	20
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,45	
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,05	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,45	
Solução B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,7	5
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	7,06	
Solução C	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28,4	0,1
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	13,9	
	FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	9,14	
	ZnCl <sub>2</sub>	3,35	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,19	
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,014	
Solução D	EDTA Tritriplex	18,6	0,4

Fonte: Oliveira, 2009.

**ANEXO B – Meio Básico para teste de toxicidade aguda com *D. magna*.**

Solução Estoque	Composição da Solução Estoque	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Volume a adicionar para 1 L de meio (mL)
1	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	8	20
2	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,7	5
3	KCl	28,4	0,1
4	NaHCO <sub>3</sub>	18,6	0,4

Fonte: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2009.

### ANEXO C – Meio para pré-cultura de *S. subspicatus*.

Solução Estoque	Composição da Solução Estoque	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Volume a adicionar para 1 L de meio (mL)
1	NH <sub>4</sub> Cl	1,5	10
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,2	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,8	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16	
2	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,080	1
	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,10	
3	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,185	1
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,415	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,007	
	ZnCl <sub>2</sub>	0,030	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,015	
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,010	

Fonte: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2009.

**ANEXO D - Meio nutriente DIN para testes de toxicidade com *D. subspicatus*.**

Solução Estoque	Composição da Solução Estoque	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Volume a adicionar para 1 L de meio (mL)
1	NH <sub>4</sub> Cl	1,5	100
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,2	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,8	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16	
2	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,080	10
	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,10	
3	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,185	10
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,415	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,007	
	ZnCl <sub>2</sub>	0,030	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,015	
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,010	

Fonte: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2009.