

Risco de *Microcystis* spp. tóxico no cenário da piscicultura brasileira

Risk of toxin-producing *Microcystis* sp. in the Brazilian aquaculture system

Elisabete Hiromi Hashimoto¹, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira²,
Elisa Yoko Hirooka³

Resumo

No Brasil, a piscicultura se destaca como atividade econômica em crescente desenvolvimento, favorecida pelo fator climático e disponibilidade de recursos hídricos. Entretanto, o desenvolvimento acelerado desta atividade modifica as condições ambientais, devido à alimentação empregando ração. O elevado teor de nutrientes na água, principalmente de nitrogênio e fósforo, causa eutrofização e florescimento de cianofíceas tóxicas. O peixe ocupa o topo da cadeia trófica na água e expõe-se diretamente às cianofíceas, seja pelo contato como por ingestão. Estudos experimentais relatam intoxicação em peixe devido a microcistinas (MCs) e componentes celulares de *Microcystis* spp., a exemplo de ácidos graxos e lipopolissacarídeos (LPS). Intoxicação aguda e letalidade causada por microcistinas são associadas à hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico. Outros efeitos patológicos associados à MC incluem danos no tecido cardíaco, renal, branquial e no baço, assim como lesão crônica nos hepatócitos e necrose. Referente a toxicidade crônica, estudos detalhados são necessários para comprovar o efeito promotor de tumor de determinadas cianotoxinas. A revisão compila informações sobre efeitos tóxicos de *Microcystis* sp. em peixes e as implicações na piscicultura.

Palavras-chave: *Microcystis*; piscicultura, toxicidade.

¹ Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, TAM / CCA / UEL

² Docente do Depto Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, ESALQ, Piracicaba-SP,

³ Docente do Depto Tecnologia de Alimentos e Medicamentos - TAM.

Centro de Ciências Agrárias - CCA / Universidade Estadual de Londrina - UEL.

Endereço para correspondência: Caixa Postal 6001 - Cep 86051-990- Londrina-PR

E-mail:hirooka@uel.br

Abstract

Aquaculture has been a growing affair in the recent Brazilian agribusiness, stimulated by adequate climate condition and abundant supply of water reservoir. Nevertheless, an uncontrolled fish harvest activity can result in deleterious impact in environment caused by increasing nutrient level in water due to feed input, mainly of nitrogen and phosphorus, and consequent eutrophication and toxic cyanobacteria bloom. The fish places in the top of aquatic food chain system, which exposes directly to toxic cyanobacteria. Experimental studies reported the toxicity of microcystins (MCs) and others toxic components of *Microcystis* sp. cells, such as fat acids and lipopolysaccharides (LPS). General acute toxicity and death caused by MCs were associated with intrahepatic hemorrhage and hypovolemic shock, but other pathological symptoms include damages in heart, kidney, gills, and spleen, as progressive and chronic hepatocyte injury and necrosis. However, further systematic studies are required concerning tumor-promoting effect of some cyanotoxins. This review compiles the information about toxicity of *Microcystis* sp. in fish and its implication in the aquaculture system.

Key words: *Microcystis*, aquaculture, fish and toxicity.

INTRODUÇÃO

O uso de recursos hídricos para a criação de peixe experimentou um crescimento substancial nos últimos anos, cujo sistema de policultivo aliado ao incremento de ração resultaram na eutrofização nos tanques. O acúmulo de nutrientes no ambiente aquático, principalmente de nitrogênio e fósforo causam queda na qualidade da água, constituindo a causa mais comum de florescimento (*'bloom'*) de cianofíceas toxigênicas, onde *Microcystis* spp. se destaca pela floração cosmopolita e produção de microcistina (MC). A intoxicação e letalidade em peixe devido a *'blooms'* decorre de hemorragia intra-hepática resultante de choque hipovolêmico desencadeada pela MC, e/ou diminuição dos teores de oxigênio dissolvido, decorrente de crescimento microbiano.

Os peixes predominantemente cultivados no Brasil são tilápias e carpas pela excelência na rusticidade, rápido ganho

de peso e habilidade de aproveitar resíduos agropecuários. Ocupando o topo da cadeia alimentar no ambiente aquático, o peixe, principalmente de espécies fitoplanctófagas como tilápia e carpa, expõe-se diretamente às cianotoxinas seja por contato ou ingestão.

As cianofíceas, além de causarem prejuízos econômicos na piscicultura, podem afetar a qualidade da carne pela bioacumulação de cianotoxina, atingindo indiretamente a saúde humana. Conseqüentemente, a produção de peixe requer rigoroso controle de qualidade desde a água, composição de rações e aspecto sanitário no manejo, processamento e comercialização. No contexto, a inserção dos testes de toxicidade capazes de estabelecerem limites permissíveis quanto a contaminantes químicos, assim como caracterizar as injúrias teciduais, constituiriam em ferramenta primordial na segurança e qualidade da carne de peixe.

Considerando as atribuições crescentes na piscicultura, a revisão discorre sobre o efeito de *Microcystis* spp. toxigênica em peixe e o impacto na piscicultura brasileira no cenário de agronegócio globalizado.

PANORAMA DA PISCICULTURA BRASILEIRA

A piscicultura tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos, constituindo alternativa eficaz na obtenção de proteína nobre de baixo custo. A atividade consiste na produção comercial em cativeiro, cujos aspectos inerentes dependem de rigoroso controle de qualidade em todas as etapas de cultivo e produção ⁽¹⁾.

O fator climático brasileiro favorece a competitividade comercial de peixe, permitindo produção com o custo quatro vezes inferior a países da Europa ou de outros países

desenvolvidos. Tradicionalmente, o Brasil exporta pescado para os EUA (70%), Japão (20%), Argentina (2%), com perspectiva de ampliação no Mercosul e Comunidade Econômica Européia (CEE). Embora seja um dos melhores produtores em cativeiro das Américas, a exportação nacional baseia-se em captura, sendo que em 2001 o país atingiu pela primeira vez um superávit na balança comercial de pescado, com saldo de US\$22,6 milhões ⁽²⁾.

A produção de peixes fluviais de 6,6 mil toneladas em 1995 elevou-se para 17,5 mil toneladas em 2001, sendo 62% destinada ao pesque-pague, 26% às indústrias, 10% consumo diretamente e 2% comercializadas em feiras. A comercialização através de pesque-pague quadruplicou no Estado do Paraná, com incremento anual de 1,1 mil em 1995 para 4,3 mil toneladas em 2001. Entre as principais espécies produzidas, destaca-se a tilápia com participação de 64,9% e carpas, 15,5% da produção estadual ⁽¹⁾.

O desenvolvimento acelerado na piscicultura brasileira atraiu indivíduos inexperientes na área, gerando impacto negativo na biota aquática. A implementação dos sistemas de cultivo modificou as condições ambientais seja pela alteração na flora, fauna ou sedimentos, podendo em muitos casos, afetar moderadamente o clima local. A quantidade excedente de ração resulta em desequilíbrio ecológico, alterando parâmetros físico-químicos que afetam diretamente o meio aquático. O requisito básico da água para o cultivo aquático depende da perfeita interação entre oxigênio disponível, temperatura, matéria orgânica (fecal, restos alimentares e organismos mortos), nutrientes, espécie e densidade mantida no sistema, cujo equilíbrio colabora para o sucesso da atividade.

Salienta-se que 80% do nitrogênio da ração é excretado como amônia, cuja elevada concentração pode provocar atraso no crescimento e intoxicação letal em peixe, sendo a toxidez

dependente da espécie, temperatura, com efeito acentuado em pH elevado. Em síntese, por mais que se desenvolvam rações balanceadas, estas podem ser comprometidas pela perda por lixiviação de nutrientes, ou provocar queda na qualidade da água, afetando a saúde animal. Entre os efeitos na biota aquática, salienta-se o aumento dos níveis de nutrientes, turbidez, matéria orgânica no sedimento, decréscimo na biodiversidade, redução de oxigênio dissolvido e mudanças na condutividade / pH ⁽³⁾.

A introdução excessiva de matéria orgânica acelera o crescimento de microalgas e plantas superiores, perturbando o balanço de biota aquática e, conseqüente florescimento de algas diminui os níveis de oxigênio assim como a liberação de cianotoxinas induz a morte dos peixes.

Entre cianofíceas destacam-se os gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Nostoc* produtoras de MC, metabólito secundário tóxico de ocorrência cosmopolita em reservatórios de água doce ⁽⁴⁾. *Microcystis aeruginosa*, espécie unicelular de distribuição universal, é a principal produtora de MCs durante floração nos meses favorecidos pela temperatura da água em torno de 22°C ⁽⁵⁾.

O CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) determina que águas destinadas à criação natural e/ou intensiva na aqüicultura para alimentação humana devem preencher requisitos para classe 2, perante limites de nutrientes e características físicas e químicas ⁽⁶⁾. O limite permitido de MCs em água potável é de 1µg.L⁻¹ ⁽⁷⁾.

A análise físico-química de águas de piscicultura da região de Londrina-PR (Julho/2001) mostrou alteração marcante nos níveis de alcalinidade, condutividade, nitrogênio total, nitrito, nitrato e amônia, possivelmente devido ao incremento de rações. O teor de nitrogênio total apresentou-se elevado (41,63 a 83,26 mg.L⁻¹) principalmente no ponto com maior

densidade de peixe, indicando que o cultivo propicia a eutrofização e condições para o florescimento de cianofíceas⁽⁸⁾.

O monitoramento durante um ano de fitoplâncton num pesqueiro em São Paulo-SP identificou 112 táxons distribuídos em 52,7% Cholorophyceae, 17,9% Cyanophyceae, 10, 7% Bacillariophyceae, 8,9% Euglenophyceae, 8,0% Zygnemaphyceae, 0,9% Dinophyceae e 0,9% Crysophyceae⁽⁹⁾.

Tamanaha *et al.*, (2002)⁽¹⁰⁾, monitorando seis tanques de piscicultura (Agosto–Outubro/2000) no Alto Vale do Itajaí-SC, onde predomina o cultivo de tilápia (80%), carpa (15%) e bagre africano (5%), detectaram fitoplâncton composto de 51 espécies, com floração priedominante de *Microcystis* spp. atingindo densidade máxima de $5,12 \times 10^6$ cél.mL⁻¹. Segundo os autores, o modelo de policultivo aplicado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI integrava a atividade de suinocultura, visando diminuição do impacto ambiental, i.e. os dejetos constituem fonte alimentar direta (resíduos) e indireta (crescimento de fitoplâncton e zooplâncton) na produção de pescado. Todavia, a piscicultura como alternativa para o aproveitamento de dejetos e sobras afeta a qualidade sanitária de peixe⁽¹¹⁾, assim como a introdução excessiva de matéria orgânica exacerba o crescimento de fitoplâncton, afetando o balanço da biota aquática e reduzindo os níveis de oxigênio⁽¹²⁾.

Tendo em vista o aumento mundial na demanda de produtos de pescado, a implementação de práticas capazes de assegurar a qualidade desde a água, composição de rações formuladas, a aspecto sanitário do processamento e comercialização torna-se fundamental. A produção brasileira deve acompanhar esta tendência de piscicultura no cenário de agronegócio globalizado, i.e. acelerar a implementação dos processos de controle baseado em metodologias analíticas químicas e biológicas. O fato implica na inserção dos testes

de toxicidade capaz de estabelecer limites permissíveis perante as mais diversas substâncias químicas, visando avaliar o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos presentes nos corpos hídricos ⁽¹³⁾, assim como caracterizar os danos provocados em peixe, i.e. iniciar a introdução de ferramenta primordial para direcionar o controle da segurança e qualidade da carne de peixe nacional.

ESTRUTURA QUÍMICA DE MC

As MCs são heptapeptídeos monocíclicos, compostos de três D-aminoácidos na porção invariável e constante na molécula, além de dois L aminoácidos e dois aminoácidos raros. Os D-aminoácidos consistem de alanina, ligação b eritro-b metil-ácido aspártico; ligação g-ácido glutâmico (Ala-b-Me-Asp-Glu). Os dois aminoácidos raros correspondem a N-metildehidroalanina (Mdha) e 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico (Adda) ⁽¹⁴⁾.

A estereoquímica do Adda tem sido recentemente determinada e designada de 2S, 3S, 8S, 9S, completando a estrutura absoluta da hepatotoxina ⁽¹⁵⁾. Os dois resíduos de L-aminoácidos variáveis e respectivas combinações incluem leucina e alanina (MC-LA), leucina e arginina (MC-LR), tirosina e arginina (MC-YR), tirosina e alanina (MC-YA) e tirosina e metionina (MC-YM). Estas diferentes estruturas dependem principalmente de dois resíduos de aminoácidos variáveis e secundariamente, da presença ou ausência de grupamentos metil em b-Me-Asp e/ou Mdha ⁽⁴⁾.

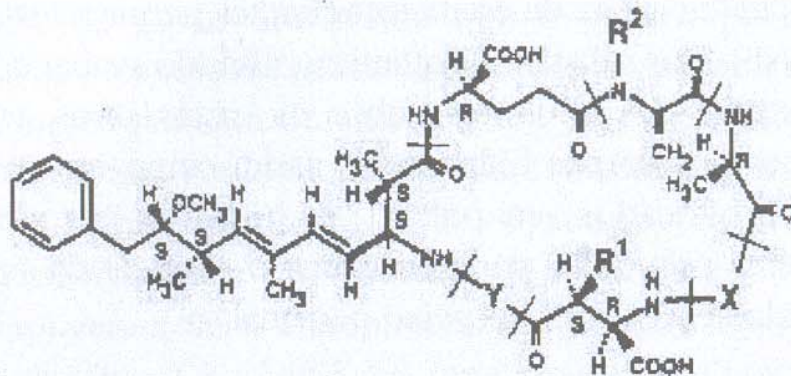


Figura 1. Estrutura química de MCs

MECANISMO DE AÇÃO DE MC

Os peptídeos tóxicos produzidos por cianofíceas tem causado intoxicação em animais selvagens e domésticos ^(4, 16). A característica marcante em MC é a presença de grupamento Adda, também presente em nodularinas, capaz de aumentar a hidrofobicidade, aliado a Mdha que age como receptor adicional ⁽¹⁷⁾. Adda parece desempenhar papel de destaque na hepatotoxicidade, já que a remoção ou saturação reduz drasticamente a toxicidade de MC-LR. Isômeros geométricos no C7 de Adda em MC-LR e RR foram essencialmente atóxicos ⁽¹⁸⁾, porém a substituição do grupo metoxi no C9 de Adda por grupos acetoxi ou hidroxí não reduziu a toxicidade. Embora a estrutura tenha se mantido indeterminado ⁽¹⁹⁾, a toxicidade de MC-LR foi reduzida pela adição de unidade (C₃H₇O₂) no resíduo Glu, sugerindo a importância de ácido carboxílico livre na toxicidade. A redução da ligação dupla e adição de glutatona em Mdha não reduziu a toxicidade de MC-LR ^(17, 20), reforçando a importância de Adda e Glu na hepatotoxicidade de MCs ⁽²¹⁾.

Toxicidade aguda

O ensaio de hepatotoxicidade em rato mostrou acentuado aumento de volume hepático em resposta ao nível sérico ⁽²²⁾. Nishiwaki-Matsushima *et al.*, (1992) ⁽²³⁾ demonstraram inibição de proteína fosfatase 1 e 2 membranar e frações citosólicas de hepatócitos por MC-LR, -YR, e -RR, com o aumento na fosforilação de proteínas em nível de intensidade similar ao ácido okadáico ⁽²⁴⁾. Estas hepatotoxinas potentes causam alteração substancial na arquitetura hepática pelo rearranjo de organelas e reorganização de microfilamentos. Em contraste a outros envenenamentos por algas, esta intoxicação caracterizou-se pelo aparecimento de pontos vermelho-escuros e hepatomegalia com acúmulo de sangue, atingindo volume de duas vezes o peso normal ⁽²⁵⁾.

A letalidade de MC se atribui a choque hipovolêmico, devido ao seqüestro de sangue pelo fígado ⁽²⁶⁾. Pesquisas extensivas foram realizadas para explicar o mecanismo de ação destas hepatotoxinas, desencadeando seqüência de eventos até o choque hemorrágico. A toxina é absorvida no íleo através de carreadores bile-ácidos, que funcionam como transportadores das toxinas peptídicas através da membrana ⁽⁴⁾, preferencialmente para os hepatócitos ^(4, 27). A seguir, as MCs atuam sobre os microfilamentos de actina, componentes de citoesqueleto celular, causando uma agregação densa de microfilamentos próximos ao centro da célula. O fato pode ser interpretado como perda de suporte celular, conduzindo à destruição de sinusóides endoteliais. A destruição de parênquima celular e sinusóide hepática resulta em hemorragia intrahepática (após horas) e/ou insuficiência hepática (após dias) ⁽²²⁾.

Toxicidade crônica

A MC que inibe a proteína fosfatase e ativa a fosfolipase A₂ e cicloxigenase em hepatócito, induz a produção de TNF- α (tumor necrosis factor α) e interleucina-1 (IL-1) em macrófago. MC provavelmente estimula a via da cicloxigenase no metabolismo de ácido araquidônico em hepatócito ⁽²⁸⁾. Embora ainda não se conheça o mecanismo de liberação de metabólitos de ácido araquidônico, pesquisas demonstraram a reação de MC com grupamento tiol de glutation ⁽¹⁷⁾, Coenzima A (CoA) pode inibir a atividade de Acil-CoA-aciltransferase e acil-CoA-acilsintetase; bloqueando a reabsorção de ácido araquidônico livre no agrupamento lipídico, aumentando a síntese de prostaglandinas ⁽²⁹⁾. Reacilação de ácido araquidônico liberado talvez seja um fator de controle no balanço de ácido araquidônico livre e produção de seus metabólitos ⁽²⁸⁾.

Comparada a promotores de tumor, representado por fenobarbital, hexaclorociclohexano, acetato de de ciproterona e ácido chenodeoxicólico, a MC é o mais potente promotor de tumor hepático até então conhecido ⁽²³⁾. A ingestão de água de valas e açudes contaminadas com alto grau de cianofíceas no Norte de Xangai, China, foi relacionada a incidência de câncer primário de fígado no fator de oito vezes superior a população abastecida com água de qualidade adequada ⁽²³⁾.

EFEITO TÓXICO DE MC EM PEIXES

A exposição humana a cianotoxinas ocorre por diferentes vias, incluindo: dérmica, inalação, oral e intravenosa (pacientes de hemodiálise). A intoxicação direta por MC decorre da ingestão de água contaminada com cianofíceas tóxicas, enquanto que a modalidade indireta decorre do consumo de animais que ingeriram cianotoxinas. A bioacumulação de MCs

é fenômeno comum em invertebrados e vertebrados aquáticos, incluindo peixe ⁽³⁰⁾. Ligação covalente de MC-LR em fígado de salmão já foi relatado ⁽³¹⁾. Portanto, a ingestão indireta, capaz de afetar a saúde humana, depende de toxicidade da floração na área de pesca.

Inicialmente, a letalidade de peixes devido a florações tóxicas foi correlacionada com a hipóxia, causada pela alta demanda bioquímica de oxigênio no ambiente aquático. Todavia, Rodger *et al.*, (1994) ⁽³²⁾ observaram dano hepático similar a peixe tratado com *Microcystis* spp. toxigênica *in vitro*, em truta contaminada com 'bloom' no Lago Loch Leven, Escócia, onde ocorria saturação de aproximadamente 90% de oxigênio. O fato indicou que o efeito seja pela diminuição dos teores de oxigênio, como ação direta de MC ^(33, 34, 35).

A dose letal (LD₅₀) intraperitoneal (i.p.) de MC-LR é de 550 µg.Kg⁻¹ (de massa corpórea) em carpa ⁽³⁵⁾, 2,6 mg.Kg⁻¹ em "goldfish" ⁽³⁴⁾, 1,6 mg.Kg⁻¹ em Salmão ⁽¹⁶⁾. Os peixes apresentaram maior sobrevivência e tolerância a altas doses de MCs, se comparados a ratos e camundongos com LD₅₀ 122 e 72 µg.Kg⁻¹, respectivamente ⁽³⁶⁾. A cinética de absorção da toxina parece ser mais lenta no hepatócito de peixe ⁽¹⁶⁾. Runnegar *et al.* (1991) ⁽³⁷⁾ observaram uma redução na absorção de MC-YM por hepatócito de rato diminuindo a temperatura de incubação; salienta-se que os peixes vivem naturalmente em temperaturas inferiores aos mamíferos.

Efeito agudo de cianofíceas e MCs em peixe resultou em danos hepáticos extensivos a morte ^(33, 34, 35). Além de necrose tecidual, a exposição crônica de toxina reduziu a taxa de crescimento em trutas, devido ao estresse comprometendo a absorção e eficiência na conversão de alimentos⁽³⁸⁾.

As principais alterações histológicas por MC em peixe ocorreram no fígado, rim e brânquias. O salmão (*Salmo salar*)

submetido à dose cumulativa $1,66 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de MC-LR apresentou alteração hepática em até 36 dias após injeção i.p, sendo observado necrose difusa e megalocitose hepática ⁽¹⁶⁾. Em carpa, as doses i.p de $130\text{-}250 \text{ }\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de MC-LR causaram dano hepático com dissociação de hepatócitos e degeneração hidrópica, enquanto que no rim ocorreram dilatação da cápsula de Bowman e glomérulo. Dose de $550 \text{ }\mu\text{g.Kg}^{-1}$ causou perda total da arquitetura de parênquima hepático com degeneração de túbulos renais ⁽³⁵⁾. A partir de $400 \text{ }\mu\text{g.Kg}^{-1}$, além de danos no hepatopâncreas e renal, possibilitou detectar MC procedendo marcação imuno-histoquímica, após 1 hora da aplicação de dose ⁽³⁹⁾.

Os parâmetros bioquímicos de toxidez utilizados na análise de MCs baseiam-se na análise de enzimas hepáticas, além de íons plasmáticos. Em carpa submetida a diferentes vias de administração (injeção i.p., imersão e ingestão forçada – ‘gavage’ de extratos semi-purificados de *M. aeruginosa* toxigência) ocorreu aumento na atividade de aspartame e alanina aminotranferase (AST e ALT) e na concentração de ácidos biliares e bilirrubinas (i.p. $2,5\text{-}50 \text{ mg.Kg}^{-1}$). O decréscimo de Na^+ e Cl^- plasmático ocorreu em todas as vias: gavage de $2,5\text{-}250 \text{ }\mu\text{g.Kg}^{-1}$, imersão em aquário com $1,7 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e em carpas coletadas em lago contaminado com MCs ^(30, 40). Aumento na atividade de AST e ALT indica dano hepático, enquanto que elevados valores de ácidos biliares e bilirrubina estão envolvidos na excreção da toxina, correlacionando com redução na função hepática. A redução de Na^+ e Cl^- plasmático em todas as vias de administração indicaram que os tratamentos induziram a excreção desses íons em nível excedente a absorção ^(30, 40).

As lesões em brânquias por MC-LR foram avaliadas em tilápia, truta e em carpa, observando-se necrose e estrutura vacuolar, ponta lamelar dobrada e esfoliação do epitélio

lamelar ⁽³⁰⁾. Lesões nas brânquias podem ocorrer devido ao alto pH resultante de atividade fotossintética e excesso de amônia procedente da decomposição de cianofíceas, aumentando a absorção de MC e incrementando necrose hepática ⁽³²⁾.

As MCs alteraram o estado de fosforilação em proteína celular pela inibição de proteína fosfatase PP1 e PP2A ⁽⁴¹⁾, afetando Na⁺/K⁺ATPase e Ca²⁺ATPase Mg²⁺ dependente. A mortalidade em massa repentina foi inicialmente atribuída a efeitos inibitórios nas bombas de íons das brânquias⁽⁴²⁾.

Em peixes de água doce, o sistema renal elimina a água, enquanto que o sódio e cloro são mantidos pelas células clorídricas e células respiratórias do epitélio branquial na lamela secundária. As células clorídricas inibem a saída de sais, enquanto as células respiratórias realizam a troca de metabólitos por sódio e cloro na água (ex.: Na⁺/NH₄⁺, Na⁺/H⁺ e Cl⁻/HCO₃⁻). A depressão na atividade da bomba iônica afetou o movimento de amônia e dióxido de carbono corporal ⁽⁴⁰⁾, conduzindo a depressão respiratória pela redução da afinidade de hemoglobina pelo oxigênio (efeito Bohr) ⁽⁴⁰⁾. Os distúrbios na homeostase iônica diminuíram a capacidade de regulação da pressão osmótica, balanço de água e equilíbrio ácido-base, influenciando a irritabilidade muscular, permeabilidade de membrana, manutenção do potencial de membrana, transmissão de impulso nervoso e produção de secreção contendo sódio ou cloro (ex: KCl, HCl, NaCl) ^(30, 40).

Posteriormente, Bury *et al.* (1998) ⁽⁴³⁾ constataram que a inibição de bombas iônicas seja na verdade devido a determinados ácidos graxos, que extraídos de *M. aeruginosa* inibiram a absorção de Ca²⁺ e atividade de paranitrofenolfosfatase K⁺ dependente em tilápia (*O. mossambicus*). O mesmo efeito inibitório não foi demonstrado por MC-LR *in vitro* ^(38, 43).

Referente à cinética da toxina em peixe, MC é rapidamente absorvida e acumulada no fígado e lentamente eliminada/degradada, sendo o perfil similar a mamíferos ⁽²³⁾. Em truta administrada com de 5,7 mg.Kg⁻¹ de massa corpórea por *gavage*, o pico máximo de MC-LR* (marcada) no plasma (517ng.mL⁻¹) ocorreu após 3hrs, reduzindo ao nível de 6,0 ng.mL⁻¹ (limite de detecção) após 48hrs. No fígado, a detecção de MC-LR* já ocorreu em 1hora após a administração, com o pico máximo após 3hrs da administração (524ng.g⁻¹ de tecido) e permaneceu detectável mesmo após 72hrs ⁽⁴⁴⁾. A eliminação da toxina ocorre através da bile, podendo ser conjugada com glutathione via glutathione S-transferase, i.e. a etapa inicial de detoxificação ⁽⁴⁵⁾.

Em peixe saudável, maior parte da toxina é absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo a absorção branquial ou dérmica desprezível ⁽⁴⁴⁾. No entanto, o extrato lisado de *M. aeruginosa* contém uma variedade de substâncias tóxicas como ficocianinas, capazes de causar reações inflamatórias na superfície epitelial ou mucosa. Uma reação inflamatória moderada a severa pode aumentar a permeabilidade superficial, eventualmente inclusive perante MCs ⁽⁴⁶⁾.

O lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias Gram negativas, incluindo cianofíceas, são tóxicos e altamente inflamatórios, estimulando a liberação de fatores inflamatórios, citando-se fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interferon gama (IFN-g) e interleucinas 1 e 6 (IL-1, -6) ⁽⁴⁷⁾. LPS também estimulam a produção de óxido nítrico (NO), agente de vasodilatação, hipotensão, ativando o sistema renina-angiotensina ⁽⁴⁸⁾. O aumento nos níveis de angiotensina II circulante estimula a ingestão de água, conduzindo a maior exposição intestinal a componentes presentes como microrganismos e toxinas e conseqüente absorção e danos em outros órgãos ⁽⁴⁹⁾.

A exposição de peixes ao extrato de cianofíceas promoveu desbalanço osmorregulatório, com aumento na ingestão de água acoplado a incapacidade de remover o excesso de água. O aumento da massa hepática resultante decorre da exposição e absorção da toxina no intestino e efeito no fígado. Florações de cianofíceas não são axênicas e tipicamente têm sido associadas a bactérias heterotróficas ⁽⁴⁹⁾, portanto os LPS de florações podem ser originários seja de própria cianofíceas, ou de bactérias associadas ^(47, 50).

As preparações de LPS de cianofíceas (*Microcystis* CYA43, *bloom* de *Microcystis* e *Glotrichia*) reduziram a atividade de glutathione S transferase microssomal e solúvel (GSTm e GSTs) em carpa. A exposição de 10µg.L⁻¹ MC-LR aumentou enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peróxido de glutathione (GSH-Px), indicando a importância na eliminação de oxigênio reativo (ROS) e regeneração de GSH, devido ao estresse oxidativo resultante de exposição à MC. A continuidade de estresse induzido pela toxina pode resultar em danos a hepatócitos como apoptose e necrose celular ⁽⁵¹⁾. A redução da atividade GST comprometeu severamente a capacidade de detoxicação, aumentando a susceptibilidade a outras toxinas de cianofíceas, assim como contaminantes de corpo d'água a exemplo de pesticidas ⁽⁴⁷⁾.

Peixes fitoplanctófagos

Espécies que se alimentam de fitoplâncton são denominadas fitoplanctófagas. As cianofíceas são componentes regulares na dieta de peixes ciclídeos e ciprinídeos (Cichlidae e Cyprinidae), embora a redução na ingestão de células por tilápia (*Oreochromis niloticus*) e carpa (*Hypophthalmichthys molitrix*) expostas a cianofíceas tóxicas já tenha sido demonstrada ⁽⁵²⁾.

Carpas e Tilápias expostas à mistura de cultura de *M. aeruginosa* tóxica e atóxica diminuíram progressivamente a

taxa de ingestão e movimentos operculares, sendo o efeito proporcional ao aumento de cultura tóxica. Os movimentos operculares envolvem a passagem de água pelas brânquias de peixe, aumentando absorção de água. Em aquários contendo linhagens tóxicas e nível de MC-LR extracelular variando de 0,8 a 4,28 $\mu\text{g.L}^{-1}$, mas não apresentou correlação significativa entre concentrações elevadas de MC-LR extracelular e diminuição da ingestão de células e de movimentos operculares em peixe. No entanto, a correlação significativa ($r = -0.98$) indicou que maior proporção de células toxigênicas (toxina intracelular) resultou em menor consumo de células pelo peixe, sugerindo distinção entre linhagens tóxicas e não tóxicas por peixe se deva a diferentes propriedades na superfície celular e não a níveis de MC-LR ^(52, 53).

Carpa prata (*H. molitrix*) nativa do leste da Ásia consistem de herbívoros (fitoplanctófagos) adaptados a filtrar o alimento constituído de fitoplâncton e, frequentemente expõe-se em ambientes eutrofizados contendo cianofíceas tóxicas ⁽⁵⁴⁾. O aumento numérico de carpas prata no Lago Donghu (China) eutrofizado com *Microcystis* spp., *Anabaena* spp. e *Oscillatoria* spp. eliminou completamente as florações, indicando a sua utilização para conter a contaminação de cianotoxinas em águas eutrofizadas ⁽⁵⁴⁾.

As evidências indicaram baixa digestibilidade e eficiência de conversão de *M. aeruginosa* no estômago de *H. molitrix*. Não obstante, o suco gástrico estomacal de *O. niloticus* atinge $\text{pH} < 1$ e facilita a digestão, podendo assimilar de 70-80% de carbono oriundo de *Microcystis* spp., *Anabaena* spp. e diatomáceas *Nitzschia* spp. ⁽⁵²⁾. Além disso, as tilápias possuem um mecanismo de filtração envolvendo revestimento mucóide produzido pelo filamento branquial. Este mecanismo interrupto retém o alimento através de revestido mucóide, no entanto, não há evidências da capacidade de peixe em distinguir a presença de células tóxicas para evitar a ingestão nesta etapa ⁽⁵²⁾.

O monitoramento da Lagoa de Jacarepaguá-RJ (Agosto/1996 a Novembro de 1999) mostrou contaminação de MC em praticamente todos os períodos, com nível máximo de $980\mu\text{g.L}^{-1}$. MCs ocorreram em 75% de em Tilápia (*Tilapia rendalli*) coletada na lagoa, com positividade no fígado (nd- $31,1\mu\text{g.g}^{-1}$), vísceras (nd- $67,8\mu\text{g.g}^{-1}$) e tecido muscular (nd- $26,4\text{ng.g}^{-1}$), porém sem mortalidade, indicando que os peixes não evitaram a ingestão de cianofíceas tóxicas. Embora as tilápias sejam resistentes à intoxicação aguda, não há evidência de um sistema de detoxicação capaz de metabolizar MC em composto atóxico. Em novembro de 1996, a concentração de MCs em tecido muscular atingiu $16,2\text{ng/g}$, representando ingestão de $0,081\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de MC, se considerar a ingestão de 300g de peixe por indivíduo de 60 Kg ⁽⁵⁵⁾, i.e. dobro da dose diária tolerável por peso corpóreo para MC-LR ($0,04\mu\text{g.Kg}^{-1}$) em humano ⁽⁵⁶⁾.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A piscicultura constitui produção comercial de peixe em cativeiro, cujos aspectos inerentes dependem de rigoroso controle desde a qualidade de água, devido ao risco de eutrofização e florescimento de cianofíceas toxigênicas.

Os peixes mais cultivados no Brasil, pertencentes às espécies fitoplanctófagas (tilápias e carpas), se expõem a cianofíceas tóxicas através da ingestão direta de células. *Microcystis* spp. destacam-se como produtoras de MCs, com efeitos hepatotóxicos e possível promotor de tumor, além de outros componentes tóxicos. A exemplo, a inibição de atividade $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ se atribui a determinados ácidos graxos de membrana, assim como LPS de cianofíceas reduzem a atividade enzimática de glutathione S transferase, diminuindo a capacidade

em detoxicar MCs, indicando a potencialização de efeitos tóxicos.

Os peixes se caracterizam como os animais mais expostos à intoxicação por cianofíceas tóxicas, por compartilhar o hábitat aquático eutrofizado. O estudo envolvendo efeito tóxico de florações de cianofíceas deve considerar a possível toxicidade oriunda de interação entre os mais diversos componentes biológicos.

Diante da escassez de informação sobre efeito tóxico de cianofíceas na piscicultura brasileira, assim como a falta de monitoramento nesta atividade em ascensão, investigações abrangentes devem objetivar amplo controle de qualidade, envolvendo desde qualidade da água até o produto final, evitando a bioacumulação e riscos à saúde humana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq, Fundação Araucária e JICA pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SEAB – Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. **Aspectos da Agropecuária Paranaense Piscicultura**. <http://www.pr.gov.br/seab/aspectos/piscicu.html>. Acesso em: 01/09/200.
2. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Pesca e Aqüicultura – DPA. <http://www.agricultura.gov.br/dpa> Acesso em 2002.
3. Tabolt C, Hole R. Fish diets and the control of eutrophication resulting from aquaculture. **Journal of Applied Ichthyology**, .10, .258-270, 1994.

4. Carmichel WW. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology.**, 72, 445-459. 1992
5. Reynolds CS, Jaworski GHM, Cmiech HA, Leedale GF. On the annual cycle of the blue-green algae *Microcystis aeruginosa* Kütz Elekin. Proceedings and Philosophical Transactions of the Royal Society of London, **Biological Sciences**, 293, 1068, 419-477, 1981.
6. CONAMA, Conselho Nacional do Meio ambiente, RESOLUÇÃO CONAMA Nº 20, de 18 de junho de 1986/ D.O.U. de 30/7 /86, **CONAMA** <http://www.agricultura.gov.br/dpa/decreto/resolucao020.htm> Acesso em 03/2002.
7. Ministério da Saúde. Portaria 1469 – Norma de Qualidade da água para consumo humano. **Ministério da Saúde.** 29/12/2000.
8. Hashimoto EH. Interação microcistina-fumonisina-aflatoxina e o impacto na piscicultura. Londrina –2002. Tese de Mestrado. Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos. **Universidade Estadual de Londrina.** 2002
9. Matsuzaki M, Mucci JLN, Sant’anna CL. Comunidade Fitoplanctônica de um Pesqueiro no Município de São Paulo: Aspectos Ecológicos e Sanitários. IX Reunião Brasileira de Ficologia. Algas – Biodiversidade e Exploração Racional. **Sociedade Brasileira de Ficologia.**p.159 Fundação Ecosistemas do Espírito Santo, Santa Cruz, Aracruz, ES. 02-06/03/2002.
10. Tamanaha MS, Garcia M, Rörig LR, Tamassia STJ, Schappo CL. Modelo Alto do Itajaí de Piscicultura Integrada: (4) Composição Qualitativa e Quantitativa do Fitoplâncton. IX Reunião Brasileira de Ficologia. Algas – Biodiversidade e Exploração Racional. **Sociedade Brasileira de Ficologia.**p.185. Fundação Ecosistemas do Espírito Santo, Santa Cruz, Aracruz, ES. 02-06/03/2002.
11. Zoccarato I, Benatti G, Calvis S L. Use of pig manure as fertilizer with and without supplement feed in pond carp production in Northern Italy. **Aquaculture**, 29, 387-390, 1995.
12. Gowen RJ. Managing eutrophication associated with aquaculture development. **Journal of Applied Ichthyology**, 10, 245-257, 1994.

13. Bertoletti E. Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição. **CETESB**. São Paulo, 1990.
14. Botes DP, Kruger H, Viljoin CC. Isolation and characterization of four toxins from the blue-green algae, *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, 20, 945-954, 1982.
15. Rinehart KL, Namikoshi M, Choi BW. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). **Journal of Applied Phycology**, 6, 159-176, 1994.
16. Andersen RJ, Luu HA, Chen Z X, Holmes CFB, Kent ML, LeBlanc M, Taylor FJR, Williams DE. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon 'netpen liver disease'. **Toxicon**. 31; 1315-1323. 1993.
17. Kondo F, Ikai Y, Oka H, Okamura M, Ishikawa N, Harada K-I, Matsuura K, Murata H, Suzuki M. Formation, characterization and toxicity of the glutathione and cystine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. **Chemical Research Toxicology**, 5, 591-596, 1992.
18. Harada K-I, Matsuura K, Suzuki M, Watanabe MF, Oishi S, Dahlem A M, Beasley VR, Carmichael WW. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystin LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). **Toxicon**, 28, 55-64, 1990.
19. Namikoshi M, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Rouhianen LL, Luukainen R, Rinehart KL. Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. **Toxicon**, 30, 1093, 1992.
20. Namikoshi M, Rinehart KL, Sakai R, Scotts RR, Dahlen AM, Beasley VR, Carmichael WW, Evans W R. Identification of 12 hepatotoxins from Homer lake bloom of cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*: nine new microcystins. **Journal Organic Chemistry**, 57, 866-872, 1992.
21. Stotts RR, Namikoshi M, Haschek WM, Rinehart KL, Carmichael WW, Dahlen AM, Beasley VR. Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* sp. **Toxicon**, v.31, p.783-793, 1993.

22. Hooser SB, Beasley VR, Waite LL, Kuklenschmidt MS, Carmichael WW, 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**, 28, 259-266. 1991.
23. Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, 118, 420-424, 1992.
24. Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe MF, Harada K-I, Ichihara A, Carmichael WW, Fujiki H. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, 116, 609-614, 1990.
25. Hooser SB, Beasley VR, Basgall EJ, Carmichael WW, Haschek WM. Microcystin – LR – induced ultra-structural changes in rats. **Veterinary Pathology**, 27, 9-15, 1990.
26. LeClaire RD, Parker GW, Franz DR. Hemodynamic and colorimetric changes induced by microcystin –LR in the rat. **Journal Applied Toxicology**, 15, 4, 303-311, 1995.
27. Dabholkar AS, Carmichael WW. Ultra-structural changes in the mouse liver induced by hepatotoxin from freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain 7820. **Toxicon**, 25. 285-292. 1987
28. Nassef SM, Hines HB, Creasia D A. Inhibition of microcystin-induced release of cyclooxygenase products from rat hepatocytes by anti-inflammatory steroids. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 195, 345-399, 1990.
29. Hunter SA, Burstein S, Sedor C. Stimulation of prostaglandin synthesis in WI-38 human lung fibroblasts following inhibition of phospholipid acylation by p-hydroxy mercurebenzoate. **Biochemistry Biophysics Acta**, 793, 202, 1984.
30. Carbis CR, Rawlin GT, Grant P, Mitchell GF, Anderson JW. & MacCauley. A study of feral carp *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implication on fish health, H. **Journal Fish Disease**, 20, 81-91, 1997.

31. Williams DE, Craig M, Dawe SC, Kent ML, Andersen RJ, Holmes CFB. 14C labeled microcystin-LR administered to atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. **Toxicon**, 35, 6, 985-989, 1997.
32. Rodger HD, Turnbull T, Edwards C, Codd GA. Cyanobacterial bloom associated pathology in brown trout *Salmo trutta* L. **Journal Fish Disease**, 17, 117-181, 1994
33. PHILIPS, MJ, ROBERTS, RJ, STEWART, J A, CODD, G A. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout, Saomogairderi Richardson. **Journal Fish Disease**., 8, 339-344, 1985.
34. Sugaya Y, Yasuno M, Yanai T. Effect of toxic *Microcystis viridis* and isolated toxins on gold fish. **Japan Journal Limnology**, 51, 149 – 153, 1990.
35. Rabergh CMI, Bylund G, Eriksson JE. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicology**. 20, 131-146. 1991.
36. Miura GA, Robinson NA, Lawrence WB, Pace JC, Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rat. **Toxicon**, 29, 337, 1991.
37. Runnegar MTC, Gerdes RG, Falconer IR. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. **Toxicon**, 29, 43-51. 1991.
38. Bury NR, Flik G, Eddy FB, Codd GA. The effects of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin –LR on Ca²⁺ transport and Na⁺/K⁺-ATPase in Tilapia Gills. **The Journal of Experimental Biology**, 199. 1319-1326. 1996.
39. Fischer WJ, Dietrich DR. Pathological and Biochemical Characterization of Microcystin-Induced Hepatopancreas and Kidney Damage in carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, 167, 73-81, 2000.
40. Carbis CR, Mitchell GF, Anderson JW, McCauley. The effects of microcystins on the serum biochemistry of carp, *Cyprinus carpio* L., when toxins are administered by gavage, immersion and intraperitoneal routes. **Journal of Fish Disease**. 19. 151-159. 1996.

41. Mackintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd G. A Cyanobacterial microcystin LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A. **Febs Letters**. 264, 187-192. 1990.
42. Gaete V, Canelo E, Lagos N, Zambrano F. Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. **Toxicol.** 32, 121-127.1994.
43. Bury NR, Codd GA, Wedelaar Bonga SE, Flik G. Fatty acids from cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with potent inhibitory effects on fish gill Na⁺/K⁺-ATPase activity. **The Journal of Experimental Biology**. 201. 81-89.1998.
44. Tencalla F, Dietrich D. Biochemical Characterization of microcystin toxicity in trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicol.** 35, 583-595. 1997.
45. Beattie KA, Ressler J, Wiegand C, Krause E, Steinberg CE, Pflugmacher S. Comparative effects and metabolism of two MCYSTs and Nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. **Aquatic toxicology**. 62. 219-226. 2003.
46. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Chronic inflammation of the intestine may render the mucosa permeable to antigen present in the lumen. In: Pathology of Domestic animals, p. 39. Academic Press, Fl., 1985.
47. Best JH, Pflugmacher S, Wiegand C, Eddy FB, Metcalf JS, Codd GA. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides , and of microcystin-LR, on glutathione S transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**. 60, 223-231. 2002.
48. Hewett JA, Roth RA. Hepatic and extra-hepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. **Pharmacology Ver**. 45, 381-411.1993.
49. Fuentes J, Eddy FB. Cardiovascular responses in vivo to angiotensin II and the peptide antagonist saralasin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal Experimental Biology**. 201, 267-272. 1998.
50. Best JH, Eddy FB, Codd GA. Effects of *Microcystis* cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Aquatic toxicology**. 64. 419-426. 2003.

51. Li X, Liu Y, Song L, Liu J. Response of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. **Toxicon** 42. 85-89. 2003.
52. Beveridge MCM, Baird DJ, Rahmatullah SM, Lawton LA, Beattie KA, Codd GA. Grazing rates on toxic and non-toxic strains of cyanobacteria by *Hypophthalmichthys molitrix* and *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**. 43. 901-907. 1993.
53. Keshavanath P, Beveridge CM, Baird DJ, Lawton LA, Nimmo A, Codd A. The functional grazing response of a phytoplanktivorous fish *Oreochromis niloticus* to mixtures of toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Fish Biology**. 45. 123-129. 1994.
54. Xie P. Gut contents of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) and the processing and digestion of algal cells in the alimentary canal. **Aquaculture**. 195. 149-161. 2001.
55. Magalhães VF, Soares RM, Azevedo SMFO. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brasil): ecological implication and human health risk. **Toxicon**, 39, 7, 1077-85, 2001.
56. WHO – World Health Organization. . Health Criteria and Other Supporting Information **Guidelines for Drinking water Quality**: Second Edition, Addendum to Volume 2. WHO, Geneva. 1998.