



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FLÁVIA MORGANA MONTEIRO

**EFEITOS NAS HIDROLASES E POTENCIAL GENOTÓXICO DE
CIANOTOXINAS EM PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio* – Hamilton, 1822)**

RECIFE
2022

FLÁVIA MORGANA MONTEIRO

**EFEITOS NAS HIDROLASES E POTENCIAL GENOTÓXICO DE
CIANOTOXINAS EM PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio* – Hamilton, 1822)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Sistemas Biológicos

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra
Coorientadores: José Etham de Lucena Barbosa
Diego de Souza Buarque

Recife

2022

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Monteiro, Flávia Morgana

Efeitos nas hidrolases e potencial genotóxico de cianotoxinas em peixes-zebra
(*Danio rerio* – Hamilton, 1822) / Flávia Morgana Monteiro. – 2022.

98 f. : il.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra.

Coorientador: José Etham de Lucena Barbosa.

Coorientador: Diego de Souza Buarque.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife,
2022.

Inclui referências e anexos.

1. Água - Poluição. 2. Saúde ambiental. 3. Peixes - Efeitos da poluição da água. I. Bezerra, Ranilson de Souza (orientador). II. Barbosa, José Etham de Lucena (coorientador). III. Buarque, Diego de Souza (coorientador). IV. Título.

628.168

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-149

FLÁVIA MORGANA MONTEIRO

**EFEITOS NAS HIDROLASES E POTENCIAL GENOTÓXICO DE
CIANOTOXINAS EM PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio* – Hamilton, 1822)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 04 / 04 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Juliana dos Santos Severiano (Examinadora Externa)
Universidade Estadual da Paraíba

Prof^o. Dr. Rafael David Souto de Azevedo (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Aos meus pais, José Velez Monteiro e Maria José Monteiro, por todo o amor e sacrifícios dedicados a mim, com o intuito de me oferecer a melhor herança: A EDUCAÇÃO!
A Kaio Monteiro Silva, meu filho, minha vida, minha continuidade.

AGRADECIMENTOS

Chegou ao fim mais uma etapa da minha vida. Junto a ela chega a hora de deixar o meu agradecimento a todos os que de alguma forma me acompanharam e ajudaram a alcançar mais um sucesso. Foram quatro anos de muitos desafios em que cresci, mas acima de tudo em que conheci pessoas sem as quais, hoje, penso que estes anos não teriam sido o mesmo e talvez nem tivesse chegado onde cheguei.

Em especial...

A Deus por estar ao meu lado em cada passo que dei até aqui, por me guiar nos meus piores momentos, por todo amor, sabedoria e sustento para que eu pudesse alcançar os meus objetivos.

A meus pais, pessoas sábias e guerreiras. Minha Maria e meu José. Como tenho orgulho de vocês, é impossível descrever o quanto vocês representam pra mim. Saibam que essa vitória é nossa!

A meu amado filho Kaio Monteiro Silva, por entender minha ausência física nos momentos em família, e por ser o motivo e força para continuar essa jornada.

A meus irmãos (Marciano, Manuela, Marlon), por todo amor, apoio, compreensão, incentivo, e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu amor, Gustavo Correia, que está sempre me acompanhando e consolando em todas as minhas derrotas e vibrando comigo em todas as vitórias. Te agradeço por toda a dedicação comigo, por cada sorriso colocado no meu rosto quando as coisas não davam certo, por aguentar minhas lamentações e frustrações.

Ao professor Ranilson de Souza Bezerra, por toda confiança em mim depositada e por sempre acreditar em meu potencial. Em nenhum momento você desacreditou da minha capacidade, mesmo quando minha saúde mental já não estava lá essas coisas, tive seu apoio e total compreensão. Serei eternamente grata!

Ao Coorientador Prof. José Etham, coordenador do Laboratório de Ecologia Aquática (LEAq/UEPB), pela parceria e por todo apoio. Além de suas contribuições que vieram a somar no meu trabalho.

Ao Coorientador Diego Buarque por toda compreensão e apoio que me fizeram lapidar este trabalho, exibindo sua real contribuição.

Aos professores Thiago Napoleão, Luiz Carvalho, Juliana Severiano, Rafael Azevedo, que gentilmente abriram espaço em suas agendas para compor a banca de avaliação dessa tese, trazendo valiosas contribuições em diferentes frentes e perspectivas.

Aos meninos do LABENZ/UFPE (Caio, Robson, Diego e Rafael) que auxiliaram na execução dos experimentos e que por algumas vezes conduziram essas etapas em minha ausência (devido à pandemia e problemas de saúde) com total responsabilidade. Sem dúvida vocês foram fundamentais na construção deste trabalho, serei sempre grata!

Aos meus colegas do LEAq/UEPB pelos momentos de descontração no laboratório e fora dele. Sem vocês seria tudo mais difícil.

À Fátima Rodrigues "Fatinha", por todo apoio, amizade, risos, estresse... sua irmandade foi fundamental para me fortalecer nos momentos distantes da minha família... muito obrigada, a você e sua família por todo o carinho direcionados a mim!

Aos demais companheiros que encontrei na UFPE, entre eles cito aqui Mariana, Sibelle, Helinho e Camila, obrigada pelas trocas de conhecimento, convívio e os momentos de descontração durante o decorrer do doutorado, sem dúvida levarei essa amizade para toda a minha vida.

Aos "primos" Ana, Pedro, D. Nina, Sr. Bidá, Sr. Horácio e D. Severina, que me abrigaram em suas casas (durante o período dos experimentos), como se fosse uma filha. Vocês sabem o quanto são importantes para mim e minha família. Serei sempre grata!

Aos demais, Sr. Eraldo, D. Fátima, Nathália, Kaline, Hannah e Alana pelo apoio e momentos de descontração.

As minhas amigas Iara, Tati e Camilly, por sempre se preocuparem e orarem por mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Aos docentes por colaborarem na minha formação.

A secretária "Adê", que por inúmeras vezes, de maneira solícita, resolveu diversas questões relacionadas ao andamento do curso, e muitas delas à distância.

A CAPES – O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço a todos!

“O êxito na vida não se mede pelo que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou ao longo do caminho.”
Abraham Lincoln

RESUMO

Florações de cianobactérias representam potencial risco para os animais, inclusive os seres humanos, pelo fato de produzirem compostos tóxicos que comprometem a qualidade da água. A fim de minimizar o risco de exposição às cianotoxinas e confirmando a necessidade de se estabelecer um monitoramento para garantir a segurança, a OMS (Organização Mundial da Saúde) e os órgãos responsáveis pela gestão da água em cada país, desenvolveram um quadro de recomendações para o manejo de toxinas de algas em águas potáveis e recreativas, com valores máximos permitidos de cianotoxinas. Nesse sentido, o presente estudo avaliou as técnicas biológicas utilizadas para detecção das cianotoxinas microcistina-LR, cilindrospermopsina, saxitoxina e anatoxina, bem como, compreender mecanismos de toxicidade neurológicas, digestivas e genotóxicas ocasionados por esses compostos secundários. Assim, no 1º capítulo foi realizado um estudo de revisão sobre as técnicas biológicas utilizadas para detecção das cianotoxinas: bioensaios com organismos modelos, ensaio de inibição da proteína fosfatase (PPIA) e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dentre essas técnicas, o ensaio ELISA é o mais comumente utilizado, no entanto, esse método não é tão eficaz na detecção de toxinas como a saxitoxina e cilindrospermopsina. Pois, esse método pode subestimar a concentração dessas toxinas quando mais de uma variante se faz presente. Diante disso, faz-se necessário abordagens analíticas capazes de quantificar toxinas multiclasses em matrizes ambientais, e assim direcionar para um tratamento mais eficaz da água de reservatórios destinados ao abastecimento público. No 2º capítulo foram avaliados os possíveis efeitos neurológicos, digestivos e genotóxicos das cianotoxinas (microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermopsina (CYN), saxitoxina (STX), e anatoxina (ATX)) em concentrações baixas e em valores máximos permitidos (VMP) pela OMS e pela legislação brasileira (CONAMA e Ministério da Saúde), utilizando o peixe-zebra como organismo modelo. Então, foi observado que a exposição as cianotoxinas (MC-LR, CYN, STX, ATX) nas concentrações testadas induziu efeitos bioquímicos e genotóxicos no sistema nervoso e digestivo do peixe-zebra, além disso, os resultados aqui encontrados servem como alerta e gatilhos para novos estudos no que diz respeito aos níveis de toxinas permitidos pela legislação na água usada para abastecimento público.

Palavras-chave: Desordens metabólicas; Hepatotoxinas; Neurotoxinas; Perfil da Expressão Gênica; Qualidade da Água.

ABSTRACT

Cyanobacterial blooms pose a potential risk to animals, including humans, as they produce toxic compounds that compromise water quality. In order to minimize the risk of exposure to cyanotoxins and confirming the need to establish monitoring to ensure safety, the WHO (World Health Organization) and the bodies responsible for water management in each country have developed a framework of recommendations for the management of algal toxins in drinking and recreational waters, with maximum permissible values of cyanotoxins. In this sense, the present study evaluated the biological techniques used to detect the cyanotoxins microcystin-LR, cylindrospermopsin, saxitoxin and anatoxin, as well as to understand mechanisms of neurological, digestive and genotoxic toxicity caused by these secondary compounds. Thus, in the 1st chapter, a review study was carried out on the biological techniques used for the detection of cyanotoxins: bioassays with model organisms, protein phosphatase inhibition assay (PPIA) and the enzyme immunosorbent assay (ELISA). Among these techniques, the ELISA assay is the most commonly used, however, this method is not as effective in the detection of toxins such as saxitoxin and cylindrospermopsin. This method may underestimate the concentration of these toxins when more than one variant is present. In view of this, it is necessary analytical approaches capable of quantifying multiclass toxins in environmental matrices, and thus directing towards a more effective treatment of water from reservoirs intended for public supply. In the 2nd chapter, the possible neurological, digestive and genotoxic effects of cyanotoxins (microcystin-LR (MC-LR), cylindrospermopsin (CYN), saxitoxin (STX), and anatoxin (ATX)) at low concentrations and at maximum permitted values were evaluated (VMP) by the WHO and Brazilian legislation (CONAMA and Ministry of Health), using zebrafish as a model organism. So, it was observed that exposure to cyanotoxins (MC-LR, CYN, STX, ATX) at the concentrations tested induced biochemical and genotoxic effects in the nervous and digestive system of zebrafish, in addition, the results found here serve as a warning and triggers for further studies regarding the levels of toxins permitted by legislation in water used for public supply.

Keywords: Metabolic disorders; Hepatotoxins; Neurotoxins; Gene Expression Profile; Water quality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas no mundo	18
Figura 2- Representação da estrutura molecular da microcistina- LR (MC- LR)	20
Figura 3- Vantagens do uso do peixe-zebra como organismo modelo	34

Artigo 1

Figura 1- Estruturas químicas das principais cianotoxinas relevantes	40
--	----

Artigo 2

Figura 1-Efeitos da microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermospina (CYN)	66
Figura 2-Efeitos da microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermospina (CYN)	67
Figura 3-Efeitos da microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermospina (CYN)	67
Figura 4- Efeitos da microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermospina (CYN),	68
Figura 5- Determinação da expressão de transcritos em diferentes órgãos	69

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1- Mecanismos de exposição às cianotoxinas	42
Tabela 2- Cianotoxinas: resumo das estruturas químicas, principais gêneros	44
Tabela 3- Valor máximo permitido de cianobactérias conforme resolução 357/2005 para três diferentes classes de água doce.....	46
Tabela 4- Vantagens e limitações dos métodos biológicos utilizados para detecção de cianotoxinas	49

Artigo 2

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	65
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase

ANOVA – Análise de Variância (do inglês, Analysis of variance)

ATX – Anatoxina

BAPNA – N- α -benzoyl-L-arginina *p*-nitroanilida

BBB – Barreira Hematoencefálica

CAT – Catalase

CYN – Cilindrospermopsina

DA – Doença de Alzheimer

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNAmt – DNA mitocondrial

DTNB – 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)

ERO's – Espécies Reativas de Oxigênio

GPx – Glutathione Peroxidase

GR – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione Reduzida

LPO – Peroxidação Lipídica

MC – Microcistina

MC-LR – Microcistina-LR

MC-RR – Microcistina-RR

MS – Ministério da Saúde

NAD (P) – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NAD (P) H – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PSP – Intoxicação Paralítica por Molusco

PST's – Toxinas Paralíticas de Marisco

ROS – Reactive Oxygen Species

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido Dismutase

STX – Saxitoxina

Tris-HCl – hidrocloreto de 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

VGSC – Voltagem Canal de Sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 EUTROFIZAÇÃO E CIANOBACTÉRIAS	18
2.2 CIANOTOXINAS	19
2.2.1 Microcistinas	19
2.2.2 Cilindropermopsina	21
2.2.3 Saxitoxina	23
2.2.4 Anatoxina	24
2.3 LEGISLAÇÃO PARA CONTROLE DE CIANOBACTÉRIAS E MONITORAMENTO DE CIANOTOXINAS	26
2.4 ENZIMAS	27
2.4.1 Acetilcolinesterase	29
2.4.2 Proteases (EC 3.4)	30
2.4.2.1 Tripsina (EC, 3.4.21.4)	30
2.4.2.2 Quimotripsina (EC, 3.4.21.1)	31
2.5 BIOMARCADORES DE TOXICIDADE	31
2.6 ORGANISMO MODELO: DANIO RERIO	33
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1 ARTIGO 1 MÉTODOS BIOLÓGICOS USADOS PARA DETECÇÃO DE CIANOTOXINAS (MICROCISTINA-LR, CILINDROSPERMOPSINA, SAXITOXINA E ANATOXINA-A) EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	49
3.2 ARTIGO 2 EFEITOS NEUROTÓXICOS DE CIANOTOXINAS EM PEIXE-ZEBRA (<i>Danio rerio</i> HAMILTON, 1822)	71
4 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	78
ANEXO A- SÚMULA CURRICULAR	97
ANEXO B	98

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas associados às mudanças climáticas e interferência de ações antropogênicas dos ecossistemas aquáticos é a eutrofização. A eutrofização contribui para a alta biomassa fitoplanctônica, depleção de oxigênio, diminuição da transparência da água, gosto, cheiro e odor desagradáveis e restrição de atividades recreativas (Mantzouki et al., 2016; Janssen, 2019). Muitos desses problemas são causados pela prevalência das cianobactérias, muitas das quais são indesejáveis do ponto de vista de qualidade da água (Brasil et al., 2016; Havens et al., 2017).

As cianobactérias podem produzir uma ampla gama de metabólitos secundários, incluindo as cianotoxinas, que podem causar implicações na saúde da vida aquática, animais terrestres, e até mesmo humanos (Baiget et al., 2017; Funari et al., 2017; Qiao et al., 2019). As toxinas produzidas pelas cianobactérias pertencem a várias classes com propriedades físico-químicas, estruturais e mecanismos de ações toxicológicas diferentes. As cianotoxinas podem ser classificadas em hepatotóxicas (microcistina, nodularina, cilindrospermopsina), neurotóxicas (anatoxina-a, saxitoxina) ou dermatotóxicas (Buratti et al., 2017; Zhao et al., 2019). Além disso, também são consideradas citotóxicas, imunotóxicas e genotóxicas (Chen et al., 2020).

Diante dessas circunstâncias, os efeitos tóxicos das cianotoxinas têm sido amplamente estudados. Dentre essas, as microcistinas (MCs) e cilindrospermopsina (CYN) estão entre as mais frequentemente investigadas devido à sua toxicidade e ampla distribuição (Spoof and Catherine, 2017). As MCs possuem cerca de 246 variantes, sendo a forma MC-LR a mais tóxica e frequentemente observada em florações de cianobactérias (Díez-Quijada et al., 2019). Sua ação tóxica está relacionada à inibição das proteínas fosfatases 1 (PP1) e 2^a (PP2A) (Dietrich and Hoeger, 2005; Papadimitriou et al., 2018). Além disso, é reconhecida por induzir o estresse oxidativo (Buratti et al., 2017), alterar atividades enzimáticas (Moreno et al. 2005; Atencio et al., 2008), induzir apoptose (Zhou et al., 2017) e foi classificada como possível carcinogênico (Zegura, 2016). A toxicidade das cilindrospermopsinas (CYN) está associada à inibição irreversível da síntese de proteínas, à depleção da glutatona (GSH) relacionada ao estresse oxidativo (Gutiérrez-Praena et al., 2011; Silva et al., 2017) e indução da fragmentação do DNA (Puerto et al., 2018). Esses mecanismos podem afetar adversamente

uma ampla variedade de alvos em um organismo (Buratti et al 2017; Guzmán-Guillén et al., 2017).

Quanto às neurotoxinas, as saxitoxinas são responsáveis por bloquearem os canais de Ca^{2+} e K^{+} nas células cardíacas, evitando a propagação da transmissão elétrica dentro dos nervos periféricos e músculos esqueléticos ou cardíacos (O'Neill et al., 2016; Christensen & Khan, 2020). Já a anatoxina-a atua como agonista competitivo da acetilcolina, podendo se ligar a seus receptores de membrana específicos (mAChR), levando ao bloqueio da transmissão do sinal neuromuscular, causando superestimulação das células musculares (Aráoz, Molgo e Marsac, 2010; Colas, Duval e Marie, 2020).

Tendo em vista os efeitos tóxicos ocasionados por essas cianotoxinas, eo aumento de intoxicações por florações de cianobactérias tóxicas, limites máximos aceitáveis de toxinas foram determinados por órgão mundial (OMS) e nacionais (Ministério da Saúde (MS) e Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)). A definição de limites para a concentração de cianobactérias e suas toxinas requer a necessidade imediata de ações de controle e vigilância da qualidade d'água. Vários são os métodos utilizados para detecção desses metabólitos secundários, mas os métodos biológicos como bioensaios em animais para avaliar a toxicidade de amostras de águas com florações, imunoensaio tipo ELISA, e ensaios de inibição enzimática dominam as análises de cianotoxinas. A escolha do método mais adequado irá depender do nível e da qualidade da informação desejada. A disponibilidade de equipamento, o custo da análise, o treinamento pessoal e o tempo necessário para a obtenção de resultados são as principais diferenças entre os métodos e importantes parâmetros a serem considerados durante a definição da metodologia. Entretanto, tais metodologias de detecção ainda dificultam o monitoramento em pequenas e médias comunidades (Pearson e Neilan, 2008; Mekebriet *al.*, 2009). Diante disso, o presente trabalho traz uma revisão dos principais métodos biológicos utilizados para detecção de cianotoxinas.

Para avaliação ecotoxicológica das cianotoxinas, foi utilizado neste trabalho o peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822). Essa escolha teve como propósito o uso de um organismo aquático com sensibilidade adequada a poluentes (Brito & da Luz, 2015), o que permitiu a obtenção de importantes informações sobre os possíveis impactos neurológicos e intestinais a que os organismos aquáticos possam estar submetidos em eventos de floração de cianobactérias. Além disso, seguiu os indicativos de que devem ser usados em bioensaios organismos que sejam sensíveis e representativos para uma das categorias importantes do meio investigado, neste caso os peixes (Brito & da Luz, 2015; Marins, 2018). Como os peixes de um modo geral respondem aos produtos químicos no ambiente, o peixe-zebra também se

tornou um organismo modelo para estudos ecotoxicológicos (Azevedo et al., 2020). É um bom indicador de contaminação de poluentes por possuir fácil adaptação e sensibilidade às condições ambientais, não requer grande espaço para cultivo e criação, além de sua utilização ser bem documentada (Meyers, 2018). Isso foi demonstrado com estudos que avaliaram o efeito de metais pesados e de agrotóxicos utilizando peixe-zebra como modelo (Bridi et al., 2017; Marins, 2018; Pereira et al., 2018).

Tendo em vista que os trabalhos realizados com peixe-zebra avaliaram os efeitos de altas concentrações de cianotoxinas (Kist et al., 2012; Wu et al., 2017; da Silva et al., 2014; Hou et al., 2015), o presente estudo visa preencher a lacuna dos efeitos desses compostos tóxicos em concentrações baixas, referente às concentrações permitidas pela legislação na água bruta. Neste contexto, os biomarcadores serão usados para identificar as interações entre as cianotoxinas e a espécie *Danio rerio*, e, dessa forma, indicar os efeitos causados por esses compostos no organismo alvo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliaros métodos biológicos utilizados para detecção de cianotoxinas, bem como compreenderas respostas enzimáticas e moleculares como forma de esclarecer mecanismos pelos quais as cianotoxinas microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermopsina (CYN), saxitoxina (STX) e anatoxina (ATX) podem ser prejudiciaisao peixe-zebra adulto.

1.1.2Objetivos específicos

- Explorar as vantagens e desvantagens dos métodos biológicos utilizados para detecção de cianotoxinas;
- Estimar alterações na atividade enzimática da enzima acetilcolinesterase extraídasdo cérebro e músculo do peixe-zebra;
- Estimar alterações nas atividades das enzimas digestivas tripsina equimotripsina extraídas do peixe-zebra;
- Apontar o efeito da microcistina-LR em diferentes transcritos (superóxido dismutase, acetilcolinesterase, tripsina e quimotripsina) dos tecidos do peixe-zebra.

2REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EUTROFIZAÇÃO E CIANOBACTÉRIAS

A eutrofização é uma preocupação global e tem sido considerada uma grande ameaça aos ecossistemas aquáticos (Figura 1). Esse processo consiste na resposta do ecossistema à carga de nutrientes, normalmente nitrogênio (N) e fósforo (P), causada pelo efeito de fatores naturais e atividades antropogênicas como atividades industriais, intensificação da urbanização, despejos de esgotos *in natura*, entre tantas outras que aumentam as concentrações de nutrientes o que acelera a produtividade dos organismos fotossintéticos (Muri et al., 2018). Como consequência tem-se o desequilíbrio ecológico do reservatório, levando ao florescimento frequente de cianobactérias.

Figura 1– Ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas no mundo.



Fonte: Du et al. (2019, p.13)

Dentre os aproximadamente 270 gêneros descritos de cianobactérias (Komárek et al., 2014), 40 estão relacionados com a produção de algum tipo de toxina. Entretanto, à medida que novas pesquisas são desenvolvidas, novas espécies produtoras de cianotoxinas são relatadas. Deste modo, a princípio, qualquer cianobactéria pode ser considerada como potencialmente produtora de cianotoxinas (Bernard et al., 2016). *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia* e *Cylindrospermopsis* são os gêneros mais frequentes em florações de águas superficiais (Munoz et al., 2019).

Uma das grandes preocupações, no que concerne às cianobactérias, está na capacidade em biossintetizar e liberar alguns metabólitos secundários bioativos, conhecidos como cianotoxinas (Huang e Zimba, 2019), que são armazenadas nas células das bactérias e são liberadas para a água durante processo de predação e competição (Wood, 2016). Esses metabólitos podem afetar a atividade das enzimas celulares de outros organismos, interferir nas vias de sinalização das células, causar apoptose dos tecidos, e levar a mortalidade (Huang e Zimba, 2019).

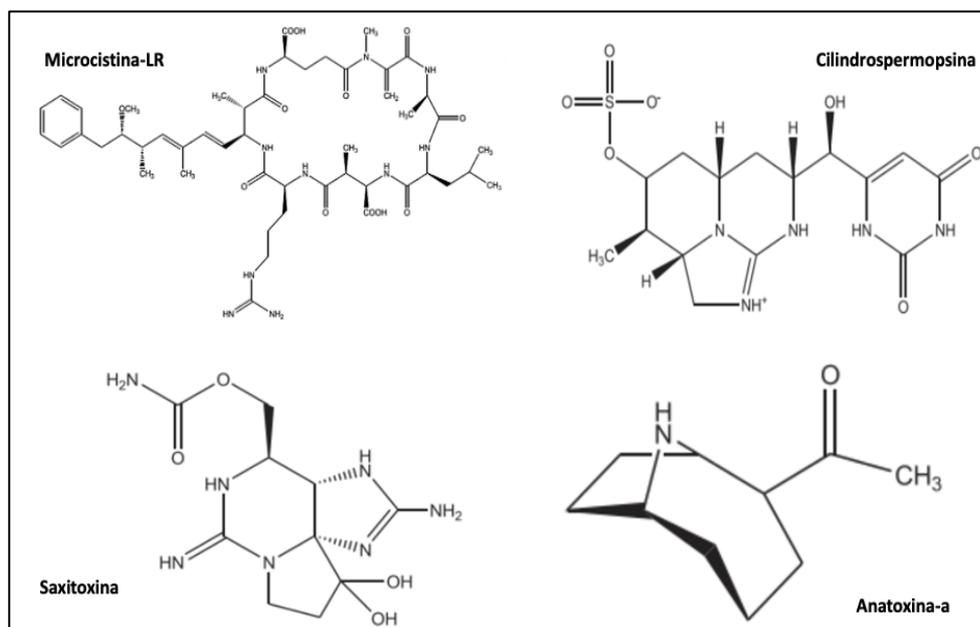
2.2 CIANOTOXINAS

As cianotoxinas divergem em estrutura química e são classificadas em três grandes grupos: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos. Em relação à toxicidade, toxinas de cianobactérias são classificadas como hepatotoxinas (microcistinas, nodularina), citotoxinas (cilindrospermopsina), neurotoxinas (anatoxinas, saxitoxinas, β -metilamino-L-alanina) e dermatotoxinas (lipopolissacarídeo, lingbyatoxinas, aplysiatoxina) (Sanseverino et al., 2017). Dentre eles, as microcistinas (MCs) e particularmente algumas variantes específicas (por exemplo, MC-LR, MC-RR) são as mais frequentemente investigadas e detectadas (Figura 1) (Buratti et al., 2017; Du et al., 2019).

2.2.1 Microcistinas

MCs são toxinas de heptapeptídeos cíclicos e mais de 200 isômeros foram relatados (Spooft e Catherine, 2017). Entre eles, a microcistina-LR (MC-LR) é o isômero mais tóxico e amplamente distribuído (Gupta et al., 2003). O peso molecular de MC-LR é 995,2 Da. A estrutura química de MC-LR (-D-Ala-l-Leu-D-isoMeAsp-l-Arg-l-Adda-D-Glu-Mdha) é cíclica, em que Adda (3-amino-9-metoxi-ácido 2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-dienóico) é um grupo essencial para expressar a toxicidade de MC-LR. Os dois aminoácidos exclusivos do MC-LR são a leucina na segunda posição e a arginina na quarta posição (Figura 2). A estrutura cíclica e a presença dos aminoácidos leucina e arginina tornam a MC-LR resistente ao calor, hidrólise e oxidação. Essas propriedades químicas da MC-LR aumentam sua estabilidade e persistência no meio ambiente (de la Cruz et al., 2011). A MC-LR também é altamente resistente aos processos convencionais de tratamento de água potável, o que aumenta o risco de exposição animal e humana (Song et al., 2011).

Figura 2– Representação da estrutura molecular da microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermopsina (CYN), saxitoxina (STX) e anatoxina-a (ATX-a).



Fonte: Munoz et al. (2019, p.4).

As microcistinas (MCs) estão entre as toxinas cianobacterianas mais difundidas detectadas em águas doces. Elas foram isoladas pela primeira vez da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Carmichael et al. 1990), porém, outros gêneros de cianobactérias também são capazes de sintetizá-los: *Planktothrix*, *Dolychospermum*, *Microcystis*, *Radiocystis*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Aphanizomenon*, *Geitlerinema*, *Leptolyngbya*, *OscillatóriaeAphanothece*. (Bittencourt-Oliveira et al., 2014; Salmaso et al., 2017).

De maneira geral, a absorção de MCs ocorre por meio de polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs), que são expressos em vários tipos de células (Chen e Xie, 2016), como enterócitos, hepatócitos e células epiteliais renais, e órgãos como coração, pulmão, baço, pâncreas, cérebro e barreira hematoencefálica (BHE) (Testai et al., 2016). Isso significa que quantidades significativas de MCs podem atingir o cérebro através da BBB e induzir patologia cerebral, dependendo do tipo e expressão de OATPs na BHE, na barreira sangue-líquido cefalorraquidiano e na membrana da célula neuronal (Westholm et al., 2009). A distribuição sistêmica das MCs nos órgãos é dependente do grau de perfusão sanguínea e dos tipos e nível de expressão dos portadores do OATP (Campos e Vasconcelos, 2010; Díez-Quijada et al., 2019). Além disso, foi recentemente evidenciado que MC-LR induziu a produção de produtos citotóxicos e citostáticos [óxido nítrico (NO)], bem como mediadores pró-inflamatórios, por exemplo, fator de necrose tumoral α , TNF- α e interleucina

6 (IL- 6)] na linhagem de macrófagos RAW 264.7 que não expressam OATPs 1^a1, 1^a5 e 1b2: a captação ocorreu por meio dos receptores Toll-like (TLRs) (Adamovsky et al., 2015).

O mecanismo de ação mais conhecido das MCs é a inibição da proteína serina/treonina fosfatase, que leva à hiperfosforilação de proteínas e desencadeia uma cascata de eventos levando a uma série de respostas celulares, como: modificação do citoesqueleto e ruptura dos filamentos de actina, estresse oxidativo, indução de apoptose, reparo de DNA reduzido e proliferação celular levando a promoção de tumor (Buratti et al., 2017; Catherine et al., 2017; Qian et al., 2018).

MC-LR é a MC mais estudada entre os diferentes congêneres, devido à sua ubiquidade, abundância e toxicidade. Seu alvo principal é o fígado, porém é capaz de afetar outros órgãos como o coração, rim, cérebro e o intestino (Liu, Zhong e Zeng, 2006). A MC-LR tem atraído crescente atenção devido à presença do gene *c-myc*, um proto-oncogene, que codifica um fator de transcrição envolvido no controle da proliferação celular, diferenciação e apoptose, ou seja, pode formar tumores e se tornar ameaça para o organismo (Huiying et al., 2009). Logo, a expressão de *c-myc* desempenha um papel significativo no desenvolvimento do câncer (Fan et al., 2014). De fato, a Agência Internacional de Investigação do Câncer classifica a microcistina-LR como potencialmente cancerígena para o homem (Wang et al., 2015).

Paralelamente, estudos recentes de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* revelaram que a MC-LR apresenta propriedades genotóxicas, ou seja, é capaz de alterar a estrutura ou função da molécula de DNA podendo causar doenças em indivíduos e seus descendentes, além de aumentar a incidência de câncer (Zegura, 2016).

2.2.2 Cilindrospermopsina

Entre as cianotoxinas, a cilindrospermopsina (CYN) vem se tornando uma das toxinas mais importantes da água doce em todo o mundo (de La Cruz et al., 2013), sendo produzida por um grande número de cianobactérias: *Cilindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis Lyngbya*, *Dolichospermum*, *Microseira*, *Oscillatoria*, *Umezakia* (Huang e Zimba, 2019).

A toxina cianobacteriana CYN é um alcalóide tricíclico que consiste em uma porção tricíclica de guanidina combinada com hidroximetiluracila (Hinojosa et al., 2019) (Figura 2). A subunidade uracila e o grupo funcional hidroxí na posição C7 do CYN são responsáveis pela toxicidade (Banker et al., 2001). Atualmente, cinco análogos de CYN são conhecidos, a

saber, CYN, 7-epi-CYN, 7-desoxi-CYN e os dois congêneres recentemente caracterizados, 7-desoxidesulfo-CYN e 7-desoxidesulfo-12-acetil-CYN (Scarlet et al., 2020). Destes, o mais investigado é o CYN, devido a sua maior ocorrência em sistemas aquáticos.

A estrutura molecular da CYN confere características hidrofílicas, por essa razão, sua absorção intestinal e a captação pelos hepatócitos precisam ser mediadas por um sistema de transporte ativo, como o sistema de transporte de ácido biliar, por exemplo, colato e taurocolato (Chong et al. 2002; Buratti et al., 2017). Apesar de ser o fígado seu principal alvo, já foram detectados efeitos tóxicos em outros órgãos como olhos, baço, rins, pulmões, timo, coração, estômago (Guzmán-Guillén et al., 2017; Huang e Zimba, 2019).

O mecanismo de ação mais conhecido para CYN é a inibição da síntese de proteínas (Froschio et al., 2003). Além disso, devido à sua capacidade de aumentar a produção de espécies reativas do oxigênio (VER's), essa toxina pode levar a danos no DNA, causando morte celular por apoptose (Puerto et al., 2011; Guzmán-Guillén et al., 2013; Silva et al., 2017). Do mesmo modo, alguns estudos têm demonstrado a importância de sua ativação metabólica prévia pelo complexo enzimático citocromo P-450, por ser capaz de exercer potencial genotóxico (Žegura et al., 2011; Puerto et al., 2018).

É conhecido e comprovado tanto *in vitro* em culturas primárias de hepatócitos de camundongos (Froschio et al., 2003) e *in vivo* (Terao et al. 1994) que a CYN induz a inibição irreversível da síntese proteica levando à citotoxicidade no fígado e no rim (a depender da concentração). Ao usar inibidores do citocromo P450, a toxicidade de CYN diminui, mas nenhuma proteção contra o comprometimento da síntese de proteínas foi observada (Froschio et al., 2003; Žegura et al., 2011), sugerindo que o composto original e os metabólitos possivelmente formados poderiam exercer toxicidade com mecanismos diferentes, também dependendo das concentrações de CYN (Buratti et al., 2017). De modo geral, os efeitos citotóxicos estão associados ao estresse oxidativo devido ao aumento dependente da concentração no conteúdo de H₂O₂, diminuição da atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), nível elevado de glutatona peroxidase e apoptose (Poniedzialek et al., 2014, 2015).

Como citotoxina, esses efeitos também podem ser causados no sistema nervoso. Embora não seja provável que CYN cruze a barreira hematoencefálica por difusão passiva devido às suas propriedades hidrofílicas (Banks, 2009), seu baixo peso molecular pode desempenhar um papel em sua entrada no sistema nervoso. Existem alguns estudos que apontam sua neurotoxicidade em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, embora os mecanismos pelos quais a CYN possa exercer efeitos neurotóxicos no cérebro permaneçam desconhecidos

(Hinojosa et al., 2019). Somados a esses, estudos *in vitro* do mesmo grupo relataram o possível efeito imunotóxico do CYN (Poniedzialek et al., 2012).

Estudos para avaliar a toxicidade causada pela CYN ainda são escassos. Existem outros novos efeitos de toxicidade emergentes que são atribuíveis ao CYN, como neurotoxicidade ou imunotoxicidade, que raramente foram investigados por métodos *in vitro*. Portanto, ainda é necessário completar o conhecimento sobre o perfil tóxico do CYN e seus compostos relacionados.

2.2.3 Saxitoxina

Saxitoxina (STX) é um alcalóide neurotóxico produzido por alguns gêneros de dinoflagelados marinhos e também por cianobactérias de água doce como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Fischerella*, *Geitlerinema*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis*, *Scytonema*, *Tolypothrix* (Buratti et al., 2017; Salmaso et al., 2017). A estrutura da STX, é composta por um sistema tricíclico de 3,4-peridropurina com dois grupos guanidino (Figura 2).

Esse bioproduto é a toxina causadora do envenenamento paralítico por marisco (PSP – *Paralytic Shellfish Poisoning*) mais pesquisada, onde seus análogos têm níveis variados de toxicidade, sendo a saxitoxina e neosaxitoxina as mais potentes (Ballot et al., 2017). Essas toxinas atuam bloqueando os canais de Na^+ nas células neuronais e os canais de Ca^{++} e K^+ nas células cardíacas, esta ação impede a propagação da transmissão elétrica dentro dos nervos periféricos e músculos esqueléticos ou cardíacos (Su et al., 2004; Buratti et al., 2017).

As saxitoxinas funcionam por ligação reversível aos canais de sódio dependentes de voltagem (Na_v). Os Na_v estão presentes nas células dos tecidos excitáveis, como músculos e nervos, onde atuam no desequilíbrio no gradiente de íons através da membrana celular, produzindo uma voltagem e resultando na transmissão de sinais elétricos na forma de potenciais de ação (Wada, 2006; Christensen & Khan, 2020). A ligação da saxitoxina às alças externas do Na_v causa o bloqueio dos canais, impedindo a despolarização da membrana celular e a transmissão dos potenciais de ação. Como resultado, os tecidos nervoso e muscular tornam-se disfuncionais, levando à paralisia (Llewellyn 2006; Buratti et al., 2017).

Após a exposição a STX, os potenciais de ação nas fibras nervosas e musculares são interrompidos. Os sintomas podem ser gastrointestinais e neurológicos, incluindo; parestesia, náusea, vômito, falta de coordenação, diarreia, fraqueza, ataxia, falta de ar, disartria, disfagia, hipotensão e, dependendo da quantidade de toxina consumida, pode resultar em paralisia

completa da vítima e morte por depressão respiratória (O'Neill et al., 2016). Porém, a consequência da PSP é variável entre os indivíduos, por exemplo, as crianças mostraram-se mais suscetíveis com uma taxa de mortalidade mais elevada (O'Neill et al., 2016).

Além disso, STX pode induzir mudanças nos mecanismos antioxidantes causando aumento no estresse oxidativo e efeitos adversos no neurodesenvolvimento, uma vez que o cérebro tem uma vulnerabilidade aumentada ao estresse oxidativo e menos defesas (Song et al., 2011; Christensen & Khan, 2020; Chen et al., 2020). No entanto, ainda não está claro como as toxinas causadoras de PSPs interferem nas mudanças dos mecanismos antioxidantes (O'Neill et al., 2016). Isso apóia a idéia de que elas podem ter efeitos adversos não apenas no sistema nervoso.

A evidência de outros efeitos neurotóxicos das saxitoxinas, particularmente no contexto da neurodegeneração, é limitada. Melegari et al. (2012) mostraram que STX é capaz de induzir estresse oxidativo em células neurais, por meio de vias de peroxidação lipídica (LPO). Isso é importante, uma vez que os mecanismos de LPO estão bem estabelecidos na patogênese da Doença de Alzheimer (DA) (Butterfield e Lauderback 2002). No entanto, uma ligação direta entre a saxitoxina e a DA através de peroxidação lipídica ainda não foi estabelecida. O potencial efeito genotóxico das saxitoxinas também não foi determinado.

Desta forma, o efeito da toxicidade de STX precisa ser mais investigado a fim de compreender os prováveis efeitos neurodegenerativos, como também efeitos reprodutivos, teratogênicos, genotóxicos e carcinogênicos, tendo em vista que poucas pesquisas foram realizadas nesse âmbito.

2.2.4 Anatoxina

A anatoxina-a (ATX-a) e seus análogos são estruturalmente um dos menores grupos de metabólitos bioativos cianobacterianos. ATX-a é um alcaloide bicícliconeurotóxico (2-acetil-9-azabicyclo (4.2.1) non-2-eno) que possui uma amina secundária bicíclica, com massa molecular e pK_a de 165 u.m.a. e 9,4, respectivamente (Rodríguez et al., 2006). (Figura 2). ATX-a foi a primeira cianotoxina a ser estruturalmente definida por cristalografia de raios-X e confirmada por 1H -NMR (Du et al., 2019). Sabe-se que a anatoxina-a e seus análogos são produzidos pelas seguintes espécies de água doce: *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Cylindrospermum*, *Dolichospermum*, *Kamptonema* (syn. *Oscillatoria*), *Plankocystis*, *Nostocophormidium* coletados de várias áreas geográficas (Huang e Zimba, 2019).

O principal alvo das anatoxinas são os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (Spivak, 1980). Esses receptores são encontrados tanto no SNC quanto nos terminais pós-sinápticos dos neurônios motores (Aráoz et al., 2010^a, b). A anatoxina-a tem uma afinidade para nAChRs 20 vezes maior do que a nicotina (Thomas et al., 2006). A anatoxina-a é um potente agonista nicotínico da acetilcolina, tendo sido comprovado que impede reversivelmente a despolarização neuromuscular de receptores nicotínicos colinérgicos em músculo esquelético estriado de mamíferos (Skulberg et al., 1992), superestimulando os neurônios pós-sinápticos e, eventualmente, parando a transmissão sináptica colinérgica (Aronstam e Witkop 1981). Além disso, a anatoxina-a é um anticolinesterase, ou seja, evita a degradação e absorção de acetilcolina nos neurônios pré-sinápticos, resultando em superestimulação dos neurônios pós-sinápticos (Mahmood e Carmichael 1986). Os sintomas de envenenamento por anatoxina incluem convulsões, tremores musculares, paralisia, parada respiratória e morte subsequente (Mello et al., 2017).

Geralmente, o envenenamento agudo por anatoxina pode levar rapidamente à morte, e quaisquer efeitos crônicos de baixas doses ainda não foram documentados. Seu papel como agonista nicotínico, entretanto, pode fornecer algumas pistas. A neurotransmissão colinérgica é importante no sistema nervoso central, particularmente na função do hipocampo e do núcleo basal, que são centros de memória, percepção e aprendizagem (Mello et al., 2017). A anatoxina-a também mostrou induzir dano oxidativo em timócitos e células de rim de macaco por meio da indução da caspase-3 (Rao et al., 2002). Mais exploração sobre o potencial neurotóxico das anatoxinas e sua capacidade de acessar o cérebro também são necessários para estabelecer se eles poderiam ser implicado em doenças como a Doença de Alzheimer (Colas et al., 2020), que é caracterizada por danos e morte de neurônios colinérgicos (Mello et al., 2017).

Mais recentemente, intoxicações atribuídas especificamente a neurotoxinas foram documentadas (Wood, 2016). Para a anatoxina-a, os efeitos agudos do envenenamento para a saúde incluem convulsões, espasmos musculares, desequilíbrio, paralisia e insuficiência respiratória (Al-Sammak et al., 2014; Rutkowska et al., 2019). Portanto, os efeitos neurológicos agudos foram sugeridos como a principal causa de preocupação ao se considerar a avaliação de risco à saúde humana (Huang e Zimba, 2019). É importante ressaltar que não existem estudos sobre a potencial genotoxicidade da ATX, portanto, não podemos dizer que a toxicidade de longo prazo não tem importância para o risco à saúde humana, especialmente porque também não há dados disponíveis sobre a capacidade do ATX de cruzar a barreira hematoencefálica ou placentária.

2.3 LEGISLAÇÃO PARA CONTROLE DE CIANOBACTÉRIAS E MONITORAMENTO DE CIANOTOXINAS

Relatos de intoxicações em seres humanos causadas pela exposição aos metabólitos secundários de cianobactérias têm sido frequentes (Teixeira et al., 1993; Pouria et al., 1998; Rapala et al., 2005; Li et al., 2011; Bellem et al., 2013; Garrison et al., 2015; Svirčev et al., 2017). As duas intoxicações letais mais comuns atribuídas a cianobactérias na água potável ocorreram no Brasil. Na região de Paulo Afonso (Bahia) após uma floração maciça dos gêneros *Anabaena* e *Microcystis* na barragem Itaparica, resultando em 2000 casos de gastroenterites, com 88 mortes, principalmente crianças (Teixeira et al., 1993). E o outro caso ocorreu na Cidade de Caruaru (Pernambuco) no ano de 1996, quando pacientes de uma clínica foram submetidos a sessões de hemodiálise com água contaminadas com cianotoxinas, resultando em mais de 60 mortes (Pouria et al., 1998).

Cenários de degradação dos recursos hídricos, com recorrentes episódios de florações de cianobactérias potencialmente produtoras de cianotoxinas, levou a indicação do limite máximo de $1\mu\text{g. L}^{-1}$ de microcistina total em água para consumo humano pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Este valor corresponde ao valor máximo permitido das variantes de microcistinas nas formas intracelular e extracelular, ou dissolvida. Este valor é utilizado como padrão em diversos países para o controle e monitoramento desta hepatotoxina em água, como ocorre no Brasil.

O Brasil foi o primeiro país a estabelecer limites para densidade de cianobactérias e concentração de cianotoxinas em norma nacional, como lei. Além de discutir padrões de potabilidade, a portaria foi pioneira ao inserir norma legal a obrigatoriedade do monitoramento de cianobactérias, junto ao ponto de captação em mananciais superficiais. Desde 1977, com a instituição do Decreto n.º 79.367/1977, foi designado ao Ministério da Saúde (MS) a competência do estabelecimento das normas e dos padrões de potabilidade de água a serem seguidos, abrangendo definições, características da qualidade da água potável, amostragem e métodos analíticos (BRASIL, 1997). Em consonância ao decreto, foi publicada a primeira Portaria de Potabilidade da água para consumo humano no Brasil, PRT BSB n.º 56/1977. A revisão da Portaria BSB n.º 56/1977 foi orientada pelos guias publicados pela OMS na década de 80, culminando com a publicação da Portaria GM n.º 36, em 19 de janeiro de 1990. Após esse ano, sucederam-se, entre 1990 a 2017, cinco atualizações da norma correspondentes à: PRT GM n.º 36/1990, PRT n.º 1.469/2000, PRT

GM/MS n.º 518/2004 e PRT GM/MS n.º 2.914/2011, inserida no Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS n.º 5/2017 (BRASIL, 2020). Em maio de 2021, foi instituída nova portaria de potabilidade PRT GM/MS n.º 888/2021, em revisão e substituição do Anexo XX da portaria de 2017.

Entre as principais alterações impostas na portaria de 2021, está a inclusão da análise de clorofila-a de mananciais superficiais, como indicadora da presença e abundância de cianobactérias (Art. 43), que apresenta menor custo e complexidade quando comparada à identificação e contagem de cianobactérias; e a inclusão do monitoramento da cianotoxina cilindrospermopsina na avaliação da toxicidade de florações de cianobactérias (Art. 43). Essas foram as modificações em referência com a portaria anterior apresentada no Anexo XX da PRT Consolidação GM/MS n.º 5/2017, cujo conteúdo é idêntico ao da PRT GM/MS 2.914/2011.

A portaria PRT GM/MS n.º 888/2021 que está em vigor estabelece limites máximos aceitáveis (LMA) para três tipos de cianotoxinas: MC total ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$), CYN ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e STX ($3,0 \mu\text{g L}^{-1}$). De acordo com esta regulamentação, é determinado que ocorra o monitoramento mensal em todos os pontos de captação de água do manancial quando o número de células de cianobactérias não exceder $10.000 \text{ células} \cdot \text{MI}^{-1}$ e, semanalmente quando o número de células de cianobactérias exceder este valor. Quando ocorrer um valor maior que $20.000 \text{ células} \cdot \text{MI}^{-1}$ deve ser realizada a análise semanal das cianotoxinas microcistinas, saxitoxina e cilindrospermopsina. Além disso, deve-se identificar os gêneros de cianobactérias presentes. Logo, trata-se de uma etapa crucial, uma vez que a capacidade de detectar essas toxinas na água de consumo humano representa uma garantia de não expor os consumidores a riscos associados à saúde (Brasil, 2021).

2.4 ENZIMAS

Enzimas são proteínas, consideradas catalisadores biológicos por exercer a função de aumentar a velocidade de uma reação química (Nelson e Cox, 2014). Atuam de forma altamente específica com seus substratos. Possuem elevada massa molecular e atuam sobre substratos específicos (Fogler, 2009). Normalmente são solúveis em soluções aquosas. (Kieling, 2002).

A maioria das características catalíticas de uma enzima deriva de sua estrutura molecular. As enzimas são proteínas formadas pela interação entre cadeias de polipeptídeos. Estes são oriundos pela combinação de aproximadamente 20 aminoácidos, ligados através de

ligações peptídicas (ligação covalente) formadas a partir de um grupo carboxila e um grupo amina. Sua estrutura como um todo é essencial para a atividade catalítica, que é definida pelas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária, sendo proteínas globulares apresentando diversos tamanhos (Whitaker, 1972).

As enzimas contêm um centro ativo denominado de apoenzima. Algumas vezes apresentam um grupo não proteico, um íon metálico ou uma molécula orgânica, denominado de co-fator ou coenzima, respectivamente. Holoenzima é o nome de toda a molécula (apoenzima + cofator ou coenzima), que dependendo do tipo de ligação entre o grupo proteico e a proteína, pode ser separada através de métodos brandos (Nelson e Cox, 2014). Devido ao sítio ativo das enzimas, elas são específicas, ou seja, quebram ou sintetizam um composto em particular (Kieling, 2002). Essas macromoléculas agem como catalisadores biológicos essenciais à existência da vida, uma vez que desempenham funções centrais em processos metabólicos essenciais à manutenção da homeostase, além de atuarem em diversos processos industriais (Rocha-Filho e Vitolo, 2017).

As enzimas atuam de forma que a reação aconteça com uma energia de ativação menor, possibilitando acelerar processos biológicos somente com sua presença e sem o seu consumo. Mas sua atividade depende da integridade de sua estrutura proteica como um todo. Podendo se dizer que a atividade é geralmente destruída, quando uma enzima se encontra desnaturada ou dissociada em subunidades ou partes (Costa, 2016).

A eficiência da enzima como catalisador pode ser explicada através de sua atividade, sendo determinado a partir da velocidade de reação, ou seja, a atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que catalisa para a formação de produto por unidade de tempo. (Reece et al., 2015).

As enzimas são classificadas em seis famílias de acordo com o tipo de reação que é catalisada, segundo critérios do Comitê da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (sigla em inglês IUBMB), que são elas: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (Nelson e Cox, 2014). As hidrolases são uma das seis classes enzimáticas, responsáveis por catalisar a clivagem da ligação química seguida da adição da molécula de água (Reece et al., 2015).

Nessa classe encontram-se as colinesterases que são as enzimas presentes no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados, atuando na regulação da transmissão dos impulsos nervosos entre os neurônios, dentre elas, destacando-se a acetilcolinesterase (AChE). E as proteases que correspondem às enzimas intervenientes nos processos digestivos, entre elas merece destaque a pepsina, tripsina e quimotripsina (Voet et al., 2008).

2.4.1 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase está presente no sistema nervoso central e periférico, sendo responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Desta forma, a ação da AchE é crucial na propagação do impulso nervoso. Uma vez liberada nas sinapses, a acetilcolina é degradada pela enzima acetilcolinesterase em acetato e colina, sendo esta última recaptada pelo neurônio. O neurotransmissor é sintetizado e armazenado em vesículas no neurônio pré-sináptico, sendo que a liberação depende de alterações iônicas e elétricas da membrana plasmática. A despolarização da membrana plasmática do neurônio pré sináptico promove o influxo de Ca^{2+} seguida de fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática. Essa fusão promove a liberação de acetilcolina na fenda sináptica e difusão até o receptor localizado na membrana plasmática do neurônio pós-sináptico. Antes que ocorra nova liberação de acetilcolina, a molécula previamente liberada deve ser hidrolisada pela AchE (Mota et al., 2012).

Com a inibição da acetilcolinesterase, o neurotransmissor acetilcolina (ACh) não é hidrolisado nas junções sinápticas e nas junções neuromusculares, causando acúmulo de uma quantidade anormal de ACh nestes locais, ocasionando a síndrome colinérgica, a qual envolve uma superestimulação das estruturas inervadas pelas fibras colinérgicas (coração, glândulas, músculos lisos), o que poderá causar alterações comportamentais, como hiperatividade, além de miose, salivação, broncorreia, broncoconstrição, fasciculações, fraqueza muscular e convulsões, culminando à morte por asfixia (Milesen et al., 2008). Em contrapartida, quando o estímulo da AchE resulta na deficiência na secreção da ACh, como consequência funções importantes como alerta, controle motor, aprendizado e a memória são prejudicadas (Vinutha et al., 2007).

No entanto, a diversidade de respostas biológicas para a inibição da AchE por diferentes substâncias pode ser explicada principalmente por diferenças no mecanismo inibitório que estão associadas com os vários sítios de ligação no sítio ativo desta enzima (a tríade catalítica e um sítio de ligação periférico) (Almeida, 2014).

2.4.2 Proteases (EC 3.4)

Proteases, também conhecidas como proteinases, peptidases ou enzimas proteolíticas, atuam clivando ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, através de reações de hidrólise (Santos et al., 2013; Santos, 2016)

Estas biomoléculas atuam não somente na hidrólise de dieta proteica, mas também são indispensáveis na organização e manutenção das funções fisiológicas dos mais diversos organismos vivos, sendo essenciais no desenvolvimento das funções metabólicas e regulatórias. Atuam, por exemplo, nas rotas metabólicas de proteínas, na coagulação sanguínea, no crescimento e na migração de células, na formação de tecidos, em processos inflamatórios, e auxiliam no transporte de proteínas através das membranas (Warner, 2017). Além disso, as proteases são indispensáveis em processos biológicos como digestão e apoptose, além de serem responsáveis pela síntese de biomoléculas e pela replicação do DNA (Gurumallesh et al., 2019).

2.4.2.1 Tripsina (EC, 3.4.21.4)

Dentre as proteases alcalinas, a tripsina é uma serinoendopeptidase de 22 a 28 kDa, característica por clivar a ligação peptídica dos resíduos de aminoácidos arginina (Arg) ou lisina (Lys) na região do grupo carbonila. A estrutura terciária da tripsina é constituída unicamente por uma cadeia polipeptídica, possuidora de dois domínios de estruturas similares unidos de forma assimétrica, possuindo uma interface que forma a tríade catalítica (His, Asp e Ser) (Reis, 2009).

A tripsina é uma das mais importantes enzimas de peixes e invertebrados aquáticos (Oliveira et al., 2014), sendo responsável pela hidrólise de proteínas oriundas da dieta (Barkia et al., 2009; Oliveira et al., 2014). Os zimogênios secretados pelo pâncreas são ativados por clivagem proteolítica no intestino pela enteroquinase, convertendo o zimogênio tripsinogênico pancreático em tripsina (Kanno et al., 2009), pela remoção de um hexapeptídeo na porção N-terminal. A tripsina, subsequentemente, converte outras moléculas de tripsinogênio em tripsina. De tal modo, a enteroquinase desencadeia uma cascata de atividade proteolítica, pois a tripsina é o ativador comum de todos os zimogênios pancreáticos, como por exemplo o quimotripsinogênio (Oliveira et al., 2014).

Esta enzima é indispensável no processo de digestão alimentar. Os alimentos previamente digeridos pela pepsina, ao chegarem ao intestino, impulsionam a liberação do

zimogênio da tripsina, o tripsinogênio, que é clivado através da ação de enteropeptidases, liberando-o na sua forma ativa, a tripsina, que por sua vez irá dar continuidade a hidrólise das proteínas (Berg, Stryer e Tymozko, 2004).

Vale salientar sobre a necessidade da tripsina se manter inativada, sendo disponibilizada apenas quando necessário para a atuação nas funções fisiológicas, pois caso contrário ocorre à autólise enzimática e conseqüentemente impulsiona o desenvolvimento de patologias como a pancreatite (Hirota et al., 2006; Hasan et al., 2019).

2.4.2.2 Quimotripsina (EC, 3.4.21.1)

Semelhante à tripsina, a quimotripsina é uma serinoendopeptidase alcalina, com massa molecular variando entre 22 a 30 kDa. A mesma é produzida no pâncreas e secretada como quimotripsinogênio no lúmen do intestino, tendo sua atividade complementar à da tripsina, e contribuindo na digestão de proteínas (Hasan et al., 2019). Em comparação a tripsina, os conhecimentos sobre a quimotripsina para larvas de peixes são escassos (Zhou et al., 2011).

O quimotripsinogênio é ativado pela tripsina no duodeno (Oliveira, 2014). Ao sofrer clivagem com a tripsina, o quimotripsinogênio é fragmentado em duas partes, que ainda ficam atreladas por uma ligação dissulfeto (S-S). Após a quebra do quimotripsinogênio ocorre a perda de dois peptídeos pequenos, numa etapa chamada de trans-proteólise, em seguida obtém-se a quimotripsina. A mesma é específica para a hidrólise de ligações peptídicas em que grupos carboxila são fornecidos por um dos três aminoácidos aromáticos, que são a fenilalanina, a tirosina e o triptofano (Yang et al., 2009).

Essa enzima apresenta três isoformas que variam na solubilidade, mobilidade eletroforética, ponto isoelétrico e especificidade de clivagem (Yang et al., 2009; Zhou et al., 2011). A quimotripsina apresenta uma tríade catalítica composta por uma rede de pontes de hidrogênio entre a Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ e a Asp¹⁰² (Zhou et al., 2011). Tanto ela quanto a tripsina contêm a mesma “tríade” de resíduos cataliticamente ativos (Oliveira, 2014).

2.5 BIOMARCADORES DE TOXICIDADE

Os biomarcadores são medidas quantitativas e qualitativas que indicam mudanças em um sistema biológico após a exposição a uma determinada substância (exemplo: poluentes) ou agente físico (exemplo: radiação). Esses biomarcadores podem ser alterações celulares, bioquímicas, moleculares, histológicas ou fisiológicas que podem ser provenientes de fluidos

corporais, tecidos ou órgãos. Os biomarcadores são muito utilizados na área da ecotoxicologia,

pois são excelentes indicativos do grau de contaminação dos organismos (Lam& Gray, 2003; Walker, 1998).

Um biomarcador de efeito é um parâmetro biológico, medido no organismo, que reflete a interação da substância química com os receptores biológicos (Amorim, 2003). Estes biomarcadores retratam diferentes tipos de alterações mensuráveis no organismo, as quais, de acordo com a sua magnitude, podem ser reconhecidas e associadas a uma disfunção do organismo (Silva, 2016).

A detecção de biomarcadores bioquímicos é uma estratégia baseada na identificação das alterações bioquímicas precoces e reversíveis que são indicadores sensíveis e específicos de uma resposta do organismo à exposição (Amorim, 2003). Entre os biomarcadores mais utilizados para organismos aquáticos, tem a utilização de enzimas envolvidas nos processos de desintoxicação de substâncias e seus metabólitos, enzimas antioxidantes, entre outras enzimas utilizadas como indicadores específicos de efeitos tóxicos em órgãos (Ganguilhet, 2019), como é o caso da enzima acetilcolinesterase (AChE). Neste sentido, a quantificação da atividade da enzima acetilcolinesterase funciona como um biomarcador de neurotoxicidade (Amorim, 2003). Posto isso, a quantificação de AChE, nos tecidos muscular e nervoso de peixes tem sido bastante utilizada para avaliar os efeitos da contaminação, pois essa enzima encontra-se com ampla disponibilidade e em grande quantidade nesses tecidos (Coimbra et al., 2013).

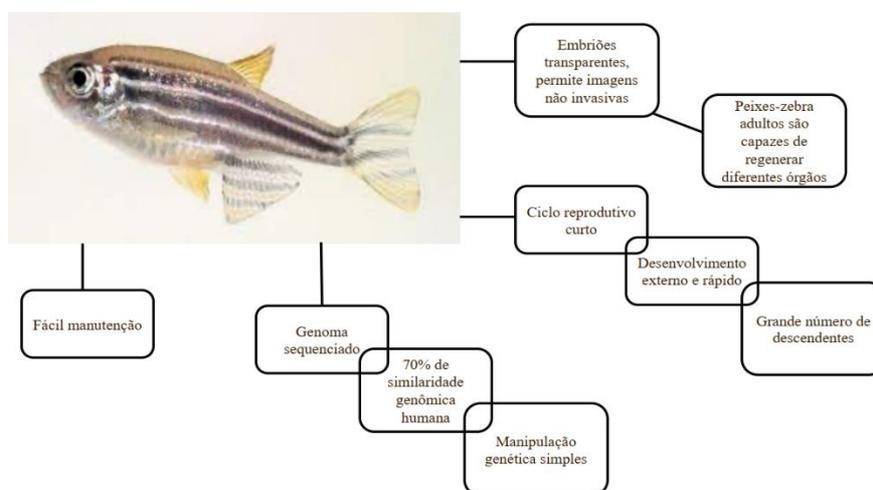
Visto que a interação primária dos poluentes com os organismos acontece no âmbito de biomoléculas, é esperado que ocorram nos organismos, alterações de expressão gênica como resultado da exposição aos poluentes. Portanto, estudos com abordagens moleculares permitem obter maiores informações sobre os efeitos dos poluentes nos organismos, aprimorando o conhecimento dos modos de ação dos contaminantes, e resultando na identificação de biomarcadores induzidos pelo estresse (Fent&Sumpter, 2011). Nesse sentido, estudos ecotoxicológicos de compostos tóxicos em peixes começaram a ser realizados. Velki et al. (2017) avaliaram o efeito de agrotóxicos diazinon e diuron em peixes-zebra, e encontraram alterações na expressão gênica e nas atividades enzimáticas. Outro estudo expôs embriões de peixe-zebra a toxina Nodularina (NOD), os autores identificaram apoptose de células embrionárias, danos ao DNA, danos oxidativos significativos e alteração na expressão de genes do desenvolvimento vascular e genes relacionados a apoptose (Chen et al., 2020).

2.6 ORGANISMO MODELO: *Danio rerio*

Entre os fatores que estimulam a ampla utilização de peixes como bioindicadores estão os mecanismos de resposta à contaminação por substâncias tóxicas, considerados muito similares aos dos grandes vertebrados (Meyers, 2018). Os peixes, assim como os mamíferos, possuem mecanismos de bioacumulação, no qual o agente químico é acumulado pela biota por meio da água, e também a biomagnificação, na qual o agente químico é absorvido por intermédio da cadeia alimentar (Weisbrod et al., 2007). O uso de peixes como bioindicadores consiste, portanto, em uma importante ferramenta para o monitoramento de ambientes impactados por agentes químicos. Isto porque, devido a adaptações anatômicas, comportamentais e fisiológicas do grupo, estes animais podem ocupar vários ambientes aquáticos, sob condições ambientais diversas.

Danio rerio (também conhecido por peixe-zebra ou paulistinha) descrito pela primeira vez por Francis Hamilton em 1822, é um peixe tropical teleósteo de água doce da família dos ciprinídeos proveniente da região da Ásia central. Apresenta como característica marcante transparência dos embriões durante o desenvolvimento, levando a comunidade científica a adotá-lo como animal modelo (Irons et al., 2010). O desenvolvimento embrionário ocorre de forma rápida, as larvas eclodem entre 48 a 72 h e no quinto dia após fertilização (dpf), a maioria dos tecidos já estão desenvolvidos (Kimmel et al., 1995). Em comparação com as demais espécies de peixe, alcançam a maturidade sexual em três meses de vida e podem produzir 200 a 300 ovos por desova (Spence et al., 2008).

Figura 3– Vantagens do uso do peixe-zebra como organismo modelo.



Fonte: O autor (2022).

O genoma do peixe-zebra foi totalmente sequenciado (26.000 genes codificados), e a partir disso, verificou-se que esses organismos apresentam 70% de semelhança genética com seres humanos, bem como similaridades fisiológicas e anatômicas (sistema cardiovascular, nervoso e digestivo), incluindo células endoteliais, presença de barreira hematoencefálica, respostas imunogênicas, e vias de sinalização (Bar-Ilan et al., 2009; Beliaeva et al., 2010; Beffagna, 2019). Como também, o peixe-zebra e mamíferos mostram respostas fisiológicas semelhantes a compostos tóxicos, como a indução de enzimas metabólicas e estresse oxidativo (Cavalcante, 2017). Esses fatores justificam sua grande utilização em pesquisas que visam prever efeitos de toxicidade em humanos (Figura 3).

O peixe *D. rerio* se destaca por ser bom indicador de contaminação de poluentes, uma vez que, apresenta adaptação e sensibilidade as condições ambientais, não precisa de grande espaço para cultivo e criação, além de ser bem documentado e normatizado (Meyers, 2018). Essa espécie é um modelo experimental bem consolidado em diversas áreas, como na compreensão de doenças genéticas, biologia celular e do desenvolvimento, toxicologia, estudos metabólicos, entre outras (Bradford et al., 2017). O peixe-zebra é um organismo modelo ideal para estudos em toxicologia, pois as alterações na morfologia, expressão de genes, parâmetros bioquímicos e comportamento são facilmente detectáveis em todas as suas fases de desenvolvimento (Bradford et al., 2017).

Considerando a similaridade genética entre humanos e peixe-zebra, estudos de perfis de expressão gênica em *Danio rerio* podem permitir: (a) elucidar mecanismos de toxicidade; (b) detectar os efeitos de substâncias tóxicas em vias bioquímicas inesperadas; (c) comparar

perfis de expressão gênica para determinar diferenças/similaridades às respostas dos seres humanos a essas mesmas substâncias (Rogers et al, 2011; van der Ver et al., 2006)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de artigo.

3.1 ARTIGO 1

Métodos biológicos usados para detecção de cianotoxinas (Microcistina-LR, Cilindrospermopsina, Saxitoxina e Anatoxina-a) em amostras ambientais: Uma Revisão.

Flávia Morgana Monteiro¹, José Etham de Lucena Barbosa², Ranilson de Sousa Bezerra¹

¹*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brasil.*

²*Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, Campina Grande, PB, Brasil.*

Resumo: A ocorrência de cianobactérias tem aumentado em todo o mundo devido a ações antrópicas, mudanças climáticas e eutrofização. As cianobactérias têm a capacidade de formar densas florações que levam ao decréscimo da qualidade da água, pela acumulação de escumas superficiais e por originarem eventos tóxicos, visto que muitas espécies podem produzir substâncias nocivas biologicamente ativas (cianotoxinas). As cianotoxinas, como microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermopsina (CYN), saxitoxina (STX) e anatoxina (ATX), têm uma vasta gama de mecanismos de toxicidade, como efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos, citotóxicos e genotóxicos. Assim, a dispersão destas cianotoxinas em ambientes de água doce, atuam como uma séria ameaça à saúde humana e ambiental. Nesse sentido, foram desenvolvidos métodos de detecção de cianotoxinas, no intuito de garantir a qualidade da água e dos alimentos e preservar a saúde humana. Com isso, este artigo traz uma revisão dos métodos bioanalíticos [bioensaios com organismos modelos, ensaio de inibição da proteína fosfatase (PPIA) ou o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)] utilizados para detecção de cianotoxinas, no intuito de destacar as vantagens e desvantagens relativas de cada método e sua eficiência no fornecimento de dados para fazer uma avaliação de risco apropriada. Dentre essas técnicas, o ensaio imunoenzimático (ELISA) é o mais comumente utilizado, no entanto, esse método não é tão eficaz na detecção de toxinas como a saxitoxina e cilindrospermopsina. O método ELISA pode subestimar a concentração de saxitoxina presente quando mais de uma variante se faz presente, e em relação a cilindrospermopsina, durante o uso dessa técnica, pode ocorrer uma incerteza na detecção da toxina CYN quando desoxi-CYN ou 7-epi-CYN estiver presente. Mesmo sendo o método ELISA o mais utilizado para detecção de toxinas presentes na água, o mesmo apresenta algumas peculiaridades em relação a algumas toxinas, desta forma é de extrema importância novas abordagens analíticas capazes de quantificar toxinas multiclases em matrizes ambientais, e assim direcionar para um tratamento mais eficaz da água de reservatórios destinados ao abastecimento público.

Palavras-chave: Cianobactérias. Cianotoxinas. Ecotoxicologia. ELISA. Normas de Qualidade da Água.

Introdução

A ocorrência de cianobactérias tem aumentado em todo o mundo devido a ações antrópicas, mudanças climáticas e eutrofização (Bormans et al., 2019; Jimenez et al., 2020). Essas bactérias são predominantemente aquáticas, capazes de formar florações que criam um biofilme superficial. As consequências dessas florações podem afetar tanto o meio ambiente quanto o homem, uma vez que interferem no equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, alteram a cor, odor e gosto da água (Amorim e Moura, 2020; Ai et al., 2020; Mendes et al., 2021), afetam a potabilidade da água, e podem expor diversos mamíferos, aves, peixes e, inclusive, o homem as cianotoxinas liberadas pelas cianobactérias: hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas – cuja toxicidade pode levar a morte (Abdallah et al., 2021; Buratti et al., 2017; Howard et al., 2021).

A principal via de intoxicação dessas substâncias se dá pela ingestão de água ou alimentos contaminados com cianotoxinas (Mendes et al., 2016; Howard et al., 2021). As cianotoxinas e, em particular, as microcistinas têm sido associadas à morte de animais em todo o mundo (Mez et al., 1997; Frazier et al., 1998; Puschner et al., 1998) e a microcistina foi também já foi identificada como a causa de fatalidades humanas, como por exemplo em uma clínica de hemodiálise no Brasil, quando a água usada para diálise estava contaminada e vários pacientes foram afetados (Azevedo et al., 2002).

A fim de minimizar o risco de exposição às cianotoxinas, e confirmando a necessidade de se estabelecer um monitoramento para garantir a segurança, a OMS (Organização Mundial da Saúde) desenvolveu um quadro de recomendações para o manejo de toxinas de algas em águas potáveis e recreativas (Chorus e Bartram, 1999). Esta abordagem tem sido adotada por muitos países ao redor do mundo (Chorus, 2012). Deste modo, limites máximos admissíveis (LMA) de cianotoxinas nas águas de abastecimento público foram propostos, a fim de evitar os efeitos danosos à saúde pública. No Brasil, os órgãos responsáveis pelo monitoramento e qualidade da água (Ministério da Saúde e CONAMA) adotaram como valor máximo permitido para a microcistina-LR o mesmo recomendado pelo OMS que corresponde a 1,0 µg/L em água para abastecimento público (esse valor representa o somatório das concentrações de todas as variantes dessa toxina), e para as toxinas saxitoxina e cilindrospermopsina, os órgãos nacionais adotaram como valor máximo 3,0 µg/L e 1,0 µg/L, respectivamente. Também existe recomendação para a análise da presença de anatoxina-a (s) quando for detectada a presença de gêneros de cianobactérias potencialmente produtores no monitoramento de cianobactérias, porém sem estabelecimento de limite máximo aceitável (LMA).

Nesse sentido, alguns métodos de detecção de cianotoxinas foram desenvolvidos, baseados em bioensaios como a inibição da proteína fosfatase (PPIA) ou o ensaio de imun absorção enzimática (ELISA), no intuito de garantir a qualidade da água e dos alimentos e preservar a saúde humana (Li et al., 2011; Wood et al., 2007; Xu et al., 2008). Com isso, este artigo traz uma revisão dos métodos bioanalíticos utilizados para detecção de cianotoxinas, no intuito de destacar as vantagens e desvantagens relativas de cada método e sua eficiência no fornecimento de dados para fazer uma avaliação de risco apropriada.

Cianobactérias e Cianotoxinas

As cianobactérias são um grupo diversificado de organismos que diferem amplamente em suas características, muitas das quais são indesejáveis do ponto de vista da qualidade da água (Brasil et al., 2016; Havens et al., 2017).

Nas últimas décadas, muitos dos ambientes marinhos e de água doce do mundo têm experimentado um aumento constante na proliferação de cianobactérias devido à rápida multiplicação de algas como resultado da eutrofização (Pouria et al., 1998; Preusselet al., 2006; Liao, Yu e Gui, 2017; Mantzouki et al. Al., 2016; Ndlela et al., 2016). Essas cianobactérias podem produzir uma ampla gama de toxinas potentes que podem ter implicações na saúde da vida aquática, pecuária e animais selvagens (Baig et al., 2017; Brient et al., 2017) e até mesmo humanos (Pouria et al., 1998; Funari et al., 2017; Qiao et al., 2019).

De acordo com suas ações toxicológicas, as cianotoxinas são classificadas como: (i) hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas): atuam na inibição das proteínas fosfato 1^a e 2^a, que causam hiperfosforilação dos filamentos do citoesqueleto, deformação dos hepatócitos, promoção do câncer e danos ao fígado; (ii) neurotoxinas (anatoxina, anatoxina (s), saxitoxinas e análogos e β -metilamino-l-alanina): são alcalóides de baixo peso molecular que bloqueiam os canais de sódio inibindo a condução nervosa; e (iii) citotoxinas (cilindrospermopsina): estão envolvidas na inibição da glutatona, síntese protéica e são responsáveis por danos necróticos e genéticos (Díez-Quijada et al., 2019; Abdallah et al., 2021). Embora as citadas sejam as mais presentes nos ambientes aquáticos, dermatoxinas (lingbyatoxina, aplisiatoxina e debromoaplisiatoxina) e toxinas irritantes (endotoxinas lipopolissacarídicas) também podem estar presentes e são responsáveis pela irritação da pele e inflamação do trato gastrointestinal, respectivamente. Dentre essas toxinas citadas, as microcistinas, cilindrospermopsina, saxitoxina e anatoxina (Figura 1) geralmente representam as toxinas cianobacterianas mais discutidas.

Microcistinas

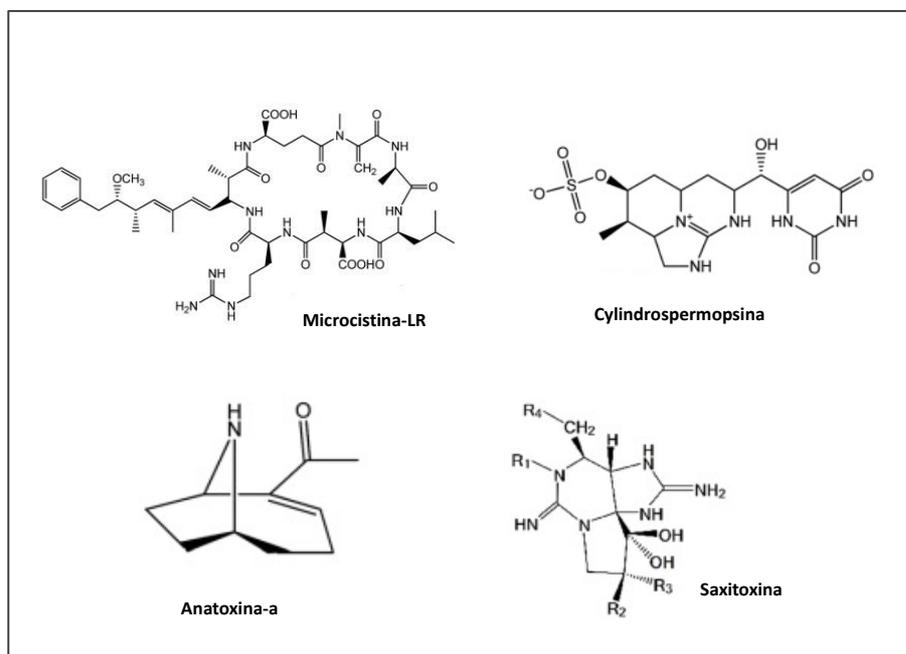
As microcistinas (MCs) estão entre as toxinas cianobacterianas mais difundidas detectadas em águas doces. São heptapeptídeos monocíclicos formados por cinco aminoácidos constantes e dois variáveis. Os resíduos de L-aminoácidos nas posições 2 (X) e 4 (Y) resultam em variações estruturais da molécula. Além de variar nos aminoácidos das duas posições variáveis, as MCs diferem no grau de metilação, hidroxilação, epimerização e, conseqüentemente, na toxicidade (Buratti et al., 2017; Catherine et al., 2017).

Até o momento, mais de 200 variantes de microcistinas foram identificadas, cada uma com polaridade, lipofilia e toxicidade diferentes (Janssen, 2019). Entre eles, a microcistina-LR, com leucina (L) e arginina VER como aminoácidos variáveis, é o congêneres mais difundido e mais tóxico detectado em águas doces (Figura 1) (Huang e Zimba, 2019; Salmaso et al., 2017). Essa toxina foi isolada pela primeira vez da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Carmichael et al. 1990), porém, outros gêneros de cianobactérias também são capazes de sintetizá-los: *Planktothrix*, *Dolychospermum*, *Microcystis*, *Radiocystis*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Aphanizomenon*, *Geitlerinema*, *Leptolyngbya*, *Oscillatoria* e *Aphanothece* (Tabela 2) (Bittencourt-Oliveira et al., 2014; Salmaso et al., 2017).

A estrutura química hidrofílica da maioria das variantes das microcistinas impede o transporte passivo, portanto, a absorção a nível gastrointestinal (gi), bem como a captação celular é facilitada pela presença na membrana externa do sistema de transporte de ânions orgânicos (OATP), particularmente pelas isoformas OATP1B1 e 1B3, conforme demonstrado por alguns estudos *in vitro* (Fisher et al. 2005, 2010).

Em geral, a absorção de MCs ocorre por meio de OATPsexpressos em vários tipos de células (Chen e Xie, 2016), como enterócitos, hepatócitos e células epiteliais renais, e órgãos como coração, pulmão, baço, pâncreas, cérebro e barreira hematoencefálica (BHE) (Testai et al., 2016). Isso significa que quantidades significativas de MCs podem atingir o cérebro através da BBB e induzir patologia cerebral, dependendo do tipo e expressão de OATPs na BHE, na barreira sangue-líquido cefalorraquidiano e na membrana da célula neuronal (Westholm et al., 2009). Portanto, não é estranho que efeitos tóxicos induzidos por microcistinas tenham sido relatados em outros órgãos além do fígado.

Figura 1–Estruturas químicas das principais cianotoxinas relevantes em amostras ambientais (Microcistina-LR (MC-LR), Cilindrospermopsina (CYN), Saxitoxina (STX) e Anatoxina (ATX)).



Fonte: Du et al. (2019)

O mecanismo de ação mais conhecido das microcistinas é a inibição da proteína serina/treonina fosfatase (proteínas fosfatase 1^a e 2^a), que leva à hiperfosforilação de proteínas e desencadeia uma cascata de eventos levando a uma série de respostas celulares, como: colapso do citoesqueleto e ruptura dos filamentos de actina, estresse oxidativo, indução de apoptose, reparo de DNA reduzido e proliferação celular levando a promoção de tumor carcinogênico (Buratti et al., 2017; Catherine et al., 2017; Qian et al., 2018).

Cilindrospermopsinas

Entre as cianotoxinas, a cilindrospermopsina (CYN) vem se tornando uma das toxinas de maior preocupação devido ao seu potencial de toxicidade e disseminação em vários ambientes (de La Cruz et al., 2013). Sendo produzida por um grande número de cianobactérias dos gêneros *Cilindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis*, *Lyngbya*, *Dolichospermum*, *Microseira*, *Oscillatoria* e *Umezakia* (Tabela 2) (McGregor e Sendall, 2015; Huang e Zimba, 2019).

A toxina cianobacterianacilindrospermopsina (CYN) é um alcalóide tricíclico que consiste em uma porção tricíclica de guanidina combinada com hidroximetiluracila

(Hinojosa et al., 2019) (Figura 1). A subunidade uracila e o grupo funcional hidróxi na posição C7 do CYN são responsáveis pela toxicidade (Banker et al., 2001). Atualmente, cinco análogos de CYN são conhecidos, a saber, CYN, 7-epi-CYN, 7-desoxi-CYN e os dois congêneres recentemente caracterizados, 7-desóxidesulfo-CYN e 7-desóxidesulfo-12-acetil-CYN (Scarlett et al., 2020). Destes, o mais investigado é o CYN, devido a sua maior ocorrência em sistemas aquáticos.

Sua estrutura molecular confere características hidrófilicas, por essa razão, sua absorção intestinal e a captação pelos hepatócitos precisam ser mediadas por um sistema de transporte ativo, como o sistema de transporte de ácido biliar, por exemplo, colato e taurocolato (Chong et al. 2002; Buratti et al., 2017). Apesar de ser o fígado seu principal alvo, em outros órgãos como olhos, baço, rins, pulmões, timo, coração, estômago já foram relatados efeitos tóxicos (Guzmán-Guillén et al., 2017; Huang e Zimba, 2019).

Essa toxina está diretamente envolvida na inibição da síntese de proteínas e de GSH (Frosio et al., 2003). Além disso, devido à sua capacidade de aumentar a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), essa toxina pode levar a danos no DNA, causando morte celular por apoptose (Puerto et al., 2011; Guzmán-Guillén et al., 2013; Silva et al., 2017). Do mesmo modo, alguns estudos têm demonstrado a importância de sua ativação metabólica prévia pelo complexo enzimático citocromo P-450, por ser capaz de exercer potencial genotóxico (Žegura et al., 2011; Puerto et al., 2018; Miglione, Napoletano & Cinti, 2021).

No que se diz respeito aos efeitos citotóxicos, estes estão associados ao estresse oxidativo devido ao aumento dependente da concentração no conteúdo de H₂O₂, diminuição da atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), nível elevado de glutatona peroxidase e apoptose com potencial capacidade reduzida de lutar contra microorganismos patogênicos (Poniedziałek et al., 2014, 2015). Além desses, efeitos no sistema nervoso também podem ocorrer, embora não seja provável que CYN cruze a barreira hematoencefálica (BBB) por difusão passiva devido às suas propriedades hidrófilicas (Banks, 2009), seu baixo peso molecular pode contribuir para sua entrada no sistema nervoso. Existem alguns estudos que apontam sua neurotoxicidade em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, embora os mecanismos pelos quais o CYN possa exercer efeitos neurotóxicos no cérebro permaneçam desconhecidos (Hinojosa et al., 2019). Somados a esses, estudos *in vitro* do mesmo grupo relataram o possível efeito imunotóxico do CYN (Poniedziałek et al., 2012).

Tabela 1- Mecanismos de exposição às cianotoxinas.

Tipo de exposição	Meio de exposição	Atividades de risco
Oral	Água	Beber água diariamente não tratada ou tratada de maneira inadequada; Beber água contaminada com cianotoxinas durante atividades recreativas aquáticas.
	Food	Consumo de peixes, moluscos, crustáceos; vegetais irrigados por spray com água contendo cianobactérias / cianotoxinas.
Dérmico	Água	Contato da pele e mucosas com florações, escórias durante recreação e práticas de trabalho; Tomar banho com água não tratada ou tratada de maneira inadequada.
Inalação	Água, aerossóis	Spray contendo cianobactérias / extratos de cianobactérias / cianotoxinas durante recreação, banho, trabalho.
	Pó	Inalação de partículas de poeira da biomassa cianobacteriana seca ao ar e liofilizada, durante as práticas de trabalho.
Hemodiálise	Água	Contato com água de hemodiálise tratada inadequadamente.

Fonte: Arquivo pessoal do pesquisador (2022).

Saxitoxinas

Mais de 30 análogos de saxitoxinas foram descritos, e agrupados em quatro subgrupos: carbamato, N-sulfo-carbamoil, descarbamoil e saxitoxinas hidroxiladas (Salmaso et al., 2017), com níveis variados de toxicidade, sendo a saxitoxina e neosaxitoxina as mais potentes (Ballot et al., 2017).

Saxitoxina (STX) é um alcalóideneurotóxico (Figura 1) produzido por alguns gêneros de dinoflagelados marinhos e também por cianobactérias de água doce como *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Fischerella*, *Geitlerinema*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis*, *Scytonema* e *Tolypothrix* (Tabela 2) (Buratti et al., 2017; Salmaso et al., 2017). O modo de ação desse bioproduto consiste na interferência dos canais de sódio dependentes de voltagem nos neurônios e nos canais de cálcio (Ca⁺⁺) e potássio (K⁺) nas células cardíacas, causando mau funcionamento celular e paralisia (Su et al., 2004; Buratti et al., 2017).

A ingestão de saxitoxina geralmente se dá através do consumo de moluscos bivalves e outros vetores como caranguejos, lagostas e caracóis carnívoros contaminados por proliferação de algas tóxicas, sendo responsável pelo envenenamento paralítico de moluscos (PSP), com risco de vida. Após a exposição a STX, os potenciais de ação nas fibras nervosas e musculares são interrompidos. Os sintomas podem ser gastrointestinais e neurológicos, incluindo; parestesia, náusea, vômito, falta de coordenação, diarreia, fraqueza, ataxia, falta de

ar, disartria, disfagia, hipotensão e, dependendo da quantidade de toxina consumida, pode resultar em paralisia completa da vítima e morte por depressão respiratória (O'Neill et al., 2016). Porém, a consequência da PSP é variável entre os indivíduos, por exemplo, as crianças mostraram-se mais suscetíveis com uma taxa de mortalidade mais elevada (O'Neill et al., 2016).

Além disso, STX pode induzir mudanças nos mecanismos antioxidantes causando aumento no estresse oxidativo e efeitos adversos no neurodesenvolvimento, uma vez que o cérebro tem uma vulnerabilidade aumentada ao estresse oxidativo e menos defesas (Song et al., 2011; Christensen & Khan, 2020; Chen et al., 2020).

Anatoxina

A anatoxina-a (ATX-a) e seus análogos, são estruturalmente um dos menores grupos de metabólitos bioativos cianobacterianos, produzidos pelas espécies *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Cylindrospermum*, *Dolichospermum*, *Oscillatoria*, *Plankocystis*, *Nostoc* e *Phormidium* (Tabela 2) (Huang e Zimba, 2019).

A anatoxina-a (ATX-A) é um alcalóide bicíclico neurotóxico amino secundária (Figura 1), de ocorrência mais comum, com peso molecular de 165,232 g/mol. Apresenta-se como um agonista colinérgico que se liga à receptores de acetilcolina no sistema nervoso central e periférico e às junções neuromusculares, causando estimulação contínua com bloqueio da transmissão elétrica. (Quiñones-Reyes et al., 2019; Cunha et al., 2018). Além disso, a anatoxina-a também mostrou induzir dano oxidativo em timócitos e células de rim de macaco por meio da indução da caspase-3 (Rao et al., 2002). Mais exploração sobre o potencial neurotóxico das anatoxinas e sua capacidade de acessar o cérebro são necessários para estabelecer se eles poderiam ser implicados em doenças como a Doença de Alzheimer (DA), tendo em vista que, é uma doença neurodegenerativa caracterizada por danos e mortes de neurônios colinérgicos presentes no sistema nervoso central, mais especificamente no hipocampo e núcleo basal, que são os centros de memória, percepção e aprendizagem (Mello et al., 2017; Colas et al., 2020).

Exposição à anatoxina-a ocorre comumente pela ingestão ou ingestão de alimentos e água contaminados, o que induz sinais clínicos como salivação, lacrimejamento, incontinência, defecação, convulsões e arritmia cardíaca. Em altas doses, podem resultar em

paralisia da musculatura respiratória e morte. Esses efeitos tóxicos são observados em humanos, animais, pássaros e peixes. (Al-Sammak et al., 2014; Rutkowska et al., 2019).

Tabela 2–Cianotoxinas: resumo das estruturas químicas, principais gêneros produtores e modos de ação dos principais grupos de cianotoxinas.

Cianotoxinas	Estrutura química	Cianobactérias produtoras	Modo de ação
Microcistinas	Heptapeptídeos cíclicos	Microcystis, Dolichospermum, Nostoc, Planktothrix, Phormidium, Oscillatoria, Radiocystis, Gloeotrichia, Anabaenopsis, Rivularia, Tolypothrix, Hapalosiphon, Plectonema	Hepatotóxico, promotor de tumor, inibição de proteína fosfatase eucariótica PP1, PP2A e fosfoproteína fosfatase PPP4, PPP5
Cylindrospermopsinas	Alcalóides de guanidina tricíclicos	Cylindrospermopsis, Umezakia, Dolichospermum, Oscillatoria, Raphidiopsis, Aphanizomenon	Toxicidade de múltiplos órgãos, neurotóxico, genotóxico, inibidor da síntese de proteínas
Saxitoxinas	Alcalóides	Aphanizomenon, Dolichospermum, Lyngbya, Cylindrospermopsis, Planktothrix	Neurotóxico, bloqueia canais de sódio dependentes de voltagem
Anatoxina-a	Alcalóides bicíclicos	Dolichospermum, Phormidium, Aphanizomenon	Neurotóxico, liga-se competitivamente aos receptores de acetilcolina

Fonte: Arquivo pessoal do pesquisador (2022).

Legislação e diretrizes da qualidade da água

Florações de cianobactérias resultam em vários problemas de qualidade da água e graves danos econômicos ao prejudicar o abastecimento de água, atividades recreativas e pesca (Merel et al., 2013; Brooks et al., 2016) . Além disso, a exposição elevada a cianotoxinas através de alimentos e água pode ser fatal para humanos e animais selvagens (Merel et al., 2013; Buratti et al., 2017; Pearson et al., 2016). Apesar da complexidade das exposições ambientais e das perdas econômicas causadas por esses contaminantes de preocupação emergente, existem poucos critérios e regulamentações de qualidade da água para exposição a cianotoxinas, especialmente nos países em desenvolvimento (Merel et al., 2013; Brooks et al., 2017). Muitos países têm valores regulatórios para exposição à microcistina-LR que estão de acordo com o nível de exposição recomendado ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) fornecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011). Os valores de microcistina total aceitáveis pode variar entre os países. Na Itália, por exemplo, e $0,84 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto no Canadá e $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) revisou a

Regra de Monitoramento de Contaminantes Não Regulamentados (UCMR 4) para Sistemas Públicos de Água para adicionar 10 tipos de cianotoxinas (EPA, 2015), adicionou várias toxinas à Lista de Candidatos a Contaminantes 3 e 4 (CCL3 e 4) (EPA, 2016), e propôs o Projeto de Critérios de Qualidade da Água Ambiente Recreativa de Saúde Humana ou Avisos de Natação para MCs ($4 \mu\text{g L}^{-1}$) e CLD ($8 \mu\text{g L}^{-1}$) (EPA, 2016).

Já no Brasil, duas regulamentações acerca dos padrões da qualidade da água e critérios de potabilidade apontam considerações sobre a presença de cianotoxinas e/ou presença de cianobactérias no corpo hídrico: CONAMA 357 e Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, em seu Anexo XX, alterada pela Portaria GM/MS nº 888, 04 de maio de 2021.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a partir da Resolução CONAMA 357 estabelece os padrões de qualidade de diferentes classes de água e nestas são determinados valores de densidades de cianobactérias para garantir a proteção da saúde e bem-estar humano (Tabela 3). Assim, há três limites máximos de densidade celular para cianobactérias, de acordo com a classe do corpo d'água: Classe 1, os quais destinam-se ao abastecimento para consumo humano após tratamento simplificado, dentre outros, o limite máximo aceitável (LMA) é de densidade máxima de cianobactérias de $20.000 \text{ células.ml}^{-1}$. Para corpos hídricos de Classe 2, destinados ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional além dos outros usos, é estabelecido densidade celular máxima de cianobactérias de $50.000 \text{ células.ml}^{-1}$. Por fim, a Classe 3, considera densidade celular máxima de cianobactérias de $100.000 \text{ células.ml}^{-1}$ (Tabela 3) (CONAMA, 2005).

O Ministério da Saúde por meio da Portaria GM/MS nº 888 de 04 de maio de 2021, estabelece os limites de controle e vigilância dos padrões da qualidade da água para consumo humano e potabilidade (BRASIL, 2021). A portaria em vigor estabelece limites máximos aceitáveis (LMA) para três cianotoxinas: Microcistina total, Cilindrospermopsina e Saxitoxina.

De acordo com esta regulamentação, fica determinado que deve-se ter monitoramento mensal em todos os pontos de captação de água do manancial quando o número de células de cianobactérias não exceder $10.000 \text{ células.ml}^{-1}$ e, semanalmente quando o número de células de cianobactérias exceder este valor. Quando ocorre um valor maior que $20.000 \text{ células.ml}^{-1}$ deve ser realizada a análise semanal das cianotoxinas microcistinas, saxitoxinas e cilindrospermopsinas. Além disso, deve-se identificar os gêneros de cianobactérias presentes. Para estas toxinas, a portaria estabelece o limite máximo aceitável de $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ para saxitoxina, e $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para cilindrospermopsina e microcistina total em mananciais superficiais.

Tabela 3– Valor máximo permitido conforme resolução 357/2005 para três diferentes classes de água doce.

Classificação da Água	Destino da Água	Clorofila-a ($\mu\text{g/L-1}$)	Fósforo total (mg/L-1)	Cianobactérias ($\text{cels.mL/mm}^3\cdot\text{L}^{-1}$) cc
Classe 1	Abastecimento para consumo humano simplificado, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e frutas que são consumidas cruas	10	0,020 (lêntico) 0,025 (intermediário) 0,1 (lótico)	20.000/2
Classe 2	Abastecimento para consumo humano convencional, recreação de contato primário, proteção comunidade aquáticas, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e aquicultura e a atividade de pesca.	30	0,030 (lêntico) 0,050 (intermediário) 0,1 (lótico)	50.000/5
Classe 3	Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado, irrigação de culturas, à pesca amadora, recreação de contato secundário e dessedentação de animais.	60	0,05 (lêntico) 0,075 (intermediário) 0,15 (lótico)	100.000/10 50.000/5 (Para dessedentação de animais)

Fonte: Resolução CONAMA 357/2005.

Assim, métodos de triagem para cianotoxinas são necessários para apoiar estudos ecológicos e de saúde pública de cianotoxinas em águas superficiais e organismos consumidos por populações humanas.

Métodos para detecção de toxinas

A presença de cianobactérias toxigênicas em reservatórios de água para abastecimento públicorepresenta um risco para a saúde humana e animal em todo o mundo (Haddad et al., 2019), tornando-se motivo de preocupação crescente.

Do ponto de vista legislativo e toxicológico, as toxinas variantes de microcistina (MC), cilindrospermopsina (CYN), saxitoxina (STX) e anatoxina-a (ATX-a) são as mais relevantes (Vogiazzi et al., 2019). Embora se concorde que esses compostos tóxicos devem ser monitorados de perto, a vigilância de rotina desses produtos químicos bioativos pode ser feita de várias maneiras, e decidir a técnica a ser adotada é um grande desafio. Devido às diversas técnicas e à grande diversidade de cianotoxinas identificadas atualmente, neste trabalho optou-se por restringir-se aos métodos biológicos utilizados para detecção de cianotoxinas na água.

Dentre os testes e métodos laboratoriais disponíveis para detectar e identificar células e cianotoxinas na água, encontram-se os métodos biológicos como: ensaios em camundongos ou peixes, ensaios de inibição de proteínas fosfatases (PPIA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (Tabela 3). Esses métodos podem variar muito em grau de sofisticação e nas informações que fornecem (Msagati, Siame e Shushu, 2006). Especificidade é um parâmetro de validação dos métodos analíticos e biológicos que diz respeito ao poder do método de detectar somente o analito ou cianotoxina em questão e não outros interferentes. Quanto mais exclusivo for a detecção do método, mais seletivo ele será. A sensibilidade é outro parâmetro também utilizado na validação de métodos analíticos que diz respeito à concentração do analito ou cianotoxina detectada. Quanto menor for a concentração detectada, mais sensível é o método (INMETRO, 2007).

Bioensaios

Em *bioensaios* realizados com ratos, camundongos ou peixes, o material (extrato bruto ou purificado de toxinas) é administrado via injeção peritoneal no animal escolhido. Geralmente, este método é utilizado para determinar a toxicidade de material proveniente de florações, apresentando um resultado qualitativo de, por exemplo, uma floração ser ou não tóxica. Dependendo da resposta e sintomatologia apresentada pelo animal exposto também é possível identificar a classe de toxina. Contudo, esse tipo de ensaio apresenta algumas limitações, entre elas são: (i) este teste em concentrações de amostras de 1 a 2 µg/l pode ser realizado pelo sistema de microinjeção; (ii) muitos países hoje em dia não permitem testes em animais, salvo sob licença e em número restrito (McElhiney et al., 2002; Torokne, 1999).

O método de referência para a análise da saxitoxina é o bioensaio em camundongo ou a análise cromatográfica (Cao et al., 2018). No entanto, questões éticas relacionadas ao bioensaio em camundongos ou peixes, bem como as características de requisitos de métodos demorados, trabalhosos e sofisticados de ensaios cromatográficos estão direcionando a busca por métodos alternativos para análise de STX (Campbell et al., 2011; Turner et al., 2011).

A anatoxina-a foi a primeira toxina de cianobactérias a ser elucidada estruturalmente, portanto o desenvolvimento de estratégias analíticas para sua detecção foi relativamente mais rápido. Devido à sua alta toxicidade para mamíferos, o bioensaio em camundongos via administração *intraperitoneal*, foi usado nos primeiros estudos para avaliar seus efeitos (Falconer, 1993), posteriormente, outros ensaios biológicos usando diferentes organismos-alvo em testes ecotoxicológicos (*Artemia salina*, (Lahti et al., 1995),

Thamnocephalus platyurus (Torokne et al., 2000), e larvas de insetos (Kiviranta et al., 1993) foram realizados para avaliação da toxicidade de amostras com anatoxina-a. A sensibilidade do teste *Artemia salina* foi semelhante à obtida com o bioensaio em camundongos (Osswald et al., 2007). Porém, esses bioensaios apresentaram desvantagens como a falta de seletividade em altas doses e a necessidade de grande quantidade de material para tal avaliação (Henriksen et al., 1997).

Ensaio de Inibição Enzimática

Abordagens de *inibição enzimática* são realizadas para detectar a toxicidade de compostos bioativos como as Microcistinas (MCs) e anatoxina-a. As MCs são compostos que atuam diretamente na inibição das porções serina e treonina das proteínas fosfatases 1 e 2^a, cuja consequência direta é a hiperfosforilação intracelular, mecanismo de ação específico das hepatotoxinas, enquanto que o princípio do mecanismo de ação da toxina ANA-a é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AchE) (Dorr et al., 2010; Picardo et al., 2019).

Há duas variações dos ensaios de inibição: ensaios colorimétricos e fluorescentes. Esses ensaios usam p-nitrofenil fosfato como substratos e podem ser utilizados em associação com imunossaios, como o ELISA, o que torna a análise altamente sensível e específica (Msagati, Siame e Shushu, 2006).

As primeiras abordagens foram realizadas por Ver e Carmichael (1994) usando um método colorimétrico de ensaio de proteína fosfatase para detectar MC, porém diferentes variantes foram bem-sucedidas. O nível de detecção mais baixo foi alcançado usando um bioensaio enzimático baseado na quantificação do fosfato 32P radiomarcado (Lambert et al., 1994; Chorus, 2001). Reações colorimétricas e fluorimétricas foram aplicadas para detecção de diversas cianotoxinas com a medida de fosvitina (Clark & Smith, 2004; McElhiney et al., 2002). A principal vantagem dos métodos baseados na inibição enzimática é a rápida resposta sem preparo de amostra. No entanto, as principais limitações gerais são a falta de especificidade e versatilidade desses ensaios (Picardo et al., 2019)

Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Essa técnica é amplamente utilizada na avaliação da segurança da água, e provou ser um método muito sensível. Este método se baseia no reconhecimento dos peptídeos por anticorpos monoclonais (Nagata et al., 1995). Alguns anticorpos desenvolvidos para uma

toxina específica, como por exemplo, a microcistina-LR também reconhecem outras variantes desta toxina, o que torna o método pouco seletivo. Contudo, é bastante utilizado em amostras ambientais e é um ótimo método de varredura, pois detecta pequenas concentrações de microcistinas (Msagati, Siami e Shushu, 2006). A principal limitação deste procedimento é que não é possível determinar qual tipo de microcistina está presente no meio (Masango et al., 2008).

Este método também é utilizado para detecção de cilindrospermopsina e saxitoxina em amostras de água, com limite de detecção em 0,04 mg CYN/L e uma precisão de 0,01 mg CYN/L, e 0,015 mg STX/L e uma precisão de 0,001 mg STX/L, respectivamente (Picardo et al., 2019), no entanto, esses limites de detecção estão acima dos valores permitidos pela portaria 888/2021.

Tabela 4– Vantagens e limitações dos métodos biológicos utilizados para a detecção de cianotoxinas.

Métodos Biológicos			
Parâmetros de avaliação	Bioensaios	ELISA	Ensaio PPI
Sensibilidade	Baixo	✓	✓
Custo	Baixo	✓	✓
Quantificação		✓	✓
Distinguir variantes	Ambos os métodos não diferenciam as variantes de cianotoxinas		
Várias classes de toxinas	Ambos os métodos não identificam várias classes de cianotoxinas simultaneamente		
Outros	Aprovação pelo comitê de ética	Interferência da matriz	Específico para algumas toxinas

Fonte: Arquivo pessoal do pesquisador (2022).

Estudos realizados para detectar microcistina pelos métodos ELISA e PPIA, mostraram que ambas as abordagens se correlacionaram bem, ou seja, os dois métodos são capazes de proporcionar uma resposta equivalente ao total de microcistinas presentes na amostra (Abdallah et al., 2021). Gaget et al. (2017) observaram que as concentrações das toxinas variaram entre os métodos, porém a quantificação de microcistina pelo método PPIA correspondeu apenas a 60% do resultado pelo método ELISA. Isso veio a corroborar com um

estudo de Hawkins et al. (2005), que mostra que os resultados obtidos por PPIA são geralmente inferiores aos obtidos por ELISA. Isso pode ser explicado pela afinidade que cada método apresenta para as diversas microcistinas. Desta forma, a técnica para detecção dessa toxina, deve ser escolhida com cuidado, no intuito de se ter os melhores resultados possíveis, uma vez que, de acordo com cada mecanismo de detecção a mistura de microcistinas é observada de forma diferente.

A presença da cilindrospermopsina é bem relatada através do método ELISA (Gaget et al., 2017). No entanto, durante o uso dessa técnica, pode ocorrer uma incerteza na detecção da toxina CYN quando desoxi-CYN ou 7-epi-CYN estiver presente, mesmo assim, esse é o método que fornece estimativa mais precisa da presença da CYN. Recentemente, Lei et al. (2018) desenvolveram uma técnica com um anticorpo monoclonal N8 altamente sensível através de imunoensaio de fluorescência resolvido no tempo competitivo direto (TRFIA) para detecção de cilindrospermopsina na água. Esse método apresentou uma resposta sigmoideal típica para CYN em concentrações de 0,01–100 ngMI⁻¹, com uma ampla faixa quantitativa entre 0,1 e 50 ngMI⁻¹. O limite de detecção do método foi calculado em 0,02 ngMI⁻¹, que está bem abaixo do valor de referência de 1 µg L⁻¹ e é sensível o suficiente para fornecer um alerta precoce da ocorrência de florações de cianobactérias produtoras de CYN. Além disso, uma comparação realizada do TRFIA com o kit ELISA em amostras de água e culturas de *Cylindrospermopsis* produziu um valor de correlação r^2 de 0,963, o que afirma que o novo teste é melhor para detecção de CYN em amostras de água e algas.

Para a detecção de saxitoxina várias técnicas como: bioensaios baseados em células (Okumura, Tsuzuki e Tomita, 2005; Wang et al., 2015), ensaios de ligação ao receptor (RBA) (Van Dolah et al., 2012), ensaios fluorométricos (Louzao et al., 2003) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (Chu e Fan, 1985; Garet et al., 2010) foram relatados por pesquisadores nas últimas décadas. Entre esses mecanismos, Gaget et al. (2017) observaram que o método ELISA parece subestimar a presença de STX presente quando mais de uma variante se faz presente. Portanto, as análises cromatográficas continuam sendo a abordagem mais confiável disponível para esse grupo de toxinas.

Recentemente um ensaio ELISA para anatoxina-a foi produzido, no intuito de se ter uma metodologia de análise mais rápida e confiável baseada em anticorpos (Quiñones-Reyes et al., 2019). Isso vem a contribuir para o desenvolvimento de diversos sistemas imunanalíticos para a análise rápida dessas potentes toxinas biológicas em águas ambientais, contribuindo assim para a segurança do abastecimento de água, para a saúde humana e animal

e para o conhecimento sobre a incidência mundial de proliferação de cianobactérias e suas consequências tóxicas (Smith et al., 2020).

Considerações Finais

As autoridades de monitoramento ambiental enfrentam grandes desafios na análise de cianotoxinas. Isso porque, a qualidade das informações usadas para o gerenciamento de risco depende da qualidade do método analítico e da precisão das premissas que fundamentam a conversão de um resultado de ensaio em uma estimativa de potencial risco. É esse potencial risco que é comparado aos níveis de alerta, que são fundamentais no manejo de florações toxigênicas.

As técnicas analíticas mais comuns para a determinação de cianotoxinas são técnicas imunológicas, como ensaio imunoenzimático (ELISA) e abordagens bioquímicas. Porém, são métodos conduzidos em laboratórios, o que os tornam inadequados para o monitoramento do uso da água.

Diante da grande variedade de cianotoxinas e o número crescente de fontes de água afetadas por cianobactérias, é necessário abordagens analíticas capazes de quantificar toxinas multiclases em matrizes ambientais. Para isso, é necessário o uso de métodos de detecção sensíveis e eficientes de espectro mais amplo, para verificar um número maior de compostos e metabólitos secundários. Com uma abordagem que apresente limite de detecção extremamente baixo e alto grau de confiança na identificação dos compostos alvo, e assim possa direcionar um tratamento mais eficaz da água de reservatórios destinados ao abastecimento público.

Referências

- ABDALLAH, M.F. *et al.* Cyanotoxins and Food Contamination in Developing Countries: Review of Their Types, Toxicity, Analysis, Occurrence and Mitigation Strategies. **Toxins**. 13, 770-786. 2021. DOI: 10.3390/toxins13110786. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins13110786>.
- AI, Y.; LEE, S.; LEE, J. Drinking water treatment residuals from cyanobacteria bloom affected areas: investigation of potential impact on agricultural land application. **Sci. Total Environ**. 706, 135756. 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135756. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135756>.
- AL-SAMMAK, M.A. *et al.* Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. **Toxins**. (Basel) 6, 488-508. 2014. DOI 10.3390/toxins6020488. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins6020488>
- AMORIM, C.A.; MOURA, A.N. Ecological impacts of freshwater algal blooms on water quality, plankton biodiversity, structure, and ecosystem functioning. **Sci. Total Environ**. 758, 143605. 2020. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.143605. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143605>.
- AN, J.S.; CARMICHAEL, W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. **Toxicon**. 32 (12), 1495e1507. 1994. DOI: 10.1016/0041-0101(94)90308-5. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90308-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90308-5)
- BAIG, S.A. *et al.* Impact of climate factors on cyanobacterial dynamics and their interactions with water quality in South Taihu Lake, China. **Chemistry and Ecology**. 33, 76–87. 2017. DOI: 10.1080/02757540.2016.1261122 Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02757540.2016.1261122>
- BALLOT, A.; BERNARD, C.; FASTNER, J. Saxitoxin and analogues. In: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. (Eds.), *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. John Wiley and Sons, Ltd, pp. 148–154. 2017. DOI 10.1002/9781119068761. <https://doi.org/10.1002/9781119068761>. Ch14.
- BANKER, R. *et al.* Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. **J. Toxicol. Environ. Heal**. 62, 281-288. 2001. DOI:10.1080/009841001459432. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/009841001459432>
- BANKS, W. A. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. **BMC Neurol**. 9, 1-5. 2009. DOI 10.1186/1471-2377-9-S1-S3 Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2377-9-S1-S3>
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. *et al.* Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 86 (1), 297-309. 2014. DOI 10.1590/0001-3765201302512. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201302512>
- BORMANS, M. *et al.* Demonstrated transfer of cyanobacteria and cyanotoxins along a fresh

water marine continuum in France. **HarmfulAlgae**. 87, 101639. 2019. DOI:10.1016/j.hal.2019.101639. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101639>

BRASIL, J. *et al.* Drought-induced water-level reduction favors cyanobacteria blooms in tropical shallow lakes. **Hydrobiologia**. 770 (1), 145-164. 2016. DOI: 10.1007/s10750-015-2578-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2578-5>

BROOKS, B. W. *et al.* 2016. Are harmful algal blooms becoming the greatest inland water quality threat to public health and aquatic ecosystems? **Environmental Toxicology and Chemistry**. 35, 6-13. 2016. DOI: [epdf/10.1002/etc.3220](https://doi.org/10.1002/etc.3220). Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.3220>.

BROOKS, B. W. *et al.* In some places, in some cases, and at some times, harmful algal blooms are the greatest threat to Inland water quality. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 36 (5), 1125 – 1127. 2017. DOI: 10.1002/etc.3801. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.3801>.

BURATTI, F.M. *et al.* Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Arch. Toxicol**. 91, 1049-1130. 2017. DOI 10.1007/s00204-016-1913-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>.

CAMPBELL, K. *et al.* Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin binders for optical biosensor technology: problems and possibilities for the future: a review. **Food Addit. Contam. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment** 28 (6), 711–725. 2011. DOI 10.1080/19440049.2010.531198. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.531198>.

CAO, M. *et al.* Fabrication of reduced graphene oxide decorated with gold and nickel for the catalytic reduction of 4-nitrophenol. **Journal of Materials Science**. 53, 4874 – 4883. 2018. DOI 10.1007/s10853-017-1913-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1913-9>.

CATHERINE, A. *et al.* Microcystins and Nodularins. In: Meriluoto, J., Spoof, L., Cood, G.A. (Eds.), Handbook of 53omosedastici monitoring and cyanotoxin analysis, first ed. John Wiley & Sons. 2017. DOI 10.1002/9781119068761.ch11. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch11>

CHEN, G. *et al.* Effect of acute exposure of saxitoxin on development of zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Environmental Research**. 185, 109432. 2020. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109432. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109432>

CHEN, L.; XIE, P. Mechanisms of microcystin-induced cytotoxicity and apoptosis. **Mini Rev. Med. Chem**. 16, 1018-1031. 2016. DOI 10.2174/1389557516666160219130407. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389557516666160219130407>.

CHONG, M. W. K. *et al.* Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. **Toxicol**. 40, 205-211. 2002. DOI 10.1016/s0041-0101(01)00228-8. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00228-8](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00228-8)

CHRISTENSEN, V. G. and KHAN, E. Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. **Science of the Total Environment**. **736**, 139515. 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139515. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139515>

CHU, F.S., FAN, T.S. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 68 (1), 13 – 16. 1985. DOI 10.1093/jaoac/68.1.13. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jaoac/68.1.13>.

COLAS, S.; DUVAL, C.; MARIE, B. Toxicity, transfer and depuration of anatoxin-a (cyanobacterial neurotoxin) in medaka fish exposed by single-dose gavage. **Aquatic Toxicology**. **222**, 105422. 2020. DOI:10.1016/j.aquatox.2020.105422. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105422>

CUNHA, I. *et al.* Aptamer-Based Biosensors to Detect Aquatic Phycotoxins and Cyanotoxins. **Sensors**. **18**, 2367. 2018. DOI: 10.3390/s18072367. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s18072367>.

DÍEZ-QUIJADA, L. *et al.* Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MCLR and MC-RR: A review. **Food and Chemical Toxicology**. **125**, 106-132. 2019. DOI 10.1016/j.fct.2018.12.042. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.042>

DORR, F. A. *et al.* Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**. **56**, 1247 – 1256. 2010. DOI 10.1016/j.toxicon.2010.03.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.018>.

FISCHER, W. J. *et al.* Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **203**, 257-263. 2005. DOI 10.1016/j.taap.2004.08.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.012>

FISCHER, A. *et al.* The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/ SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **245**, 9-20. 2010. DOI 10.1016/j.taap.2010.02.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.02.006>

FROSCIO, S. M. *et al.* Cyindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. **Environ. Toxicol. Int. J.** **18** (4), 243-251. 2003. DOI 10.1002/tox.10121. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.10121>

FUNARI, E. *et al.* Cyanobacteria blooms in water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing and recreational activities. **Science of The Total Environment**. **15**, 867-880. 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.232. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.232>

GAGET, V. *et al.* Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment? **Water Research**. **118**, 227 – 238. 2017. DOI 10.1016/j.watres.2017.04.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.025>

GARET, E. *et al.* Comparative evaluation of enzyme-linked immunoassay and reference

methods for the detection of shellfish hydrophilic toxins in several presentations of seafood. **J. Agric. Food Chem.** 58, 1410 – 1415. 2010. DOI 10.1021/jf904448z. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf904448z>.

GUZMÁN-GUILLÉN, R. *et al.* Effects of *Chrysochloris* (*Aphanizomenon*) *ovalisporum* extracts containing cylindrospermopsin on growth, photosynthetic capacity, and mineral content of carrots (*Daucus carota*). **Ecotoxicology**. 26, 22-31. 2017. DOI 10.1007/s10646-016-1737-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1737-4>.

GUZMÁN-GUILLÉN, R. *et al.* Cyanobacterium producing cylindrospermopsin cause oxidative stress at environmentally relevant concentrations in sub-chronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**. 90, 1184-1194. 2013. DOI 10.1016/j.chemosphere.2012.09.027. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.027>

HADDAD, S. P. *et al.* Determination of microcystins, nodularin, anatoxin-a, cylindrospermopsin, and saxitoxin in water and fish tissue using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1599, 66-74. 2019. DOI 10.1016/j.chroma.2019.03.066. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.066>.

HAVENS, K.E. *et al.* Dynamics of cyanobacteria blooms are linked to the hydrology of shallow Florida lakes and provide insight into possible impacts of climate change. **Hydrobiologia**. 829, 43–59. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3425-7>.

HAWKINS, P. R. *et al.* A review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environment. **Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA**. 54 (8), 509 – 518. 2005. DOI 10.2166/aqua.2005.0045. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/aqua.2005.0045>.

HINOJOSA, M.G. *et al.* Neurotoxicity induced by microcystins and cylindrospermopsin: A review. **Science of the Total Environment**. 668, 547-565. 2019. DOI 10.1016/j.scitotenv.2019.02.426. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.426>

HOWARD, M.D. *et al.* Multiple co-occurring and persistently detected cyanotoxins and associated cyanobacteria in adjacent California lakes. **Toxicon**. 192, 1–14. 2021. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.12.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.12.019>.

HUANG, I & ZIMBA, P. V. Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology. **Harmful Algae**. 83, 42-94. 2019. DOI 10.1016/j.hal.2018.11.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.11.008>

JIMÉNEZ, L. D. Q. *et al.* In vitro assessment of cyanotoxins bioaccessibility in raw and cooked mussels. **Food and Chemical Toxicology**. 140, 111391. 2020. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111391. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111391>

LAMBERT, T.W. *et al.* Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay. **Environ. Sci. Technol.** 28 (4), 753e755. 1994. DOI 0013-936X/94/0928-0753S04.50/0. Disponível em:

<https://doi.org/0013-936X/94/0928-0753S04.50/0>.

LI, Y. *et al.* A cross-sectional investigation of chronic exposure to micro- cystin in relationship to childhood liver damage in the Three Gorges Reservoir Region, China. **EnvironHealt Perspect.** 119(10), 1483–1488. 2011. DOI: 1289/ehp.1002412. Disponível em: <https://doi.org/1289/ehp.1002412>.

LIAO, M.; YU, G.; GUO, Y. Eutrophication in Poyang Lake (Eastern China) over the Last 300 Years in Response to Changes in Climate and Lake Biomass. **PLoS ONE.** 12(1), e0169319. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0169319. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/56omosc.pone.0169319>

LOUZAO, M.C. *et al.* A fluorimetric microplate assay for detection and quantitation of toxins causing paralytic shellfish poisoning. **Chem. Res. Toxicol.** 16, 433 – 438. 2003. DOI 10.1021/tx025574r. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/tx025574r>.

MANTZOUKI, E. *et al.* Understanding the key ecological traits of cyanobacteria as a basis for their management and control in changing lakes. **Aquat Ecol.** 50, 333–350. 2016. DOI: 10.1007/s10452-015-9526-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10452-015-9526-3>

McELHINEY, J. *et al.* Rapid Isolation of a Single-Chain Antibody against the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR by Phage Display and Its Use in the Immunoaffinity Concentration of Microcystins from Water. **Applied and Environmental Microbiology.** 68 (11), 5288 – 5295. 2002. DOI 10.1128/AEM.68.11.5288–5295.2002. Disponível em <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5288–5295.2002>.

MELLO, F. D. *et al.* Mechanisms and Effects Posed by Neurotoxic Products of Cyanobacteria/Microbial Eukaryotes/Dinoflagellates in AlgaeBlooms: a Review. **Neurotox Res.** 33 (1), 153-167. 2017. DOI: 10.1007/s12640-017-9780-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9780-3>.

MENDES, C. F. *et al.* The reduction in water volume favors filamentous cyanobacteria and heterocyst production in semiarid tropical reservoirs without the influence of the N:P ratio. **Science of the Total Environment.** 816, 151584. 2022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.151584. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151584>

MENDES, C. M. Purificação e caracterização físico-química da tripsina do peixe-zebra (Daniorerio). 2016. 42 f. Monografia (Bacharel em Biotecnologia). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2016. Disponível em: <http://www.cbiotec.ufpb.br/ccbiotec/56omosceda/tccs/2015.2/2015-2-cayro-macedo-mendes.pdf>

MEREL, S. *et al.* State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment International.** 59, 303-327. 2013. DOI 10.1016/j.envint.2013.06.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>.

MIGLIONE, A.; NAPOLETANO, M.; CINTI, S. Electrochemical Biosensors for Tracing Cyanotoxins in Food and Environmental Matrices. **Biosensors.** 315-2021. DOI: 10.3390/bios11090315. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bios11090315>.

MSAGATI, T. A. M.; SIAME, B. A.; SHUSHU, D. D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**. 78 (4), 382-397. 2006. DOI 10.1016/j.aquatox.2006.03.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.011>.

NAGATA, S. *et al.* Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. **Natural Toxins**.3 (2), 78 – 86. 1995. DOI 10.1002/nt.2620030204. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/nt.2620030204>.

NDLELA, L. L. *et al.* An overview of cyanobacterial bloom occurrences and research in Africa over the last decade. **Harmful Algae**. 60, 11-26. 2016. DOI:10.1016/j.hal.2016.10.001 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.10.001>.

OKUMURA, M., TSUZUKI, H., TOMITA, B. A rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins by cell bioassay. **Toxicon**. 46, 93 – 98. 2005. DOI 10.1016/j.toxicon.2005.03.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.018>.

O'NEILL, K.; MUSGRAVE, I. F.; HUMPAGE, A. Low dose extended exposure to saxitoxin and its potential neurodevelopmental effects: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 48, 7-16. 2016. DOI 10.1016/j.etap.2016.09.020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.020>

PEARSON, L. A. *et al.* The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. **Harmful Algae**.54, 98 – 111. 2016. DOI 10.1016/j.hal.2015.11.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.002>.

PICARDO, M. *et al.* Recent advances in the detection of natural toxins in freshwater environments. **Trends in Analytical Chemistry**.112, 75-86. 2019. DOI 10.1016/j.trac.2018.12.017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.017>.

PONIEDZIAŁEK, B.; RZYMSKI, P.; KOKOCIŃSKI, M. Cylindrospermopsin: water-linked potential threat to human health in Europe. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 34, 651-660. 2012. DOI 10.1016/j.etap.2012.08.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.08.005>

PONIEDZIAŁEK, B.; RZYMSKI, P.; WIKTOROWICZ, K. Toxicity of cylindrospermopsin in human lymphocytes: proliferation, viability and cell cycle studies. **Toxicol In Vitro** 28(5), 968-974. 2014. DOI 10.1016/j.tiv.2014.04.015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.04.015>.

PONIEDZIAŁEK, B.; RZYMSKI, P.; KARCZEWSKI, J. The role of the enzymatic antioxidant system in cylindrospermopsin-induced toxicity in human lymphocytes. **Toxicol In Vitro**. 29(5), 926-932. 2015. DOI 10.1016/j.tiv.2015.03.023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.023>.

POURIA, S. *et al.* Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**. 352, 21-26. 1998. DOI 10.1016/s0140-6736(97)12285-1. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)12285-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)12285-1).

- PREUSSEL, K. *et al.* First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. **Toxicon**. 47, 156-162. 2006. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.10.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.10.013>
- PUERTO, M. *et al.* Acute effects of pure cylindrospermopsin on the activity and transcription of antioxidant enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed by gavage. **Ecotoxicology**. 20, 1852-1860. 2011. DOI 10.1007/s10646-011-0723-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0723-0>.
- PUERTO, M. *et al.* Mutagenic and genotoxic potential of pure Cylindrospermopsin by a battery of in vitro tests. *Food Chem. Toxicol.* 121, 413-422. 2018. DOI 10.1016/j.fct.2018.09.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.013>
- QIAN, H. *et al.* Developmental neurotoxicity of *Microcystis aeruginosa* in the early life stages of zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 151, 35-41. 2018. DOI 10.1016/j.ecoenv.2017.12.059. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.059>
- QIAO, Q. *et al.* Subcellular localization of microcystin in the liver and the gonads of medaka fish acutely exposed to microcystin-LR. **Toxicon**. 159, 14-21. 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.12.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.12.006>
- QUIÑONES-REYES, G. *et al.* Synthetic Haptens and Monoclonal Antibodies to the Cyanotoxin Anatoxin-a. **Angew. Chem. Int. Ed.** 2019, 58, 9134 – 9139. DOI 10.1002/anie.201904002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.201904002>.
- RAO, P. L. *et al.* Involvement of caspase and reactive oxygen species in cyanobacterial toxin anatoxin-a-induced cytotoxicity and apoptosis in rat thymocytes and Vero cells. **Arch Toxicol** 76(4), 227-235. 2002. DOI 10.1007/s00204-002-0330-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0330-1>.
- RUTKOWSKA, M. *et al.* Recent trends in determination of neurotoxins in aquatic environmental samples. **TrAC– Trends Anal. Chem.** 112, 112-122. 2019. DOI 10.1016/j.trac.2019.01.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.001>.
- SALMASO, N. *et al.* Basic guide to detection and monitoring of potentially toxic cyanobacteria. *Handb. Cyanobacterial Monit. Cyanotoxin Anal.* 6, 46-69. 2017. DOI 10.1002/9781119068761.ch6. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch6>
- SCARLETT, K. R. *et al.* Global scanning of cylindrospermopsin: Critical review and analysis of aquatic occurrence, bioaccumulation, toxicity and health hazards. **Sci. Total Environ.** 10. 738-139807.2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139807. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139807>
- SILVA, R. C. *et al.* Cylindrospermopsin effects on cell viability and redox milieu of Neotropical fish *Hoplias malabaricus* hepatocytes. **Fish Physiology and Biochemistry**. 43, 1237-1244. 2017. DOI: 10.1007/s10695-017-0367-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0367-y>

SMITH, Z. J. *et al.* Limnological Differences in a Two-Basin Lake Help to Explain the Occurrence of Anatoxin-a, Paralytic Shellfish Poisoning Toxins, and Microcystins. **Toxins**. 559 (12), 2020. DOI 10.3390/toxins12090559. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins12090559>.

SONG, C., KANTHASAMY, A., KANTHASAMY, A. Chapter 63 – Cell signaling mechanisms in developmental neurotoxicity. In: **Reproductive and Developmental Toxicology**. Academic Press. San Diego, 835-845. 2011.

SU, Z. *et al.* Saxitoxin blocks L-type Ica. **J PharmacolExpTher**. 308, 324-329. 2004. DOI 10.1124/jpet.103.056564. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.103.056564>.

TESTAI, E. *et al.* Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. **EFSA Support. Publ.** 13 (2), 309. 2016. DOI 10.1007/978-0-387-75865-7_32. VER-998. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_32. EN-998.

TURNER, A.D. *et al.* Comparison of AOAC 2005.06 LC official method with other methodologies for the quantitation of paralytic shellfish poisoning toxins in UK shellfish species. **Anal. Bioanal. Chem.** 399, 1257 – 1270. 2011. DOI 10.1007/s00216-010-4428-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4428-7>.

VAN DOLAH, F.M. *et al.* Determination of paralytic shellfish toxins in shellfish by receptor binding assay: collaborative study. **Journal of AOAC International**. 95 (3), 795 – 812. 2012.82. DOI 10.5740/jaoacint.CS2011_27. Disponível em: https://doi.org/10.5740/jaoacint.CS2011_27

VOGIAZI, V. *et al.* A Comprehensive Review: Development of Electrochemical Biosensors for Detection of Cyanotoxins in Freshwater. **ACS. Sensors**. 4, 1151 – 1173. 2019. DOI 10.1021/acssensors.9b00376. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00376>.

WANG, Q. *et al.* An improved functional assay for rapid detection of marine toxins, saxitoxin and brevetoxin using a portable cardiomyocyte-based potential biosensor. **Biosens. Bioelectron.** 72, 10 – 17. 2015. DOI 10.1016/j.bios.2015.04.028. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.028>.

WESTHOLM, D. E. *et al.* Competitive inhibition of organic anion transporting polypeptide 1c1-mediated thyroxine transport by the fenamate class of nonsteroidal 5 α -reductase inhibitors. **Endocrinology**. 150(2),1025-1032. 2009. DOI 10.1210/ver.2008-0188. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2008-0188>.

ŽEGURA, B. *et al.* Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. **Toxicon**. 58, 471-479. 2011. DOI 10.1016/j.toxicon.2011.08.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.08.005>.

3.2 ARTIGO 2

Efeitos neurotóxicos e intestinais de cianotoxinas em peixes-zebra (*Daniorerio* – Hamilton, 1822)

Flávia Morgana Monteiro¹, José Etham de Lucena Barbosa², Diego de Souza Buarque³,
Rafael David Souto de Azevedo⁴, Ranilson de Sousa Bezerra¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, Campina Grande, PB, Brasil.

⁴ Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE\UAST, Serra Talhada, PE, Brasil.

⁴ Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade de Pernambuco – UPE, Garanhuns, PE, Brasil.

Resumo: Efeitos tóxicos das cianotoxinas têm sido amplamente discutidos, principalmente aqueles causados pelas chamadas hepatotoxinas, como a microcistina (MC) e a cilindrospermopsina (CYN), porém, os efeitos causados por toxinas neurológicas como a saxitoxina (STX) e anatoxina (ATX) ainda são bastante escassos. Este estudo investigou os efeitos in vitro das cianotoxinas sobre a atividade de enzimas neurológicas e digestivas, como também os efeitos das cianotoxinas na transcrição de genes do peixe-zebra (*Daniorerio*). Neste trabalho, extratos do peixe-zebra contendo enzimas acetilcolinesterase cerebral, acetilcolinesterase muscular, tripsina e quimotripsina foram expostos a diferentes concentrações (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 e 25 mg/L) das cianotoxinas: microcistina-LR, cilindrospermopsina, saxitoxina e anatoxina. A maior inibição da atividade da colinesterase foi observada para a enzima AchE cerebral exposta à saxitoxina (STX) e à anatoxina (ATX). Em relação a ação das cianotoxinas na AchE muscular, apenas a anatoxina foi capaz de inibir significativamente no grupo exposto à maior dose testada (25 µg/L) em comparação ao grupo controle. Em contraste, as enzimas digestivas mostraram atividade diminuída em exposições à microcistina-LR (MC-LR) e cilindrospermopsina (CYN). O maior efeito inibitório na atividade da tripsina foi observado na exposição à microcistina-LR. Em relação aos efeitos causados na quimotripsina, foi observado que a MC-LR diminuiu significativamente a atividade dessa enzima em concentrações ≥ 1 µg/L. A cilindrospermopsina causou redução na atividade da quimotripsina em concentrações mais altas (15, 20 e 25 µg/L). Já a anatoxina proporcionou diminuição da atividade da quimotripsina em concentrações ≥ 5 µg/L. Somados a esses resultados, na análise de transcrição gênica realizada com a MC-LR, foi visto que o nível de Mrna de vários tecidos do peixe-zebra foi alterado nas concentrações 1 e 2.5 µg/L de MC-LR. Esses resultados sugerem que as alterações enzimáticas em combinação com alterações na transcrição gênica é um conjunto de efeitos bioquímicos e moleculares que podem subsidiar novos estudos sobre alterações fisiológicas nesta espécie com implicações em seu metabolismo neurológico e digestivo.

Palavras-chave: Biomarcadores. Cianotoxinas. Colinesterase. Enzimas digestivas. Transcrição Gênica.

Introdução

A entrada de nutrientes advindos de atividades antropogênicas, como nitrogênio e fósforo, somados as mudanças climáticas, tem acelerado o processo de eutrofização nos ecossistemas aquáticos em todo o mundo (Buratti et al., 2017; Huisman et al., 2018; Paerl et al., 2019). Uma das principais consequências da eutrofização é o aumento significativo de florações de cianobactérias, as quais são reconhecidas por serem produtoras de cianotoxinas (Huisman et al., 2018; Silva et al., 2020). Essas toxinas são prejudiciais para a estrutura e função dos ecossistemas aquáticos e uma ameaça não apenas para organismos aquáticos, mas também para os terrestres, incluindo os seres humanos (Aguilera et al., 2018; Huisman et al., 2018). Isso tem levado a preocupações referentes à qualidade da água e à saúde pública em todo o mundo (Brooks et al., 2017; Preece et al., 2017; Sanseverino et al., 2017).

As cianotoxinas representam um grupo diversificado de compostos e são classificadas de acordo com os seus efeitos tóxicos, como hepatotoxinas (e.g. microcistina, cilindrospermopsina), neurotoxinas (e.g. saxitoxina, anatoxina), dermatotoxinas e toxinas irritantes (Du et al., 2019; Huisman et al., 2018). No entanto, outros órgãos como coração, pulmões, timo, baço, glândulas adrenais e trato intestinal, além do sistema imunológico também podem ser afetados por essas toxinas (Kubickova et al., 2019; Walter et al., 2018; Moraes and Magalhães, 2018).

Mesmo com mecanismos de ação específicos para as cianotoxinas, a toxicidade dessas substâncias é um processo de múltiplas vias, além do risco ecotoxicológico das cianotoxinas permanecer pouco compreendido (Campos and Vasconcelos 2010; Qian et al., 2018; Mehinto et al., 2021). Neste contexto, pesquisas mostram exemplos de intoxicação humana por microcistina e cilindrospermopsina. Nesses estudos, 89% dos pacientes não desenvolveram apenas insuficiência hepática grave, mas também exibiram sintomas agudos de neurotoxicidade (e.g. tontura, zumbido, dor de cabeça, vômito e cegueira) (Azevedo et al., 2002; Pouria et al., 1998).

Para compreender o efeito das cianotoxinas, estudos têm sido realizados em peixes e mamíferos, para verificar os efeitos neurotóxicos, assim como os efeitos digestivos ocasionados pela potencial ingestão dessas cianotoxinas (Yan et al., 2017; Kubickova et al., 2019; Wu et al., 2018). Dentre esses organismos, o peixe-zebra (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) é largamente usado como modelo geral para vertebrados em estudos comportamentais, genéticos e toxicológicos, tratando-se de um modelo que apresenta um alto grau de

similaridade genética com os humanos, permitindo o entendimento de mecanismos relacionados a patologias humanas (Trigueiro et al., 2020).

De modo geral, organismos aquáticos são capazes de acumular contaminantes presentes na água em células e tecidos, resultando em alterações enzimáticas responsáveis por processos vitais (Jonsson e Aoyama, 2010). As respostas subcelulares que incluem alterações na atividade de genes e proteínas, e danos ao DNA, representam em torno de 30% de todos os estudos de efeitos agudos das cianotoxinas (Mehinto et al., 2021). Portanto, esses organismos podem fornecer informações valiosas sobre as vias de toxicidade induzidas por produtos químicos ambientais e os possíveis danos à exposição a esses contaminantes.

Além disso, como os peixes estão em contato direto com a água em função da ingestão da água com contaminantes, estes organismos estão propícios a ingestão de toxinas, podendo desencadear alterações nas enzimas digestivas. Um exemplo é que extratos de cianobactérias contendo aeruginosinas inibiram a atividade da tripsina (Kohler et al., 2014; Mazur-Marzec et al., 2015). Em outro estudo, extratos de cianopeptolina, inibiram potentemente as atividades das enzimas tripsina e quimotripsina (Gademann et al., 2010).

As cianotoxinas também podem interferir na expressão gênica. Chen et al. (2020) relataram que a nodularina (NOD) causou dano ao DNA, danos oxidativos significativos e alteração na expressão de genes do desenvolvimento vascular e genes relacionados a apoptose no peixe-zebra. Além disso, a exposição de peixes-zebra à MC-LR causou desregulação nas atividades e níveis de transcrição de enzimas antioxidantes hepáticas (Hou et al., 2015).

Curiosamente, poucos estudos realizaram análises bioquímicas e moleculares de organismos aquáticos expostos a cilindrospermopsina, saxitoxina e anatoxina-a. Sendo a maioria deles realizados com microcistina-LR. Acrescenta-se também a necessidade de avaliar efeitos em dosagens menores, equivalentes ao valor máximo permitido pelos órgãos responsáveis (1 µg/L para MC-LR e CYN, 3 µg/L para STX). Diante disso, o objetivo do presente trabalho é avaliar os efeitos das toxinas MC-LR, CYN, STX e ATX em baixas concentrações (variando de 0.5 a 25 µg/L) nas enzimas neurológicas (Acetilcolinesterase) e intestinais (tripsina e quimotripsina), e o efeito da microcistina-LR na expressão gênica do *D. rerio*.

Materiais e Métodos

Produtos Químicos

As toxinas Microcistina-LR, Cilindrospermopsina, SaxitoxinaDiidrocloreto e Anatoxina-a com uma pureza de $\geq 95\%$ foram adquiridos da Abraxis (Warminster, PA, EUA). O trizol e a enzima TaqDNA polimerase foram adquiridos da ThermoScientific. O kit de síntese de Cdna foi obtido da Qiagen.

Desenho Experimental

Todas as condições experimentais foram previamente submetidas e aprovadas pelo Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Recife-PE, Brazil) (Processo nº 104/2019). Fêmeas alevinos de *Daniorerio* (Hamilton, 1822) (n = 150) foram cultivados no laboratório de Enzimologia da UFPE em dois aquários de 90 L cada (45 cm x 54 cm x 45 cm; com fotoperíodo de 12h) desde o nascimento até os 3 primeiros meses de vida. Os indivíduos foram alimentados *ad libitum* com ração comercial para peixes ornamentais (32% de proteína), e a água foi renovada diariamente (80% de água). Os parâmetros físico-químicos da água (Ph e Temperatura) foram monitorados continuamente.

Os indivíduos foram anestesiados com mesilato de tricaína (100 mg/L), em seguida foram sacrificados e cérebro, músculo e intestino foram removidos para a produção dos extratos brutos e a realização da exposição às toxinas *in vitro*.

Extratos enzimáticos e exposição às toxinas

Amostras do cérebro e do músculo (ambas contendo acetilcolinesterase) foram homogeneizados em 20 mg de tecido por ml de Tris-HCl 0.5 M, Ph 8,0, usando um homogeneizador de tecidos (IKA RW20, China) a 300 rpm durante 60 s. Em seguida, o homogenato foi centrifugado (HerolabUnicen MR Centrifuge, Germany) a 10.000 x g por 10 min à 4 °C. O sobrenadante (extrato enzimático) foi coletado e acondicionado em freezer à -25 °C para serem usados nos ensaios enzimáticos.

As amostras do intestino (contendo tripsina e quimotripsina) foram homogeneizadas em 40 mg de tecido por ml de 0,01 M Glicina-HCl, Ph 8,0 e 0,01 M Tris-HCl, Ph 8,0, respectivamente. Foi utilizado um homogeneizador de tecidos (IKA RW20, China) a 300 rpm durante 60 s. Em seguida o homogeneizado foi centrifugado (HerolabUnicen MR Centrifuge, Germany) a 10.000 x g por 25 min à 4 °C. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em freezer à -25 °C para serem usados nos ensaios enzimáticos.

As enzimas intestinais (tripsina e quimotripsina) e colinesterases (acetilcolinesterase do cérebro e músculo) foram expostas a oito concentrações diferentes (0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 20 e 25 µg/L) das cianotoxinas: Microcistina-LR, Saxitoxina, Anatoxina-a e Cilindropermopsina em cinco réplicas. O grupo controle inclui amostras sem a presença de qualquer cianotoxina. Amostras dos extratos enzimáticos foram incubadas durante 1 h com a presença de cada uma das cianotoxinas nas diferentes concentrações e a atividade residual foi subsequentemente determinada.

Atividades enzimáticas neurológicas

As atividades da AchE do músculo e cérebro foram determinada após a incubação de 1 h do extrato enzimático do respectivo tecido (10 µL) com cada uma das concentrações e tipos de cianotoxinas (10 µL) com posterior adição de DTNB (0,25 M; 200 µL). A reação foi realizada usando um espectrofotômetro de microplacas (BioRad Model X-Mark™, USA) a 405 nm durante 3 min em microplaca inerte de fundo chato com 96 poços depois da adição de 62 Mm acetilcolina (20 µL). A reação do branco foi realizada como citado anteriormente, com exceção da substituição do extrato enzimático com a solução tampão (Tris-HCl, 0,5 M Ph 8,0). A unidade de atividade (U) foi determinada como a quantidade capaz de converter 1 mmol de substrato por min (Assis et al., 2010).

Atividades enzimáticas digestivas

As atividades da tripsina e quimotripsina foram determinadas usando BapNA e Suc-Phe-p-Nan 4 Mm, respectivamente, dissolvidos em DMSO como substratos. O extrato enzimático do intestino (15 µL) foi incubado durante 1 h com a presença dos diferentes tipos e concentrações das toxinas (15 µL), seguida da adição do tampão Tris-HCl 0,5 M (Ph 8,0; 140 Ml). A reação foi iniciada pela adição do respectivo substrato (30 µL). A absorbância foi monitorada a 405 nm usando o espectrofotômetro microplate (BioRad Model X-Mark™, USA) após 15 e 10 min de reação para tripsina e quimotripsina, repectivamente. A reação do branco foi quantificada seguindo os mesmos passos anteriormente descritos com a ausência da enzima. A unidade de tripsina e quimotripsina foi determinada como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 mmol de p-nitroanilina por minuto por mg de proteína (Bezerra et al., 2005).

Expressão de transcritos de peixe zebra desafiado coma toxina microcistina-LR

Os animais foram expostos amicrocistina-LR nas concentrações 1 µg/L e 2.5 µg/L. Após a exposição foram anestesiados e eutanasiados em mesilato de tricaína 100 mg/L. Em seguida, os tecidos (cérebro, estômago, intestino e fígado) foram retirados e as carcaças foram descartadas em recipientes para lixo biológico e foram incineradas pela empresa encarregada da destinação de resíduos biológicos.

Primeiramente, o RNA total (1 µg) dos diferentes grupos (Controle, desafiado com microcistina 1 µg/L e 2.5 µg/L) foi extraído de cérebro, intestino, fígado e músculo de peixe zebra com reagente Trizol (ThermoScientific) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, este RNA foi utilizado para a síntese de Cdna utilizando o *Quantitec Reverse Transcription Kit* (Qiagen). Então, estes cDNAs foram utilizados para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com oligonucleotídeos específicos para os seguintes transcritos: superóxido dismutase, Catalase (GenBank AJ007505.1), Acetilcolinesterase (GenBank BC163898.1), Tripsina (GenBank: AJ297822.1), Quimotripsina (GenBank: AW133968.1) e β-actina (GenBank: AF057040.1) (Tabela 1). A PCR foi realizada utilizando Taq DNA polimerase (1 U), MgCl₂ (1 Mm), dNTPs (1 Mm) e os oligonucleotídeos, em 35 ciclos. Por fim, os produtos de PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose (1%).

Tabela 1–Oligonucleotídeos utilizados para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Nome do alvo	Sequência (5' → 3')
Superóxido dismutase (manganês) fwd	TCAACCCCCTGTTAGGTGCT
Superóxido dismutase (manganês) ver	CTCCAACAGCTCACCTGTG
Acetilcolinesterase fwd	GAACCTGACCTCGTAGTAGC
Acetilcolinesterase ver	CAGGGCTTTTTGGGCTCAGC
Tripsina fwd	GCTCCGCCCAAATCAACAGC
Tripsina ver	GCATTCAGGCACATCAGACG
Quimotripsina fwd	CTGACTGCACCAGCCTCTC
Quimotripsina ver	GGAGCTCATCAGGGGTGAAC
β-actina fwd	CATTGTTGGACGCCAGAC
β-actina ver	CAGTTGGTCACAATACCGTGC

fwd – *forward*; ver – reverso

Análise de Dados

As unidades de atividade enzimática foram transformadas em porcentagem (%) e expressas como média ± erro padrão. Para verificar diferenças significativas entre as médias

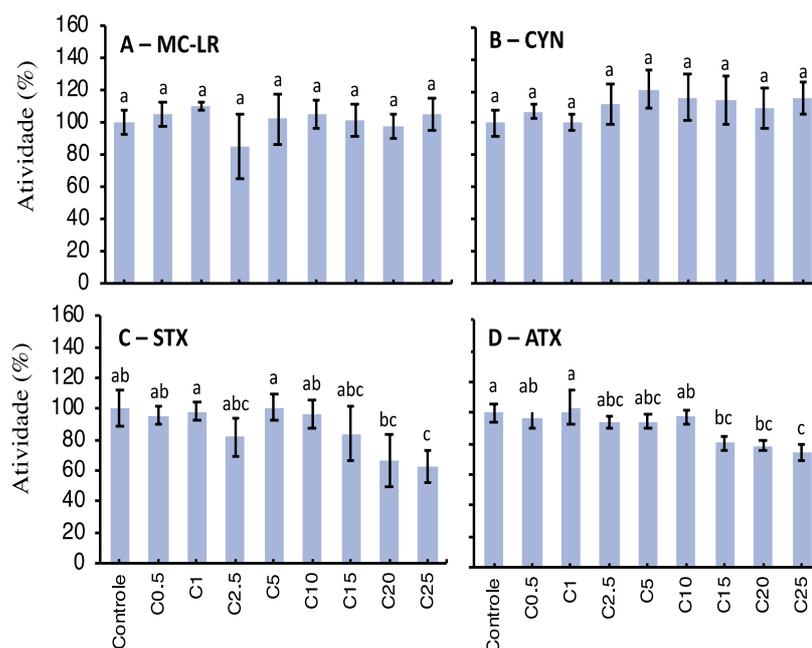
dos diferentes tratamentos foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores (concentrações x cianotoxinas) com 95% ($p < 0,05$) de nível de significância. A normalidade e homoscedasticidade dos dados foram verificados a partir dos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Todas as análises foram realizadas com o pacote estatístico “*vegan*” (Oksanen et al., 2018) no software R Core Team (2020).

Resultados

Efeitos das cianotoxinas nas atividades enzimáticas do peixe-zebra

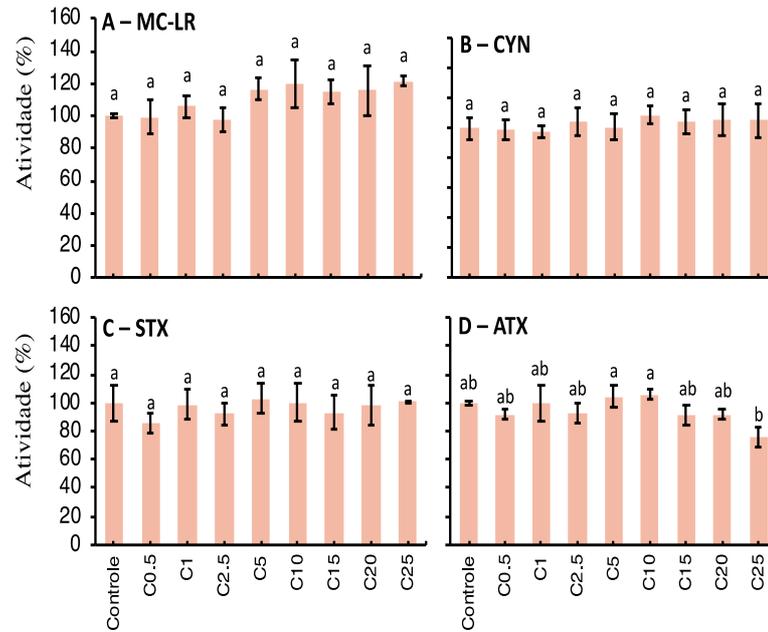
As enzimas envolvidas no processo colinérgico estão apresentadas nas Figura 1 e 2. A redução na atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral foi observada nos grupos expostos a saxitoxina (STX) e anatoxina (ATX). A redução significativa ($p < 0.05$) na atividade da AChE cerebral exposta a STX foi encontrada nas concentrações 20 e 25 $\mu\text{g/L}$, quando comparados ao controle. Já no grupo exposto à anatoxina, diminuições significativas na atividade da AChE cerebral foram observadas para as concentrações maiores que 15, 20 e 25 $\mu\text{g/L}$. Em relação a ação das cianotoxinas na AChE muscular, apenas a anatoxina foi capaz de inibir significativamente ($p < 0.05$) no grupo exposto à maior dose testada (25 $\mu\text{g/L}$) em comparação ao grupo controle.

Figura 1 -Efeitos da microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermospina (CYN), saxitoxina (STX) e anatoxina (ATX) em diferentes concentrações (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g/L}$)



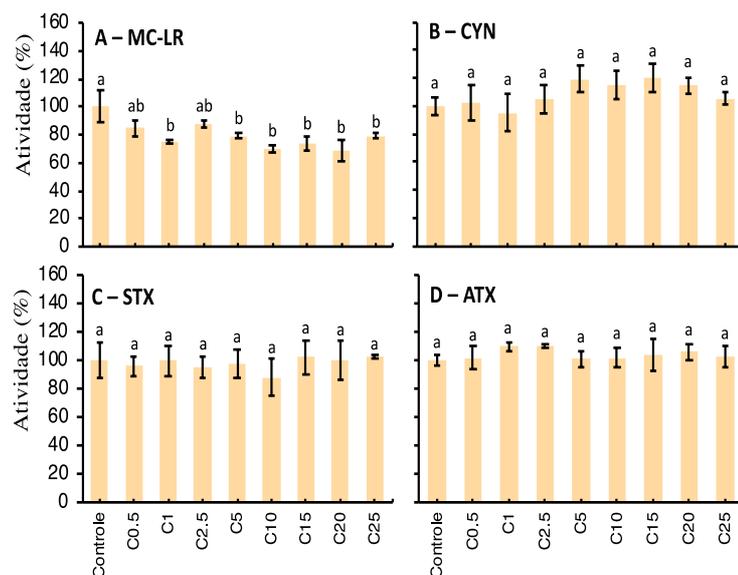
Fonte: Arquivo Pessoal do pesquisador (2022)

Figura 2 - Efeitos da microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermospina (CYN), saxitoxina (STX) e anatoxina (ATX) em diferentes concentrações (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g/L}$)



Fonte: Arquivo Pessoal do pesquisador (2022)

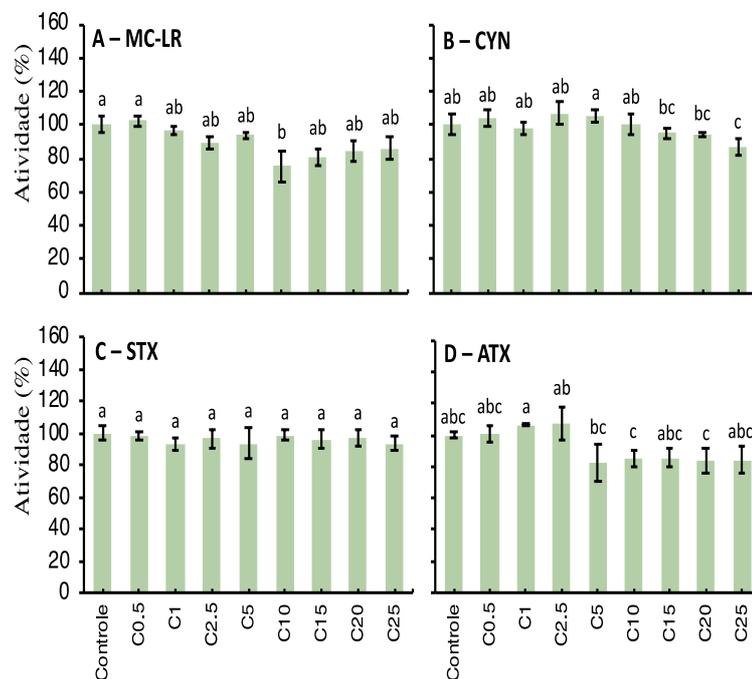
Figura 3-Efeitos da microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermospina (CYN), saxitoxina (STX) e anatoxina (ATX) em diferentes concentrações (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g/L}$)



Fonte: Arquivo Pessoal do pesquisador (2022)

As enzimas digestivas são mostradas nas Figura 3 e 4. O gráfico mostra diferença significativa na atividade da tripsina em relação ao controle na concentração 1 e $\geq 5.0 \mu\text{g/L}$ de exposição a microcistina-LR. Foi observado uma relação dose-dependente, pois não há diferença significativa entre os tratamentos a partir dessa concentração ($5.0 \mu\text{g/L}$) de exposição à microcistina-LR. O desempenho da tripsina exposta a cilindrospermopsina, saxitoxina e anatoxina não mostrou diferença significativa quando comparadas ao controle. No que diz respeito aos efeitos causados na quimotripsina, foi observado que a MC-LR diminuiu significativamente ($p < 0.05$) a atividade dessa enzima na concentração $10 \mu\text{g/L}$. A cilindrospermopsina causou redução na atividade da quimotripsina em concentrações mais altas ($15, 20$ e $25 \mu\text{g/L}$). Já a anatoxina proporcionou diminuição da atividade da quimotripsina nas concentrações $5, 10$ e $20 \mu\text{g/L}$. Nos grupos expostos à saxitoxina, as atividades de ambas as enzimas digestivas, não mostraram diferenças significativas quando comparadas ao controle.

Figura 4 -Efeitos da microcistina-LR (MC-LR), cilindrospermopsina (CYN), saxitoxina (STX) e anatoxina (ATX) em diferentes concentrações ($0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 \mu\text{g/L}$)

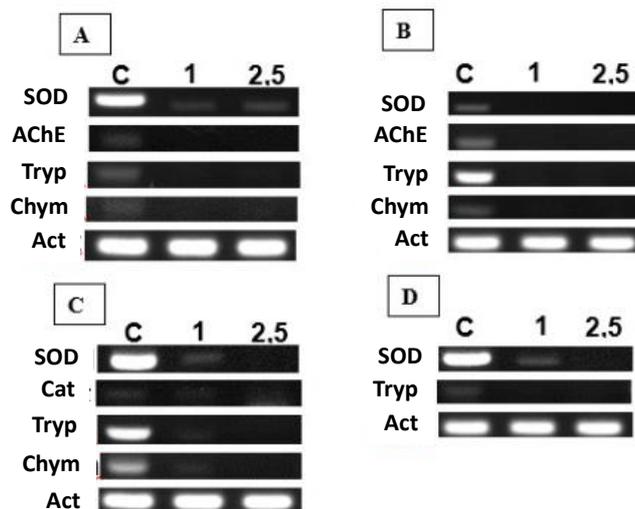


Fonte: Arquivo Pessoal do pesquisador (2022)

Efeitos da Microcistina-LR na transcrição gênica do peixe-zebra

Os níveis de expressão de mRNA de superóxido dismutase (*SOD*), acetilcolinesterase (*AChE*), tripsina (*Tryp*) e quimotripsina (*Chym*) em grupos controle e desafiados com microcistina-LR são mostrados na Figura 5. Em geral, o nível de mRNA de vários tecidos foi alterado nas concentrações 1 e 2.5 µg/L de MC-LR. O transcrito da superóxido dismutase foi o que teve a maior expressão no cérebro. O mesmo teve sua expressão diminuída neste órgão no grupo tratado com MC-LR (Figura 5-A). Já no intestino, o transcrito mais expresso foi a tripsina (Figura 5-B). *SOD* do intestino e *AChE*, *Tryp* e *Chym* do cérebro e do intestino não foram detectadas nos grupos expostos às concentrações 1 e 2.5 µg/L de MC-LR, sendo expressos apenas no grupo controle. A expressão da acetilcolinesterase não foi detectada no fígado, enquanto que o transcrito da superóxido dismutase foi o mais expresso nesse órgão (Figura 5-C). Para *SOD*, *Tryp* e *Chym*, a expressão diminuiu no grupo microcistina 1 µg/L e não foi detectada no grupo 2.5 µg/L. Acerca dos efeitos no músculo, o único transcrito cuja expressão foi detectada foi *SOD* (Figura 5-D). O padrão de expressão para esse transcrito nos diferentes grupos foi similar ao encontrado no fígado.

Figura 5 - Determinação da expressão de transcritos em diferentes órgãos de peixe zebra (*Danio rerio*). Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de PCR utilizando preparações de cDNA de: Cérebro (A); Intestino (B); Fígado (C) e Músculo (D).



Fonte: Arquivo Pessoal do pesquisador (2022)

Discussão

Em relação aos efeitos das neurotoxinas (STX e ATX) na AChE, no nosso estudo observou-se que ambas em concentrações maiores (a partir de 15 µg/L) foram capazes de suprimir a ação enzimática, porém, a anatoxina atuou inibindo as duas enzimas neurológicas, e a saxitoxina apenas a acetilcolinesterase cerebral. A alteração no desempenho dessas enzimas acontece porque as atividades colinesterásicas cerebral e muscular são reativas à exposição de produtos organofosforados e carbamatos, que são análogos estruturais da acetilcolina, como é o caso da STX e ATX (Assis et al., 2010; Kist et al., 2012). Além disso, o músculo é um dos locais de bioacumulação de produtos como metais, organofosforados e outros xenobióticos, o que pode resultar em alterações enzimáticas (Rodríguez-Fuentes., et al 2008).

Vários estudos têm mostrado a inibição da AChE cerebral de várias espécies de peixes contra diferentes xenobióticos (Guzmán-Guillén et al., 2015; da Silva et al., 2014; Muthulakshmi et al., 2018; Oliveira et al., 2017; Moreno et al., 2019). No entanto, em relação aos efeitos de cianotoxinas na AChE, em alguns casos não foram observadas alterações significativas neste parâmetro, como em *Geophagus brasiliensis* exposto à saxitoxina (Clemente et al., 2010), e em traíras expostas a cilindrospermopsina (da Silva et al., 2018). Outros autores relataram que durante a exposição a MC-LR dissolvida na água em concentrações baixas, a atividade da AChE foi significativamente aumentada (Kist et al. 2012; Wu et al., 2016), mas não mudou quando a toxina foi exposta intraperitonealmente no peixe-zebra (Kist et al., 2012). Desta forma, essas observações em diferentes organismos com várias concentrações de distintas toxinas sugerem que as alterações enzimáticas dependem do modo de exposição do organismo à toxina. Contudo, os resultados observados nesse estudo e somados a outros resultados já relatados (Kist et al., 2012; Wu et al., 2018) sugerem que a MC-LR não atua diretamente na atividade enzimática colinérgica, e servem como gatilhos para novos estudos no intuito de se ter uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares de toxicidade dessas toxinas no sistema nervoso.

Este é o primeiro trabalho a investigar implicações de cianotoxinas nas atividades de tripsina e quimotripsina extraídas do peixe-zebra, fornecendo uma base importante para estudos sobre toxicologia aquática. Ao contrário dos resultados observados para as colinesterases, o desempenho das enzimas intestinais foi reduzido nos ensaios de exposição às microcistina-LR, cilindrospermopsina e à anatoxina. No entanto, como tais exposições lidam

com mecanismos de ações peculiares de cada toxina, observou-se que a exposição à microcistina-LR induziu a maior supressão da atividade da tripsina e quimotripsina nas concentrações 1 e 10 µg/L, respectivamente. Além disso, as toxinas CYN (15, 20 e 25 µg/L) e a ATX (\geq a 5 µg/L) atuaram na inibição da quimotripsina, sendo este o primeiro estudo a mostrar efeito de uma neurotoxina (anatoxina) na função de uma enzima intestinal.

A inibição *in vitro* de enzimas digestivas por outros xenobiontes já foi relatada em outros estudos (Costa et al., 2013; Oliveira et al., 2017). Além desses, estruturas peptídicas (microgininas, aeruginosinas, cianopeptolinas, micropeptinas, anabaenopeptinas e microviridinas) com atividade de inibição de protease foram identificadas em espécies de cianobactérias como *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Lyngbya* e *Symploca* (Nagarajan et al., 2012; Mazur-Marzec et al., 2015). No entanto, não existiam dados sobre o comprometimento da atividade das enzimas digestivas mediado por essas cianotoxinas purificadas.

Numerosas cianobactérias produzem inibidores de proteases, que são principalmente peptídeos cíclicos e/ou lineares (Mazur-Marzec et al., 2015; Hasan et al., 2019). Serino proteases são um importante grupo de enzimas hidrolíticas que participam de processos como digestão, coagulação sanguínea, fibrinólise, resposta imune e apoptose (Di Cera, 2009). Estudos têm citado que compostos que desregulam a atividade de proteases como tripsina e quimotripsina, podem ser utilizados no tratamento de vários distúrbios metabólicos como: urticária, dermatite, asma, doença inflamatória intestinal, distúrbios neurológicos, doenças cardiovasculares, trombose, hipertensão, infecções virais ou câncer (Janssen & Rebollo, 2012; Patel, 2017).

No nosso estudo, a inibição da atividade da tripsina no intestino do peixe-zebra pela MC-LR foi confirmada pela análise da expressão gênica. Para Houet et al. (2015), alterações nos níveis de transcrição de genes de enzimas concomitantes com alterações na atividade dessas enzimas podem ser explicadas pelas alterações na síntese enzimática a nível molecular. No nosso estudo, também foi vista alteração do gene *tryp* no cérebro e fígado. Além disso, as expressões gênicas da superóxido dismutase do cérebro, intestino e músculo mostraram-se mais afetadas negativamente quando testadas a concentração maior (2,5 µg/L). A supressão dessa enzima antioxidante pode ser atribuída a efeitos secundários devido à inibição do substrato ou diminuição da síntese proteica em nível molecular (Hou et al., 2015).

Nossas observações indicam que a toxicidade das quatro toxinas testadas (MC-LR, CYN, STX e ATX) é evidente para o peixe-zebra. Foi notável que as concentrações mais altas usadas neste estudo foram cerca de vinte e cinco microgramas por litro, porém, a

concentração de exposição que resultou em neurotoxicidade variou a partir de 15µg/L para ambas as toxinas neurotóxicas. Além disso, no presente estudo, foi visto que a toxina MC-LR causou toxicidade na atividade enzimática da tripsina em concentrações a partir de 1µg/L, e efeitos na transcrição gênica foram verificados nos organismos desafiados em concentrações baixas equivalentes a 1 e 2.5 µg/L MC-LR. Esses efeitos genotóxicos afirmam o potencial de toxicidade da MC-LR em concentração máxima permitida pela órgãos responsáveis (1 µg/L MC-LR) para água destinada ao abastecimento público. Portanto, a toxicidade dessas substâncias em concentrações permitidas pela legislação deve ser levada a sério ao avaliar a segurança da qualidade da água para abastecimento público.

Considerações Finais

A exposição às cianotoxinas nas concentrações mais altas testadas induziu efeitos negativos nas atividades das enzimas neurológicas (acetilcolinesterase cerebral e muscular) e digestivas (tripsina e quimotripsina), somados a esses, efeitos genotóxicos no cérebro, músculo, intestino e fígado também foram vistos quando os peixes-zebra foram desafiados a baixas concentrações de MC-LR. Os resultados aqui encontrados servem como alerta e gatilhos para novos estudos no que diz respeito aos níveis de toxinas presentes na água utilizada para abastecimento público.

Referências

- AGUILERA, A. *et al.* Bloom-forming cyanobacteria and cyanotoxins in Argentina: A growing health and environmental concern. **Limnologia**. 69, 103-114. 2018. DOI: 10.1016/j.limno.2017.10.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.10.006>
- ASSIS, C. R. D. *et al.* Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossomamacropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environ. Toxicol. Chem.** 29, 2243-2248. 2010.
- AZEVEDO, S. M. *et al.* Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**. 27 (181-182), 441-446. 2002. DOI: 10.1016/s0300-483x(02)00491-2. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00491-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00491-2).
- BEZERRA, R.S. *et al.* Alkaline proteases from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochem.** 40, 1829-1834. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.066>
- BROOKS, B. W. *et al.* In some places, in some cases, and at some times, harmful algal blooms are the greatest threat to Inland water quality. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 36 (5), 1125 - 1127. 2017. DOI: 10.1002/etc.3801. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.3801>.
- BURATTI, F.M. *et al.* Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Arch. Toxicol.** 91, 1049-1130. 2017. DOI 10.1007/s00204-016-1913-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>.
- CLEMENTE, Z. *et al.* Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a Southern Brazilian reservoir. **Toxicon**. 55, 396-406. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.09.003>
- COSTA, H.M.S. *et al.* Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization. **Chem. Cent. J.** 7, 166-173. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-166>
- da SILVA, C. A. *et al.* Saxitoxins induce cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in teleost neurons in vitro. **Toxicon**. 86, 8-15. 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.04.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.016>
- da SILVA, R. C. *et al.* Comparative bioaccumulation and effects of purified and cellular extract of cylindrospermopsin to freshwater fish *Hoplias malabaricus*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**. 81 (14), 620-632. 2018. DOI: 10.1080/15287394.2018.1469101. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1469101>
- DU, X. *et al.* The Diversity of Cyanobacterial Toxins on Structural Characterization, Distribution and Identification: A Systematic Review. **Toxins**. 11 (9), 530. 2019. DOI 10.3390/toxins11090530. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins11090530>

- CHEN, G. *et al.* Effect of acute exposure of saxitoxin on development of zebrafish embryos (Daniorerio). **Environmental Research**. 185, 109432. 2020. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109432. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109432>
- GUSMÁN-GUILLÉN, R. *et al.* Cylindrospermopsin induces neurotoxicity in tilapia fish (Oreochromis niloticus) exposed to Aphanizomenon ovalisporum. **Aquat. Toxicol.** 161, 17-24. 2015. DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.01.024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.024>
- HASAN, M. M. *et al.* Isolation of Protease Inhibitors from Cyanobacteria Microcystis sp. Strain BM 25 Which Inhibits Major Digestive Enzyme in Daphnia magna. **Preprints**. 2019050319. 2019. DOI: 10.20944/preprints201905.0319.v1. Disponível em: <https://doi.org/10.20944/preprints201905.0319.v1>
- HOU, J. L. L. *et al.* Hepatic positive and negative antioxidant responses in zebrafish after intraperitoneal administration of toxic microcystin-LR. **Chemosphere**. 120, 729-736. 2015. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.09.079. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.079>
- HUISMAN, J. *et al.* Cyanobacterial blooms. **Nature Reviews**. 16, 471-483. 2018. DOI: 10.1038/s41579-018-0040-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>
- JANSSEN, V. & REBOLLO, A. The role and therapeutic potential of Ser/Thr phosphatase PP2a in apoptotic signaling networks in human cancer cells. **Current Molecular Medicine**. 12, 268-287. 2012. DOI: 10.2174/156652412799218930. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/156652412799218930>
- KIST, L. W. *et al.* Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional AChE activation in zebrafish (Danio rerio) brain. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. 155 (2), 247-252. 2012. DOI: 10.1016/j.cbpc.2011.09.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.09.002>
- KUBICKOVA, B. *et al.* Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system. **Environmental Sciences Europe**. 31 (31), 1-27. 2019. DOI: 10.1186/s12302-019-0212-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0212-2>
- MAZUR-MARZEC, H. *et al.* Baltic cyanobacteria – a source of biologically active compounds. **European Journal of Phycology**. 50 (3), 343-360. 2015. DOI: 10.1080/09670262.2015.1062563. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1062563>
- MEHINTO, A. C. *et al.* Synthesis of ecotoxicological studies on cyanotoxins in freshwater habitats – Evaluating the basis for developing thresholds protective of aquatic life in the United States. **Science of the Total Environment**. 795, 148864. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148864>
- MORAES, A. C.N. and MAGALHÃES, V. F. Renal tubular damage caused by cylindrospermopsin (cyanotoxin) in mice. **Toxicology Letters**. 286, 89-95. 2018.

DOI:10.1016/j.toxlet.2017.12.028.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.028>

Disponível

em:

MORENO, D. H. *et al.* Brain biomarkers in tench (*Tincatinca L.*) after semi-static exposure to the pesticide carbofuran. **Rev. Colomb. Cienc. Pecu.** 32(3), 232-244. 2019. DOI:10.17533/udea.rccp.v32n3a08. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v32n3a08>

NAGARAJAN, M. *et al.* A review of pharmaceutical toxicological potential of marine cyanobacterial metabolites. **Journal of Applied Toxicology.**32, 153-185. 2012. DOI: 10.1002/jat.1717. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jat.1717>

OKSANEN, J. *et al.* vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-2. 2018. Available at [https:// CRAN.R-project.org/ package=vegan](https://CRAN.R-project.org/package=vegan).

OLIVEIRA, V. M. *et al.* Aluminium sulfate exposure: A set of effects on hydrolases from brain, muscle and digestive tract of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.** 191, 101-108. 2017. DOI: 10.1016/j.cbpc.2016.10.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.10.002>

PAERL, H. W. *et al.* Mitigating a global expansion of toxic cyanobacterial blooms: confounding effects and challenges posed by climate change. **Marine and Freshwater Research.** 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/MF18392>

PATEL, S. A critical review on serine protease: key immune manipulator and pathology mediator. **Allergol. Immunopathol.** 45 (1), 1-13. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2016.10.011>.

POURIA, S. *et al.* Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet.** 352, 21-26. 1998. DOI 10.1016/s0140-6736(97)12285-1. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)12285-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)12285-1).

PREECE, E. P. *et al.* A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk. **HarmfulAlgae.** 61, 31-45. 2017. DOI: 10.1016/j.hal.2016.11.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.006>

QIAN, H. *et al.* Developmental neurotoxicity of *Microcystis aeruginosa* in the early life stages of zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety.**151, 35-41. 2018. DOI 10.1016/j.ecoenv.2017.12.059. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.059>

SANSEVERINO, I. Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection. **JRC Technical Reports.** EUR-28624 EN. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2760/36186>.

SILVA, M. R. F. *et al.* Biomarkers as a tool to monitor environmental impact on Aquatic Ecosystems. **Brazilian Journal of Development.**6 (10), 75702-75720. 2020. DOI:10.34117/bjdv6n10-120. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-120>

TRIGUEIRO, N. S.S. *et al.* Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research in Brazil. **Zebrafish.** 2020. DOI: 10.1089/zeb.2020.1930. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1930>.

WALTER, J. M. *et al.* Occurrence of Harmful Cyanobacteria in Drinking Water from a Severely Drought-Impacted Semi-arid Region. **Frontiers in Microbiology**. 9, 176. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00176. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00176>

WU, J. X. *et al.* Gastrointestinal toxicity induced by microcystins. Gastrointestinal toxicity induced by microcystins. **World Journal Clinical Cases**. 6 (10), 344-354. 2018. DOI: 10.12998/wjcc.v6.i10.344. Disponível em: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v6.i10.344>.

WU, Q. *et al.* Microcystin-LR exposure induces developmental neurotoxicity in zebrafish embryo. **Environmental Pollution**. 213, 793-800. 2016. DOI:10.1016/j.envpol.2016.03.048 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.048>

YAN, W. *et al.* **Aquatic Toxicology**. 188, 170-176. 2017. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.05.006 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.006>

4 CONCLUSÕES

O teste *in vitro* mostrou que as toxinas testadas provocaram alterações nas atividades enzimáticas do peixe-zebra. Em especial, as alterações provocadas pela saxitoxina e anatoxina, causaram efeitos neurotóxicos. Isso pode trazer consequências severas, visto que o desempenho da enzima acetilcolinesterase é essencial na propagação do impulso nervoso.

As toxinas hepatotóxicas, microcistina-LR e cilindrospermopsina, interferiram negativamente na atividade tripsina e quimotripsina, respectivamente. E a anatoxina provocou diminuição da quimotripsina, demonstrando seu efeito prejudicial ao sistema digestivo. Sobre isso, prejuízos que venham a afetar o sistema neurológico, ou comprometer a atividade das enzimas envolvidas no processo de digestão, é muito significativo, pois podem provocar efeitos irreversíveis.

Portanto, a identificação de doses de cianotoxinas que comprometam a função neurológica e digestiva é extremamente importante e reafirmam a necessidade de controles e métodos de detecção de cianotoxinas mais precisos para águas utilizadas para abastecimento público.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M.F. *et al.* Cyanotoxins and Food Contamination in Developing Countries: Review of Their Types, Toxicity, Analysis, Occurrence and Mitigation Strategies. **Toxins**. 13, 770-786. 2021. DOI: 10.3390/toxins13110786. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins13110786>.
- AGUILERA, A. *et al.* Bloom-forming cyanobacteria and cyanotoxins in Argentina: A growing health and environmental concern. **Limnologia**. 69, 103-114. 2018. DOI: 10.1016/j.limno.2017.10.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.10.006>
- AI, Y.; LEE, S.; LEE, J. Drinking water treatment residuals from cyanobacteria bloom affected areas: investigation of potential impact on agricultural land application. **Sci. Total Environ**. 706, 135756. 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135756. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135756>.
- AL-SAMMAK, M.A. *et al.* Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. **Toxins**. (Basel) 6, 488-508. 2014. DOI 10.3390/toxins6020488. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins6020488>
- AMORIM, C.A.; MOURA, A.N. Ecological impacts of freshwater algal blooms on water quality, plankton biodiversity, structure, and ecosystem functioning. **Sci. Total Environ**. 758, 143605. 2020. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.143605. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143605>.
- AN, J.S.; CARMICHAEL, W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. **Toxicon**. 32 (12), 1495-1507. 1994. DOI: 10.1016/0041-0101(94)90308-5. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90308-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90308-5).
- ARÁOZ, R.; MOLGÓ, J.; TANDEAU DE MARSAC, N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon**. 56(5), 813-828. 2010a. DOI:10.1016/j.toxicon.2009.07.036. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.036>
- ARÁOZ, R. *et al.* Ligand-binding assays for cyanobacterial neurotoxins targeting cholinergic receptors. **Anal Bioanal Chem**. 397(5), 1695-1704. 2010b. DOI 10.1007/s00216-010-3533-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3533-y>.
- ARONSTAM, R.S.; WITKOP, B. Anatoxin-a interactions with cholinergic synaptic molecules. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 78(7), 4639-4643. 1981. DOI 10.1073/pnas.78.7.4639. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4639>
- ASSIS, C. R. D. *et al.* Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossomamacropomum*) and *in vitro* effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environ. Toxicol. Chem**. 29, 2243-2248. 2010.
- ATENCIO, L. *et al.* Acute Effects of Microcystins MC-LR and MC-RR on Acid and Alkaline Phosphatase Activities and Pathological Changes in Intraperitoneally Exposed Tilapia Fish

- (*Oreochromis sp.*). **Toxicologic Pathology**. 36 (3), 449-458. 2008. DOI: 10.1177/0192623308315356. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0192623308315356>
- AZEVEDO, R. D. S. *et al.* Mitochondria as targets for toxicity and metabolism research using zebrafish. **BBA – General Subjects**. 1864 ,129634. 2020. DOI: 10.1016/j.bbagen.2020.129634. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129634>
- AZEVEDO, S. M. *et al.* Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**. 27 (181-182), 441-446. 2002. DOI: 10.1016/s0300-483x(02)00491-2. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00491-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00491-2).
- BAIG, S.A. *et al.* Impact of climate factors on cyanobacterial dynamics and their interactions with water quality in South Taihu Lake, China. **Chemistry and Ecology**. 33, 76–87. 2017. DOI: 10.1080/02757540.2016.1261122 Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02757540.2016.1261122>
- BALLOT, A.; BERNARD, C.; FASTNER, J. Saxitoxin and analogues. In: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. (Eds.), *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. John Wiley and Sons, Ltd, pp. 148–154. 2017. DOI 10.1002/9781119068761. <https://doi.org/10.1002/9781119068761>. ch14.
- BANKER, R. *et al.* Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. **J. Toxicol. Environ. Heal.** 62, 281-288. 2001. DOI 10.1080/009841001459432. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/009841001459432>
- BANKS, W. A. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. **BMC Neurol.** 9, 1-5. 2009. DOI 10.1186/1471-2377-9-S1-S3 Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2377-9-S1-S3>
- BARKIA, A. *et al.* Trypsin from the viscera of Bogue (Boopsboops): isolation and characterization. **Fish Physiology and Biochemistry**. 36, 893-902, 2009. DOI 10.1007/s10695-009-9365-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9365-z>
- BAR-LLAN, O. *et al.* Toxicity assessment of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. **Small**. 5, 1879-1910. 2009. DOI:10.1002/sml.200801716. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/sml.200801716>.
- BEFFAGNA, G. Zebrafish as a Smart Model to Understand Regeneration After Heart Injury: How Fish Could Help Humans. **Front. Cardiovasc. Med.** 6, 107. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00107. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00107>.
- BELIAEVA, N. F. *et al.* Zebrafish as a model organism for biomedical studies. **BiomedKhim.** 56, 120-123. 2010. DOI:10.18097/pbmc20105601120. Disponível em: <https://doi.org/10.18097/pbmc20105601120>
- BELLEM, F. *et al.* Cyanobacteria toxicity: potential public health impact in south Portugal populations. **J Toxicol Environ Health Part A**. 76(4–5), 263-271. 2013. DOI: 10.1080/15287394.2013.757204. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.757204>

BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1104 p.

BEZERRA, R.S. *et al.* Alkaline proteases from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **ProcessBiochem.** 40, 1829–1834. 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.066_

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. *et al.* Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** 86 (1), 297-309. 2014. DOI 10.1590/0001-3765201302512. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201302512>

BORMANS, M. *et al.* Demonstrated transfer of cyanobacteria and cyanotoxins along a fresh water marine continuum in France. **HarmfulAlgae.** 87, 101639. 2019. DOI:10.1016/j.hal.2019.101639. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101639>

Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J.; *Hydrolases in Organic Synthesis*; Wiley: Alemanha, 2006.

BRADFORD, Y. M. *et al.* Zebrafish models of human disease: Gaining insight into human disease at ZFIN. **ILAR Journal.** 58 (1). 4-16. 2017. DOI:10.1093/ilar/ilw040. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw040>

BRASIL, J. *et al.* Drought-induced water-level reduction favors cyanobacteria blooms in tropical shallow lakes. **Hydrobiologia.** 770 (1), 145-164. 2016. DOI: 10.1007/s10750-015-2578-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2578-5>

BRASIL. Decreto nº 79.367, de 9 de março de 1977. Dispõe sobre normas e o padrão de potabilidade de água e dá outras providências. Brasília, 1977. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1970-1979/d79367.htm. Acesso em: 04 de outubro de 2021.

BRASIL. PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria n.º 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre normas de potabilidade de água para o consumo humano. Brasília: SVS, 2011; BRASIL, Ministério do Meio Ambiente.

BRIDI, D. *et al.* Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Toxicology.** 392, 32–39, 2017. DOI: 10.1016/j.tox.2017.10.007 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.007>

BROOKS, B. W. *et al.* 2016. Are harmful algal blooms becoming the greatest inland water quality threat to public health and aquatic ecosystems? **Environmental Toxicology and Chemistry.** 35, 6-13. 2016. DOI: epdf/10.1002/etc.3220. Disponível em: <https://doi/epdf/10.1002/etc.3220>.

BROOKS, B. W. *et al.* In some places, in some cases, and at some times, harmful algal blooms are the greatest threat to Inland water quality. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 36 (5), 1125 - 1127. 2017. DOI: 10.1002/etc.3801. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.3801>.

BURATTI, F.M. *et al.* Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Arch. Toxicol.** 91, 1049-1130. 2017. DOI 10.1007/s00204-016-1913-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>.

BUTTERFIELD, D. A.; LAUDERBACK, C. M. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress. **Free Radic Biol Med.** 32(11), 1050-1060. 2002. DOI 10.1016/s0891-5849(02)00794-3. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00794-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00794-3)

CAMPBELL, K. *et al.* Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin binders for optical biosensor technology: problems and possibilities for the future: a review. **Food Addit. Contam. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment** 28 (6), 711–725. 2011. DOI 10.1080/19440049.2010.531198. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.531198>.

CAMPOS, A.; VASCONCELOS, V.; Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. **Int. J. Mol. Sci.** 11, 268-287. 2010. DOI 10.3390/ijms11010268. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms11010268>.

CAO, M. *et al.* Fabrication of reduced graphene oxide decorated with gold and nickel for the catalytic reduction of 4-nitrophenol. **Journal of Materials Science.** 53, 4874 - 4883. 2018. DOI 10.1007/s10853-017-1913-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1913-9>.

CATHERINE, A. *et al.* Microcistins and Nodularins. In: Meriluoto, J., Spoof, L., Cood, G.A. (Eds.), Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis, first ed. John Wiley & Sons. 2017. DOI 10.1002/9781119068761.ch11. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch11>

CHEN, L.; XIE, P. Mechanisms of microcystin-induced cytotoxicity and apoptosis. **Mini Rev. Med. Chem.** 16, 1018-1031. 2016. DOI 10.2174/1389557516666160219130407. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389557516666160219130407>.

CHEN, G. *et al.* Effect of acute exposure of saxitoxin on development of zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Environmental Research.** 185, 109432. 2020. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109432. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109432>

CHONG, M. W. K. *et al.* Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. **Toxicol.** 40, 205-211. 2002. DOI 10.1016/s0041-0101(01)00228-8. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00228-8](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00228-8)

CHORUS, I. & BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization. London and New York, 416 p. 1999.

CHORUS, I. Cyanotoxins: Occurrence, Causes and Consequences, 2001.

CHORUS, I. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Federal Environment Agency, Germany. 2012.

CHRISTENSEN, V. G. and KHAN, E. Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. **Science of the Total Environment**. 736, 139515. 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139515. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139515>

CHU, F.S., FAN, T.S. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 68 (1), 13 - 16. 1985. DOI 10.1093/jaoac/68.1.13. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jaoac/68.1.13>.

CLEMENTE, Z. *et al.* Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a Southern Brazilian reservoir. **Toxicon**. 55, 396-406. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.09.003>

COIMBRA, R. dos S. C. *et al.* Biomarkers as tools in quality assessment of fish contaminated with trace metals. *Boletim Do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego*. 7(1), 153-172. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2177-4560.20130011>

COLAS, S.; DUVAL, C.; MARIE, B. Toxicity, transfer and depuration of anatoxin-a (cyanobacterial neurotoxin) in medaka fish exposed by single-dose gavage. **Aquatic Toxicology**. 222, 105422. 2020. DOI:10.1016/j.aquatox.2020.105422. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105422>

COSTA, H.M.S. *et al.* Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization. **Chem. Cent. J.** 7, 166-173. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-166>

CUNHA, I. *et al.* Aptamer-Based Biosensors to Detect Aquatic Phycotoxins and Cyanotoxins. **Sensors**. 18, 2367. 2018. DOI: 10.3390/s18072367. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s18072367>.

da SILVA, C. A. *et al.* Saxitoxins induce cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in teleost neurons in vitro. **Toxicon**. 86, 8-15. 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.04.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.016>

da SILVA, R. C. *et al.* Comparative bioaccumulation and effects of purified and cellular extract of cylindrospermopsin to freshwater fish *Hoplias malabaricus*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**. 81 (14), 620-632. 2018. DOI: 10.1080/15287394.2018.1469101. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1469101>

DE CASTRO, R. J. S. *et al.* A new approach for proteases production by *Aspergillus niger*

based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 4 (2), 199-207. 2015. DOI 10.1016/j.bcab.2014.12.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.12.001>

DE LA CRUZ, A.A. *et al.* A review on cylindrospermopsin: The global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. **Environ. Sci. Process Impacts**. 15, 1979 - 2003. 2013. DOI 10.1039/C3EM00353A . Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C3EM00353A>.

DIETRICH, D. & HOEGER, S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? **Toxicology and Applied Pharmacology**. 203 (3), 273-289. 2005. DOI: 10.1016/j.taap.2004.09.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.005>

DÍEZ-QUIJADA, L. *et al.* Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review. **Food and Chemical Toxicology**. 125, 106-132. 2019. DOI 10.1016/j.fct.2018.12.042. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.042>

DORR, F. A. *et al.* Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**. 56, 1247 - 1256. 2010. DOI 10.1016/j.toxicon.2010.03.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.018>.

DU, X. *et al.* The Diversity of Cyanobacterial Toxins on Structural Characterization, Distribution and Identification: A Systematic Review. **Toxins**. 11 (9), 530. 2019. DOI 10.3390/toxins11090530. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins11090530>

FENT, K.; SUMPTER, J.P. Progress and promises in toxicogenomics in aquatic toxicology: is technical innovation driving scientific innovation? **Aquat Toxicol**. 105, 25-39. 2011. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.06.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.008>

FISCHER, W. J. *et al.* Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. **Toxicol. Appl. Pharmacol**. 203, 257-263. 2005. DOI 10.1016/j.taap.2004.08.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.012>

FISCHER, A. *et al.* The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol**. 245, 9-20. 2010. DOI 10.1016/j.taap.2010.02.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.02.006>

FOGLER, H. S. Elementos de engenharia das reações químicas. 4ª ed. Rio de Janeiro, LTC, 2009.

FROSCIO, S. M. *et al.* Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. **Environ. Toxicol. Int. J**. 18 (4), 243-251. 2003. DOI 10.1002/tox.10121. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.10121>

FUNARI, E. *et al.* Cyanobacteria blooms in water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing and recreational activities. **Science of The Total Environment**. 15,

867-880. 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.232. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.232>

GAAIED, S. *et al.* Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide. **Chemosphere**. 224, 289-297. 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.02.125 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.125>

GAGET, *et al.* Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment? **Water Research**. 118, 227 - 238. 2017. DOI 10.1016/j.watres.2017.04.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.025>

GANGUILHET, G. Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de Mugiliza e Mugilcurema como possíveis biomarcadores de impactos antrópicos na estação ecológica de carijós. 112 p. 2019. Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em:
<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/197728>

GARET, E. *et al.* Comparative evaluation of enzyme-linked immunoassay and reference methods for the detection of shellfish hydrophilic toxins in several presentations of seafood. **J. Agric. Food Chem.** 58, 1410 - 1415. 2010. DOI 10.1021/jf904448z. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf904448z>.

GURUMALLESH, P. *et al.* A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**. 128, 254-267. 2019. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>

GUSMÁN-GUILLÉN, R. *et al.* Cyindrospermopsin induces neurotoxicity in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to *Aphanizomenon ovalisporum*. **Aquat. Toxicol.** 161, 17-24. 2015. DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.01.024. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.024>

GUTIÉRREZ-PRAENA, D. *et al.* Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cyindrospermopsin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 74 (6), 1567-1572. 2011. DOI: Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.030>

GUZMÁN-GUILLÉN, R. *et al.* Effects of Chryso sporum (Aphanizomenon) ovalisporum extracts containing cyindrospermopsin on growth, photosynthetic capacity, and mineral content of carrots (*Daucus carota*). **Ecotoxicology**. 26, 22-31. 2017. DOI 10.1007/s10646-016-1737-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1737-4>.

GUZMÁN-GUILLÉN, R. *et al.* Cyanobacterium producing cyindrospermopsin cause oxidative stress at environmentally relevant concentrations in sub-chronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**. 90, 1184-1194. 2013. DOI 10.1016/j.chemosphere.2012.09.027. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.027>

HADDAD, S. P. *et al.* Determination of microcystins, nodularin, anatoxin-a, cylindrospermopsin, and saxitoxin in water and fish tissue using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1599, 66-74. 2019. DOI 10.1016/j.chroma.2019.03.066. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.066>.

HASAN, M. M. *et al.* Isolation of Protease Inhibitors from Cyanobacteriaum *Microcystis sp.* Strain BM 25 Which Inhibits Major Digestive Enzyme in *Daphnia magna*. **Preprints**. 2019050319 . 2019. DOI: 10.20944/preprints201905.0319.v1. Disponível em: <https://doi.org/10.20944/preprints201905.0319.v1>

HAVENS, K.E. *et al.* Dynamics of cyanobacteria blooms are linked to the hydrology of shallow Florida lakes and provide insight into possible impacts of climate change. **Hydrobiologia**. 829, 43–59. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3425-7>.

HAWKINS, P. R. *et al.* A review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environment. **Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA**. 54 (8), 509 - 518. 2005. DOI 10.2166/aqua.2005.0045. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/aqua.2005.0045>.

HINOJOSA, M.G. *et al.* Neurotoxicity induced by microcystins and cylindrospermopsin: A review. **Science of the Total Environment**. 668, 547-565. 2019. DOI 10.1016/j.scitotenv.2019.02.426. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.426>

HOU, J. L. L. *et al.* Hepatic positive and negative antioxidant responses in zebrafish after intraperitoneal administration of toxic microcystin-LR. **Chemosphere**. 120, 729-736. 2015. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.09.079 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.079>

HOWARD, M.D. *et al.* Multiple co-occurring and persistently detected cyanotoxins and associated cyanobacteria in adjacent California lakes. **Toxicon**. 192, 1–14. 2021. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.12.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.12.019>.

HOWE, D.G. *et al.* The Zebrafish Model Organism Database: new support for human disease models, mutation details, gene expression phenotypes and searching. **Nucleic Acids Research**. 45, 758-768. 2017. DOI:10.1093/nar/gkw1116 Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1116>

HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**. 496, 498-503. 2013. DOI:10.1038/nature12111. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature12111>

HUANG, I & ZIMBA, P. V. Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology. **Harmful Algae**. 83, 42-94. 2019. DOI 10.1016/j.hal.2018.11.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.11.008>

HUISMAN, J. *et al.* Cyanobacterial blooms. **Nature Reviews**. 16, 471-483. 2018. DOI: 10.1038/s41579-018-0040-1 Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>

Illanes, A.; Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications; Springer: Chile, 2008.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007.

IRONS, T. D. *et al.* Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**. 32, 84-90. 2010. DOI: 10.1016/j.ntt.2009.04.066. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.066>.

JANSSEN, E. M. L. Cyanobacterial peptides beyond microcystins e A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. **Water Research**. 151, 488 - 499. 2019. DOI 10.1016/j.watres.2018.12.048. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.048>

JANSSEN, V. & REBOLLO, A. The role and therapeutic potential of Ser/Thr phosphatase PP2a in apoptotic signaling networks in human cancer cells. **Current Molecular Medicine**. 12, 268-287. 2012. DOI: 10.2174/156652412799218930.

JIMÉNEZ, L. D. Q. *et al.* In vitro assessment of cyanotoxins bioaccessibility in raw and cooked mussels. **Food and Chemical Toxicology**. 140, 111391. 2020. DOI:10.1016/j.fct.2020.111391. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111391>

KANNO, G. *et al.* Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh-water. **Fish Physiol Biochem**. 36, 637-645. 2009. DOI 10.1007/s10695-009-9336-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9336-4>.

KIELING, D. D. *Enzimas, aspectos gerais*. Florianópolis: Editora da UFSC, 2002.

KIMMEL, C. B. *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev Dyn**. 203 (3), 253-310. 1995. DOI: 10.1002/aja.1002030302. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>

KIST, L. W. *et al.* Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional *ache* activation in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. 155 (2), 247-252. 2012. DOI:10.1016/j.cbpc.2011.09.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.09.002>

KUBICKOVA, B. *et al.* Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system. **Environmental Sciences Europe**. 31 (31), 1-27. 2019. DOI:10.1186/s12302-019-0212-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0212-2>

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**. 46(2), 182–186. 2003. DOI: 10.1016/S0025-326X(02)00449-6. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00449-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00449-6)

LAMBERT, T.W. *et al.* Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay. **Environ. Sci. Technol.** 28 (4), 753e755. 1994. DOI 0013-936X/94/0928-0753S04.50/0. Disponível em: <https://doi.org/0013-936X/94/0928-0753S04.50/0>.

LEHNINGER, A. L.; Nelson D. L.; Cox M. M. Principles of Biochemistry – Fifth Edition. New York: Freeman, 2008, 1158p.

LEI, L. *et al.* Development of Time-Resolved Fluoroimmunoassay for Detection of Cylindrospermopsin Using Its Novel Monoclonal Antibodies. **Toxins**. 10, 255. 1 - 13. 2018. DOI 10.3390/toxins10070255. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins10070255>.

LI, Y. *et al.* A cross-sectional investigation of chronic exposure to micro-cystin in relationship to childhood liver damage in the Three Gorges Reservoir Region, China. **EnvironHealth Perspect**. 119(10), 1483–1488. 2011. DOI: 1289/ehp.1002412. Disponível em: <https://doi.org/1289/ehp.1002412>.

LIAO, M.; YU, G.; GUO, Y. Eutrophication in Poyang Lake (Eastern China) over the Last 300 Years in Response to Changes in Climate and Lake Biomass. **PLoS ONE**. 12(1), e0169319. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0169319. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169319>

LLEWELLYN, L. E. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. **Nat Prod Rep**. 23(2), 200-222. 2006. DOI10.1039/b501296c. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b501296c>

LOUZAO, M.C. *et al.* A fluorimetric microplate assay for detection and quantitation of toxins causing paralytic shellfish poisoning. **Chem. Res. Toxicol**. 16, 433 - 438. 2003. DOI 10.1021/tx025574r. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/tx025574r>.

MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W. The pharmacology of anatoxina(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Toxicon**. 24(5), 425-434. 1986. DOI 10.1016/0041-0101(86)90074-7. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90074-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90074-7)

MANTZOUKI, E. *et al.* Understanding the key ecological traits of cyanobacteria as a basis for their management and control in changing lakes. **Aquat Ecol**. 50, 333–350. 2016. DOI: 10.1007/s10452-015-9526-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10452-015-9526-3>

MARINS, K. **Alterações bioquímicas, genotóxicas e comportamentais em peixes-zebra (*Daniorerio*) decorrentes da exposição a metais pesados presentes em águas subterrâneas**. 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Comunitária da Região de Chapecó. Chapecó, 2018. Disponível em: <http://konrad.unochapeco.edu.br:8080/pergamumweb/vinculos/000101/0001016c.pdf>

MAZUR-MARZEC, H. *et al.* Baltic cyanobacteria – a source of biologically active compounds. **European Journal of Phycology**. 50 (3), 343-360. 2015. DOI:10.1080/09670262.2015.1062563. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1062563>

McELHINEY, J. *et al.* Rapid Isolation of a Single-Chain Antibody against the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR by Phage Display and Its Use in the Immunoaffinity Concentration of Microcystins from Water. **Applied and Environmental Microbiology**. 68 (11), 5288 - 5295. 2002. DOI 10.1128/AEM.68.11.5288–5295.2002. Disponível em

<https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5288-5295.2002>.

MEHINTO, A. C. *et al.* Synthesis of ecotoxicological studies on cyanotoxins in freshwater habitats – Evaluating the basis for developing thresholds protective of aquatic life in the United States. **Science of the Total Environment**. 795, 148864. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148864>

MELEGARI, S. P. *et al.* Induction to oxidative stress by saxitoxin investigated through lipid peroxidation in Neuro 2A cells and Chlamydomonas reinhardtii alga. **Chemosphere**. 89(1), 38-43. 2012. DOI 10.1016/j.chemosphere.2012.04.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.009>

MELLO, F. D. *et al.* Mechanisms and Effects Posed by Neurotoxic Products of Cyanobacteria/Microbial Eukaryotes/Dinoflagellates in Algae Blooms: a Review. **Neurotox Res**. 33 (1), 153-167. 2017. DOI: 10.1007/s12640-017-9780-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9780-3>.

MENDES, C. M. **Purificação e caracterização físico-química da tripsina do peixe-zebra (Daniorerio)**. 2016. 42 f. Monografia (Bacharel em Biotecnologia). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2016. Disponível em: <http://www.cbiotec.ufpb.br/ccbiotec/contents/tccs/2015.2/2015-2-cayro-macedo-mendes.pdf>

MEREL, S. *et al.* State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **EnvironmentInternational**. 59, 303-327. 2013. DOI 10.1016/j.envint.2013.06.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>.

MEYERS, J. R. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. **Current Protocols in Essential Laboratory Techniques**. 16 (1). 2018. DOI:10.1002/cpet.19. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cpet.19>.

MIGLIONE, A.; NAPOLETANO, M.; CINTI, S. Electrochemical Biosensors for Tracing Cyanotoxins in Food and Environmental Matrices. **Biosensors**. 315-2021. DOI: 10.3390/bios11090315. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bios11090315>.

MORAES, A. C.N. and MAGALHÃES, V. F. Renal tubular damage caused by cylindrospermopsin (cyanotoxin) in mice. **Toxicology Letters**. 286, 89-95. 2018. DOI:10.1016/j.toxlet.2017.12.028. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.028>

MORENO, D. H. *et al.* Brain biomarkers in tench (Tincatinca L.) after semi-static exposure to the pesticide carbofuran. **Rev. Colomb. Cienc. Pecu.** 32(3), 232-244. 2019. DOI:0.17533/udea.rccp.v32n3a08. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v32n3a08>

MORENO, I. *et al.* Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. **Toxicon**. 45, 395-402. 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.11.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.11.001>.

MOTA, W. M. *et al.* Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu. 14 (4), 624-628. 2012. DOI 10.1590/S1516-05722012000400008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400008>

MSAGATI, T. A. M.; SIAME, B. A.; SHUSHU, D. D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**. 78 (4), 382-397. 2006. DOI 10.1016/j.aquatox.2006.03.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.011>.

MUNOZ, M. *et al.* Degradation of widespread cyanotoxins with high impact in drinking water (microcystins, cylindrospermopsin, anatoxin-a and saxitoxin) by CWPO. **Water Research**. 163, 1-10. 2019. DOI 10.1016/j.watres.2019.114853. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114853>

MURI, G. *et al.* Factors that contributed to recent eutrophication of two Slovenian mountain lakes. **Journal of Paleolimnology**. 2018. DOI 10.1007/s10933-017-9996-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10933-017-9996-5>.

NAGARAJAN, M. *et al.* A review of pharmaceutical toxicological potential of marine cyanobacterial metabolites. **Journal of Applied Toxicology**. 32, 153-185. 2012. DOI: 10.1002/jat.1717

NAGATA, S. *et al.* Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. **Natural Toxins**. 3 (2), 78 - 86. 1995. DOI 10.1002/nt.2620030204. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/nt.2620030204>.

NDLELA, L. L. *et al.* An overview of cyanobacterial bloom occurrences and research in Africa over the last decade. **Harmful Algae**. 60, 11-26. 2016. DOI:10.1016/j.hal.2016.10.001 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.10.001>.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

OKSANEN, J. *et al.* *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-2. 2018. Available at <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

OKUMURA, M., TSUZUKI, H., TOMITA, B. A rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins by cell bioassay. **Toxicon**. 46, 93 - 98. 2005. DOI 10.1016/j.toxicon.2005.03.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.018>.

OLIVEIRA, V. M., ASSIS, C. R. D., BEZERRA, R. S. Fish Digestive Hydrolase: Biochemical, Physiological And Biotechnological Aspects. **REB**. 7 (3), 330-341. 2014. ISSN 1983-7682

OLIVEIRA, V. M. *et al.* Aluminium sulfate exposure: A set of effects on hydrolases from brain, muscle and digestive tract of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 191, 101-108. 2017. DOI: 10.1016/j.cbpc.2016.10.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.10.002>

O'NEILL, K.; MUSGRAVE, I. F.; HUMPAGE, A. Low dose extended exposure to saxitoxin and its potential neurodevelopmental effects: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 48, 7-16. 2016. DOI 10.1016/j.etap.2016.09.020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.020>

PAERL, H. W. *et al.* Mitigating a global expansion of toxic cyanobacterial blooms: confounding effects and challenges posed by climate change. **Marine and Freshwater Research**. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/MF18392>

PAPADIMITRIOU, T. *et al.* Cyanotoxins as the “common suspects” for the Dalmatian pelican (*Pelecanus crispus*) deaths in a Mediterranean reconstructed reservoir. **Environmental Pollution**. 234, 779-787. 2018. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.022>

PATEL, S. A critical review on serine protease: key immune manipulator and pathology mediator. **Allergol. Immunopathol.** 45 (1), 1-13. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2016.10.011>.

PEARSON, L. A. *et al.* The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. **Harmful Algae**. 54, 98 - 111. 2016. DOI 10.1016/j.hal.2015.11.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.002>.

PEREIRA, A. G. *et al.* Low-concentration exposure to glyphosate-based herbicide modulates the complexes of the mitochondrial respiratory chain and induces mitochondrial hyperpolarization in the *Danio rerio* brain. **Chemosphere**. 209, 353- 362. 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.06.075. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.075>.

PICARDO, M. *et al.* Recent advances in the detection of natural toxins in freshwater environments. **Trends in Analytical Chemistry**. 112, 75-86. 2019. DOI 10.1016/j.trac.2018.12.017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.017>.

PONIEDZIAŁEK, B.; RZYMSKI, P.; KOKOCIŃSKI, M. Cylindrospermopsin: water-linked potential threat to human health in Europe. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34, 651-660. 2012. DOI 10.1016/j.etap.2012.08.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.08.005>

PONIEDZIAŁEK, B.; RZYMSKI, P.; WIKTOROWICZ, K. Toxicity of cylindrospermopsin in human lymphocytes: proliferation, viability and cell cycle studies. **Toxicol In Vitro** 28(5), 968-974. 2014. DOI 10.1016/j.tiv.2014.04.015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.04.015>.

PONIEDZIAŁEK, B.; RZYMSKI, P.; KARCZEWSKI, J. The role of the enzymatic antioxidant system in cylindrospermopsin-induced toxicity in human lymphocytes. **Toxicol In Vitro**. 29(5), 926-932. 2015. DOI 10.1016/j.tiv.2015.03.023. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.023>.

POURIA, S. *et al.* Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**. 352, 21-26. 1998. DOI 10.1016/s0140-6736(97)12285-1. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)12285-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)12285-1).

PREECE, E. P. *et al.* A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters:

Environmental implications and human health risk. *Harmful Algae*. 61, 31-45. 2017. DOI: 10.1016/j.hal.2016.11.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.006>

PREUSSEL, K. *et al.* First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. **Toxicon**. 47, 156-162. 2006. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.10.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.10.013>

PUERTO, M. *et al.* Acute effects of pure cylindrospermopsin on the activity and transcription of antioxidant enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed by gavage. **Ecotoxicology**. 20, 1852-1860. 2011. DOI 10.1007/s10646-011-0723-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0723-0>.

PUERTO, M. *et al.* Mutagenic and genotoxic potential of pure Cylindrospermopsin by a battery of *in vitro* tests. **Food Chem. Toxicol.** 121, 413-422. 2018. DOI 10.1016/j.fct.2018.09.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.013>

QIAN, H. *et al.* Developmental neurotoxicity of *Microcystis aeruginosa* in the early life stages of zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 151, 35-41. 2018. DOI 10.1016/j.ecoenv.2017.12.059. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.059>

QUIÑONES-REYES, G. *et al.* Synthetic Haptens and Monoclonal Antibodies to the Cyanotoxin Anatoxin-a. **Angew. Chem. Int. Ed.** 2019, 58, 9134 – 9139. DOI 10.1002/anie.201904002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.201904002>.

QIAO, Q. *et al.* Subcellular localization of microcystin in the liver and the gonads of medaka fish acutely exposed to microcystin-LR. **Toxicon**. 159, 14-21. 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.12.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.12.006>

RAO, P. L. *et al.* Involvement of caspase and reactive oxygen species in cyanobacterial toxin anatoxin-a-induced cytotoxicity and apoptosis in rat thymocytes and Vero cells. **Arch Toxicol** 76(4), 227-235. 2002. DOI 10.1007/s00204-002-0330-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0330-1>.

RAPALA, J. *et al.* First report of saxi-toxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. **Environ Toxicol.** 20(3), 331-340. 2005. DOI: 10.1002/tox.20109. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.20109>

REECE, J. B. **Biologia de Campbell**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 1488 p.

REIS, D. T. C. **Purificação e caracterização de proteases digestivas tripsina-like do intestino de lagarta da soja, envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/293>

ROCHA-FILHO, J. A.; VITOLLO, M. **Guia para Aulas Práticas de Biotecnologia de Enzimas e Fermentação**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2017. 168p.

RUTKOWSKA, M. *et al.* Recent trends in determination of neurotoxins in aquatic environmental samples. **TrAC - Trends Anal. Chem.** 112, 112-122. 2019. DOI 10.1016/j.trac.2019.01.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.001>.

SALMASO, N. *et al.* Basic guide to detection and monitoring of potentially toxic cyanobacteria. **Handb. Cyanobacterial Monit. Cyanotoxin Anal.** 6, 46-69. 2017. DOI 10.1002/9781119068761.ch6. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch6>

SANSEVERINO, I. Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection. **JRC Technical Reports.** EUR-28624 EN. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2760/36186>.

SANTOS, J. F. *et al.* Digestive enzyme activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) submitted to different dietary levels of shrimp protein hydrolysate. **Aquaculture International.** 21, 563-577. 2013. DOI 10.1007/s10499-012-9589-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9589-2>

SANTOS, C. W. V. **Purificação e caracterização de tripsina a partir do ceco-pilórico do pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).** 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2016. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/2725>

SCARLLET, K. R. *et al.* Global scanning of cylindrospermopsin: Critical review and analysis of aquatic occurrence, bioaccumulation, toxicity and health hazards. *Sci. Total Environ.* 10. 738-139807.2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139807. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139807>

SILVA, M. R. F. *et al.* Biomarkers as a tool to monitor environmental impact on Aquatic Ecosystems. **Brazilian Journal of Development.** 6 (10), 75702-75720. 2020. DOI:10.34117/bjdv6n10-120. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-120>

SILVA, R. C. *et al.* Cylindrospermopsin effects on cell viability and redox milieu of Neotropical fish *Hoplias malabaricus* hepatocytes. **Fish Physiology and Biochemistry.** 43, 1237-1244. 2017. DOI: 10.1007/s10695-017-0367-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0367-y>

SMITH, Z. J. *et al.* Limnological Differences in a Two-Basin Lake Help to Explain the Occurrence of Anatoxin-a, Paralytic Shellfish Poisoning Toxins, and Microcystins. **Toxins.** 559 (12), 2020. DOI 10.3390/toxins12090559. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins12090559>.

SOMAN, S. K. *et al.* Restriction of mitochondrial calcium overload by mcu inactivation renders a neuroprotective effect in zebrafish models of Parkinson's disease. **Biology Open.** 8 (10), 1-12. 2019. DOI 10.1242/bio.044347. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/bio.044347>

SONG, C., KANTHASAMY, A., KANTHASAMY, A. Chapter 63 – Cell signaling mechanisms in developmental neurotoxicity. In: *Reproductive and Developmental Toxicology.* Academic Press. San Diego, 835-845. 2011.

SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**. 83. 13-34. 2008. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>

SPIVAK, C. E. Anatoxin-a: a novel, potent agonist at the nicotinic receptor. **Mol. Pharmacol.** 19 (3), 384-394. 1980. PMID: 6970328.

SPOOF, L. & CATHERINE, A. Appendix 3: tables of microcystins and nodularins. Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 526-537. 2017.

SU, Z. *et al.* Saxitoxin blocks L-type ICa. **J Pharmacol Exp Ther.** 308, 324-329. 2004. DOI 10.1124/jpet.103.056564. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.103.056564>.

SVIRČEV, Z.; DROBAC, D.; TOKODI, N.; MIJOVIĆ, B.; CODD, G. A.; MERILUOTO, J. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. **Archives of toxicology**. 91 (2), 621-650. 2017. DOI: 10.1007/s00204-016-1921-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1921-6>

TEIXEIRA, M. G. L. C. *et al.* Epidemia de gastroenterite na área da barragem de Itaparica, Bahia. **Boll. Sait. Panam.** 114 (6), 502-511. 1993. DOI 10665.2/16355. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/16355>

TESTAI, E. *et al.* Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. **EFSA Support. Publ.** 13 (2), 309. 2016. DOI 10.1007/978-0-387-75865-7_32. EN-998. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_32. EN-998.

THOMAS, P. *et al.* (+)-Anatoxin-a is a potent agonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **J Neurochem.** 60(6):2308-2311. 2006. DOI 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03519.x. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03519.x>.

TRIGUEIRO, N. S.S. *et al.* Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research in Brazil. **Zebrafish**. 2020. DOI: 10.1089/zeb.2020.1930. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1930>.

TURNER, A.D. *et al.* Comparison of AOAC 2005.06 LC official method with other methodologies for the quantitation of paralytic shellfish poisoning toxins in UK shellfish species. **Anal. Bioanal. Chem.** 399, 1257 - 1270. 2011. DOI 10.1007/s00216-010-4428-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4428-7>.

U.S. EPA, Revisions to the Unregulated Contaminant Monitoring Rule (UCMR 4) for public water systems and announcement of a public meeting 40 CFR Part 121, Fed. Regist. 80 (2015) 76897-76923. <https://federalregister.gov/a/2015-30824>.

U.S.EPA, Drinking Water Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination, 2016 <https://www.epa.gov/ccl>.

VAN DOLAH, F.M. *et al.* Determination of paralytic shellfish toxins in shellfish by receptor binding assay: collaborative study. **Journal of AOAC International**. 95 (3), 795 - 812. 2012.

DOI 10.5740/jaoacint.CS2011_27. Disponível em:
https://doi.org/10.5740/jaoacint.CS2011_27

VELKI, M. *et al.* Enzymatic activity and gene expression changes in zebrafish embryos and larvae exposed to pesticides diazinon and diuron. **Aquatic Toxicology**. 193, 187-200. 2017. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.10.019 Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.019>

VINUTHA, B. *et al.* Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. 109, 359-63. 2007. DOI 10.1016/j.jep.2006.06.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.06.014>.

VOET, D. *et al.* **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed editora S.A., 2008. 1264 p.

VOGIAZI, V. *et al.* A Comprehensive Review: Development of Electrochemical Biosensors for Detection of Cyanotoxins in Freshwater. **Acs. Sensors**. 4, 1151 - 1173. 2019. DOI 10.1021/acssensors.9b00376. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00376>.

WADA, A. Roles of voltage-dependent sodium channels in neuronal development, pain, and neurodegeneration. **J Pharmacol Sci**. 102(3), 253-268. 2006. DOI 10.1254/jphs.CRJ06012X. Disponível em: <https://doi.org/10.1254/jphs.CRJ06012X>

WALKER, C. H. Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals. **Environmental Health Perspectives**. 106(SUPPL. 2), 613-620. 1998. DOI: 10.1289/ehp.98106613. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.98106613>

WALTER, J. M. *et al.* Occurrence of Harmful Cyanobacteria in Drinking Water from a Severely Drought-Impacted Semi-arid Region. **Frontiers in Microbiology**. 9, 176. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00176. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00176>

WANG, Q. *et al.* An improved functional assay for rapid detection of marine toxins, saxitoxin and brevetoxin using a portable cardiomyocyte-based potential biosensor. **Biosens. Bioelectron**. 72, 10 - 17. 2015. DOI 10.1016/j.bios.2015.04.028. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.028>.

WANG, X. *et al.* Role of nitric oxide in the genotoxic response to chronic microcystin-LR exposure in human–hamster hybrid cells. **Journal of Environmental Sciences**. 29, 210-218. 2015. DOI 10.1016/j.jes.2014.07.036. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.07.036>

WARNER, A. H. Proteases and protease inhibitors in *Artemia* and their role in the developmental process. In: *Biochemistry and Cell Biology of Artemia*. CRC Press, 2017. p. 113-132.

WEISBROD, A. V. *et al.* Workgroup report: review of fish bioaccumulation databases used to identify persistent, bioaccumulative, toxic substances. **Environmental Health Perspectives**. 115 (2), 255-261. 2007. DOI: 10.1289/ehp.9424. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.9424>

WEN, C. *et al.* Effects of microcystins-LR on genotoxic responses in human intestinal epithelial cells (NCM460). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.** 82:21, 1113-1119. 2019. DOI: 10.1080/15287394.2019.1698498. Disponívelem: <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1698498>

WESTHOLM, D. E. *et al.* Competitive inhibition of organic anion transporting polypeptide 1c1-mediated thyroxine transport by the fenamate class of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Endocrinology.** 150(2),1025-1032. 2009. DOI 10.1210/en.2008-0188. Disponívelem: <https://doi.org/10.1210/en.2008-0188>.

WHO, Guidelines for Drinking-Water Quality, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011.

WOOD, R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature. **EnvironmentInternational.** 91, 276-282. 2016. DOI 10.1016/j.envint.2016.02.026. Disponívelem: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.026>

WU, J. X. *et al.* Gastrointestinal toxicity induced by microcystins. Gastrointestinal toxicity induced by microcystins. **World Journal Clinical Cases.** 6 (10), 344-354. 2018. DOI: 10.12998/wjcc.v6.i10.344. Disponívelem: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v6.i10.344>.

WU, Q. *et al.* Microcystin-LR exposure induces developmental neurotoxicity in zebrafish embryo. **Environmental Pollution.** 213, 793-800. 2016. DOI:10.1016/j.envpol.2016.03.048 Disponívelem: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.048>

WU, Q. *et al.* Parental transfer of microcystin-LR induced transgenerational effects of developmental neurotoxicity in zebrafish offspring. **EnvironPollut.** 231, 471-478. 2017. DOI:10.1016/j.envpol.2017.08.038. Disponívelem: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.038>

YAN, W. *et al.* Microcystin-LR induces changes in the GABA neurotransmitter system of zebrafish. **AquaticToxicology.** 188, 170-176. 2017. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.05.006 Disponívelem: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.006>

YANG, F. *et al.* Purification and characterization of chymotrypsins from the hepatopancreas of crucian carp (*Carassius auratus*). **Food Chemistry.** 116, 860-866. 2009. DOI 10.1016/j.foodchem.2009.03.035. Disponívelem: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.035>

YANG, G. *et al.* Variations of enzymatic activity and gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos co-exposed to zearalenone and fumonisin B1. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 222, 112533. 2021. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112533 Disponívelem: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112533>

ŽEGURA, B. *et al.* Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. **Toxicon.** 58, 471-479. 2011. DOI 10.1016/j.toxicon.2011.08.005. Disponívelem: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.08.005>.

ŽEGURA, B.; STRASER, A.; FILIPIČ, M. Genotoxicity and potencial carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. **Mutat. Res.** 727 (1-2), 16-41. 2011. DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.01.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.01.002>.

ZEGURA, B. An Overview of the Mechanisms of Microcystin-LR Genotoxicity and Potential Carcinogenicity. **Mini-Reviewa in Medicinal Chemistry.** 16, 1042-1062. 2016. DOI 10.2174/1389557516666160308141549. Disponívelem: <https://doi.org/10.2174/1389557516666160308141549>.

ZHAO, C.S. *et al.* Predicting cyanobacteria bloom occurrence in lakes and reservoirs before blooms occur. **Sci. Total Environ.** 670, 837-848. 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.161 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.161>.

ZHONG, Y. *et al.* Neurotoxic Anatoxin-a Can Also Exert Immunotoxicity by the Induction of Apoptosis on *Carassius auratus* Lymphocytes *in vitro* When Exposed to Environmentally Relevant Concentrations. **Front. Physiol.** 11, 316. 2020. DOI: 10.3389/fphys.2020.00316. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00316>

ZHOU, L. *et al.* Extraction, Purification and Characterization of Fish Chymotrypsin: A Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology.** 7, 104-123. 2011. DOI 10.4172/2157-7110.1000126. Disponívelem: <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000126>

ZHOU, Y. *et al.* Characterization of In Vitro Effects of Microcystin-LR on Intestinal Epithelial Cells. **Environmental Toxicology.** 32 (5), 1539-1547. 2017. DOI:10.1002/tox.22375. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.22375>

ZHOU, Z. *et al.* Comparative studies of saxitoxin (STX) -induced cytotoxicity in Neuro-2a and RTG-2 cell lines: An explanation with respect to changes in ROS. **Chemosphere.** 192, 66-74. 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.083. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.083>

ANEXO A- SÚMULA CURRICULAR

- Participação no curso à distância **Agência de Água: O que é, o que faz e como funciona**, promovido pela Agência Nacional de Águas - ANA, com carga horária de 30 horas. (Ano 2020);
- Participação no curso à distância **Hidrologia Geral**, promovido pela Agência Nacional de Águas - ANA, com carga horária de 40 horas. (Ano 2020);
- Participação no curso à distância **Monitoramento da Qualidade da Água de Rios e Reservatórios**, promovido pela Agência Nacional de Águas - ANA no período de 01/04/2020 a 20/05/2020, com carga horária de 40 horas.
- Participação no curso à distância **Planejamento, Manejo e Gestão de Bacias**, promovido pela Agência Nacional de Águas - ANA, com carga horária de 40 horas.
- Participação no curso à distância **Qualidade da Água em Reservatórios**, promovido pela Agência Nacional de Águas - ANA no período de 01/04/2020 a 20/05/2020, com carga horária de 60 horas.
- Participação no **I Curso Internacional sobre Comunidades de Algas Continentais**, promovido pelo Departamento de Biologia Animal e Vegetal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, realizado de 28 de setembro a 9 de outubro de 2020, totalizando 60 horas;
- Publicação do artigo **Submerged macrophyte support cyanobacteria and microcystin production in a drawdown tropical semiarid reservoir**, na revista *Aquatic Ecology*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10452-021-09866-1>
- Publicação do artigo **The reduction in water volume favors N-fixing cyanobacteria and heterocyst production in semi-arid tropical reservoirs, without the influence of the N:P ratio**, na revista *Science of the Total Environment*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151584>
- Participação no **I Encontro de Ecologia Neotropical: Implicações para a Conservação em Tempos de Mudanças Climáticas**, que ocorreu de 02 a 06 de Agosto de 2021, com carga horária de 20h (vinte horas).

ANEXO B- AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 30 de outubro de 2019

Ofício nº 93/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Ranison de Souza Bezerra**
 Departamento de Bioquímica
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 104/2019

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos de cianotoxinas sobre a histologia, hidrolases e geração de estresse oxidativo em peixes-zebra (danio rerio)”, registrado com o 104/2019 sob a responsabilidade de **Prof. Ranison de Souza Bezerra** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 29/10/2019

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Novembro 2019 a dezembro/2021
Espécie/linhagem/raça	Peixe-zebra
Nº de animais	600
Peso/idade	96hrs (embriões) / 14 dias contínuos (adultos)
Sexo	Fêmea (600)
Origem: Biotério de Criação	Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica e Biofísica da UFPE. Laboratório de Fisiologia comparada e comportamento Animal do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica e Biofísica da UFPE e Laboratório de Fisiologia comparada e comportamento Animal do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE

Atenciosamente

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

