UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Investigação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos em organismos expostos a anatoxina-a(s)

Vania Cristina Rodríguez Salazar

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo
2011

Vania Cristina Rodríguez Salazar

Investigação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos em organismos expostos a anatoxina-a(s)

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ernani Pinto
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, 25 de fevereiro de 2011.

"Um pessimista vê uma dificuldade em toda oportunidade;
um otimista vê uma oportunidade em toda dificuldade".
(Winston Churchill)

DEDICATÓRIA

*À **Deus** por ter me dado forças e perseverança...*

*Aos meus amados pais, **Saúl** e **Cristina**, por ser o meu exemplo de vida, honestidade e pelo contínuo incentivo.*

*Aos meus irmãos **Claudia**, **Marina** e **Lito** pelo carinho e apoio incondicionais.*

*As minhas avós **Leonor** e **Lolita** e a toda minha família na Bolívia. A saudade por vocês me faz amá-los cada dia mais.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Prof. Dr. **Ernani Pinto**, pela competência científica, respeito e carinho ao longo destes anos. As suas sábias palavras me encorajaram para enfrentar cada desafio com mais confiança.

À Coordenação de Amparo de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de doutorado e doutorado-sanduíche concedidas (CAPES-PROBRAL) e pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

Ao corpo docente do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas pelos valiosos conselhos e conhecimento transmitido.

Aos professores Dra. Helenice de Souza Spinosa, Dr. Luiz Carlos de Sá e Dra. Elizabeth de Souza Nascimento, pelas preciosas sugestões no exame de qualificação.

À Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa pela competência científica, paciência e disponibilidade em todos os momentos que a procurei, bem como pelas críticas, correções e sugestões.

À Profa. Dra. Tânia Marcourakis pela amizade, competência científica e disponibilidade para discussão dos resultados enzimáticos deste trabalho. O seu aporte foi de grande valia.

Ao Prof. Dr. Maurício Yonamine pela amizade, confiança e exemplo de integridade em todos os momentos.

Aos colegas e amigos que estão ou que já passaram pelo Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA): Fabyana, Sidnei, Paula, Humberto, Meron, Vanessa, Raphael, Sara, Fabiana, Ariane, Stella, Mariah, Natalia, Felipe, Fabiane, Barbara, Bruno, Ronaldo, Diogo, Bruna, Luana e Regiane por terem sido a minha família brasileira ao longo de todos esses anos.

Aos meus queridos “pupilos” da Iniciação Científica Ariane, Bruno e Barbara pelo auxílio e amizade nas diversas etapas deste trabalho.

A todos os pós-graduandos do Programa de Toxicologia e Análises Toxicológicas da FCF-USP e do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, que contribuíram em alguma etapa deste trabalho, seja no ensinamento para a utilização de equipamentos ou pela ajuda direta nos experimentos. Em especial Carolina Dizioli, Raphael Caio, Larissa Lobo, Alison, Thiago, Thaísa e Sayuri.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo pela disponibilização do seu laboratório para etapas importantes do trabalho.

Aos meus queridos amigos Sidnei e Fabyana, por terem me oferecido mais que amizade, carinho, paciência e suporte emocional nas horas mais difíceis. Os laços que fizemos perdurarão para sempre, sem importar onde estivermos.

Aos amigos que fiz durante a minha estadia em Portugal e na Alemanha, Prof. Dr. Bernd Luckas, Prof. Dr. Pflugmacher, Bernd, Zélia, Amélia, Denise, Guilherme, Silvia, Smith, Gláucio, Thomas e Anja, por me acolherem e ajudarem nos experimentos realizados.

A minha querida tia Charo, embora não esteja mais presente, por ter sido a minha primeira incentivadora à leitura e à reflexão.

Aos meus amigos do “Solar dos Príncipes” Fabriciano, Daniel, Tiago Peixe, Thiago e Rodrigo pela amizade e momentos de descontração.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, Claudia, Hercula, Idalina e Rosiris, pelos cuidados dispensados aos animais utilizados neste trabalho, pelo auxílio e ótima convivência.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da FCF-USP, Sueli, Edna, Ana, Jorge e Elaine por estarem sempre prestes a esclarecer dúvidas e pela ajuda inestimável.

Aos meus tios Hector, Yolanda e família (Anjo, Cris, Ameriney e Mayarinha), por terem me acolhido em GO e sempre estarem presentes quando precisei.

Ao meu primo Nelson e família pelo constante apoio.

As minhas queridas amigas, Marita, Charito e Patty pelo carinho e irmandade apesar da distância.

Aos amigos Terezinha, Vavá e Luciana, por serem anjos que apareceram no meu caminho na hora certa.

A todos os que tal vez não mencionei, mas que foram muito importantes na luta diária para atingir esta meta.....

Meus agradecimentos

RESUMO

Investigação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos em organismos expostos a anatoxina-a(s)

A anatoxina-a(s) (antx-a(s)) é uma neurotoxina produzida por cianobactérias, cujo mecanismo de ação conhecido consiste na inibição irreversível da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Em razão da instabilidade da molécula e da inexistência de um padrão analítico, as informações referentes a presença dessa toxina nos reservatórios de água doce e, a completa elucidação dos processos envolvidos na sua toxicidade, são escassas.

Na última década, a pesquisa referente a capacidade dos inseticidas organofosforados de induzir estresse oxidativo em humanos e animais tem sido bastante importante. Pelo fato da antx-a(s) ser o único organofosforado produzido por cianobactérias conhecido, este trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos bioquímicos envolvidos na ação pró-oxidante de extratos aquosos contendo antx-a(s). A atividade das enzimas colinesterásicas AChE e butirilcolinesterase (BuChE) e, das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) foram avaliadas em dois modelos experimentais: (i) Camundongos *Swiss* tratados por via intraperitoneal (ip) com uma dose sub-letal (20 $mg.kg^{-1}$) de extrato contendo antx-a(s) e sacrificados após 24 h, 48 h, 7 e 14 dias e, (ii) sementes de alfafa regadas com extrato contendo antx-a(s) por um período de 7 dias. Também foi avaliado o efeito de extratos contendo antx-a(s) em coração de baratas da espécie *Leurolestes circunvagans*.

A atividade enzimática das colinesterases avaliadas em camundongos tratados com extrato contendo antx-a(s) manteve-se inibida 58% até 48 h após tratamento ($n=9$, $p<0,001$), voltando a níveis normais (comparada ao controle) a partir do sétimo dia ($n=10$, $p>0,05$). Em contraposição, as alterações na atividade das enzimas antioxidantes avaliadas iniciaram-se após 48 h do tratamento, quando foi observada uma diminuição na atividade das enzimas CAT e GPx ($n=9$, $p<0,001$). No sétimo dia, enquanto a atividade das enzimas CAT e GR apresentou-se aumentada, a atividade da enzima GPx manteve-se significantemente diminuída ($n=10$, $p<0,001$). A SOD não mostrou diferença estatística significante em nenhum dos tratamentos. A atividade de todas as enzimas avaliadas voltou a normalidade após 14 dias.

O desequilíbrio encontrado na atividade das enzimas antioxidantes em camundongos tratados com extrato contendo antx-a(s), também foi observado em sementes de alfafa. Neste último modelo de exposição, além da diminuição da atividade da enzima GPx ($n=5$, $p<0,01$) houve um aumento na atividade da enzima glutationa transferase (GST) com relação ao controle ($n=5$, $p<0,05$).

Com relação ao efeito do extrato contendo antx-a(s) sobre a preparação de coração semi-isolado de baratas, observou-se um efeito taquicardíaco significante (aumento da frequência em quase 20%) nos animais tratados com $2,5x10^3$ µg de extrato contendo antx-a(s).g^{-1} ($n=9$, $p<0,05$).

A partir destes resultados, pôde-se concluir que o extrato contendo antx-a(s) apresentou capacidade pró-oxidante em ambos os modelos avaliados (camundongo e semente) induzindo alterações na atividade das enzimas antioxidantes. Assim também, este extrato mostrou exercer um efeito cardiotóxico em baratas.

Palavras chaves: Cianotoxinas. Anatoxina-a(s). Organofosforados. Acetilcolinesterase. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Study of the biochemical and physiologycal mechanisms in organisms exposed to anatoxin-a(s)

Anatoxin-a(s) (antx-a(s)) is a cyanobacterial neurotoxin whose principal mechanism of action is the irreversible inhibition of the enzymatic activity of acetylcholinesterase (AChE). Because of the molecule´s instability and the lack of an analytical standard, the occurrence of this toxin in freshwater reservoirs and the knowledge of the whole events related to its toxicity are scarce.

In the last decade, research related to organophosphates insecticides capability to induce oxidative stress in humans and animals has been profuse. Considering that antx-a(s) is the unique organophosphate produced by cyanobacteria currently known; the main of this work was to investigate the biochemical mechanism related to the pro-oxidant capacity of antx-a(s)-containing extracts. In order to achieve the objective, there was determined the activity of cholinesterasic and antioxidant enzymes such as acetylcholinesterase (AChE), butirylcholinesterase (BuChE), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD). Two experimental models were used: (i) *Swiss* mice were treated intraperitoneally (ip) with 20 $mg.kg^{-1}$ of antx-a(s)-containing extract and sacrificed after 24 h, 48 h, 7 and 14 days of treatment and, (ii) alfalfa seeds were irrigated with antx-a(s)-containing extract for 7 days. Additionally, the cardiac effect of antx-a(s)-containing extract on *Leurolestes circunvagans* cockroach was evaluated.

The AChE and BuChE activity in mice treated with antx-a(s)-containing extract stayed inhibited more than 55% during 48 h (n=9, p<0,001). Normal activity of both enzymes was observed after seven days of treatment. By the other hand, changes in the antioxidant enzymes activity only began after the second day of treatment. Initially, both CAT and GPx showed lower activity than the control group after 48 h. Among those enzymes, GPx showed the highest decreased activity (n=9, p<0,001). After seven days, while the antx-a(s)-containing extract promoted increasing of CAT and GR activity, GPx activity remained deeply decreased (n=10, p<0,01). SOD activity did not show any statistical difference related to the control during all the treatments. Activity of all the evaluated enzymes was completely recovered after fourteen days.

A similar unbalance on the antioxidant enzymes activity was provoked by the extract containing antx-a(s) in seeds irrigated with the extract. The seeds' GPx activity showed low level (n=5, p<0,01), while GST activity was higher than the control (n=5, p<0,05).

Regarding the cardiac effect of antx-a(s)-containing extract on semi-isolated cockroach heart, significant tachycardia (increase of almost 20% of the heartbeat frequency) was observed on the animals treated with $2,5x10^3$ $\mu g.g^{-1}$ (n=9, p<0,05).

From the obtained results, it can be concluded that the antx-a(s) extract demonstrated its pro-oxidant capacity in both experimental models evaluated (mice and seeds). This fact was proved through the unbalance on the activity of the antioxidant enzymatic defense system. Furthermore, the antx-a(s)-containing extract provoked a cardiotoxic effect on cockroach.

Keywords: Cyanotoxins. Anatoxin-a(s). Organophosphates. Acetylcholinesterase. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia básica das cianobactérias.....27

Figura 2. Estrutura química das anatoxinas: (1) anatoxina-*a*, (2) homoanatoxina-*a*, (3) anatoxina-a(s).....34

Figura 3. Rota de biossíntese da anatoxina-a(s) proposta por Shimizu (1996).....36

Figura 4. Esquema simplificado de uma sinapse neuromuscular estriada mostrando os componentes e as etapas envolvidas no processo de contração muscular.....39

Figura 5. Hidrólise da anatoxina-a(s) produzida pela acetilcolinesterase. Mecanismo proposto por HYDE & CARMICHAEL (1991).....41

Figura 6. (A) Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pelas colinesterases. (B) Mecanismo de inibição de uma colinesterase por um inseticida organofosforado. (Adaptado de MÍDIO & SOARES, 1995).....45

Figura 7. Reações químicas catalizadas pelas principais enzimas de defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx e GR) responsáveis pelo controle dos níveis das espécies reativas de oxigênio e GSH e reação de Fenton.....51

Figura 8. Sistema de cultura das linhagens de *Anabaena spiroides* em incubadora com temperatura e luz controlada.....60

Figura 9. Reticulo da câmara de Neubauer com os quatro quadrantes das extremidades onde foi realizada a contagem dos filamentos destacados em círculos vermelhos.....61

Figura 10. Reações envolvidas na determinação da AChE pelo método de Ellman.....69

Figura 11. Arena de Campo Aberto utilizada para a observação da atividade locomotora individual de camundongos *Swiss* e equipamento utilizado para análise de dados.....73

Figura 12. Ilustração esquemática da arena do Campo Aberto subdividida em zonas central, média e periférica.....74

Figura 13. Plataforma do Labirinto em Cruz Elevado.....75

Figura 14. Ilustração esquemática da arena do labirinto em cruz elevado subdivida em zona central, braços abertos e fechados.....76

Figura 15. Esquema do acoplamento das reações catalisadas pelas enzimas GPx e GR.....81

Figura 16. Reações envolvidas na determinação da atividade da enzima superóxido dismutase pelo método de Flohé & tting (1984).....83

Figura 17. (A) Fotografia da preparação de CSIB. (B) Esquema do coração de barata (C) Vista da preparação de CSIB no microscópio estereoscópico (4x)....87

Figura 18. Curva de crescimento da linhagem *Anabaena spiroides* (ITEP 26)....93

Figura 19. Espectro de massas MS^2 do íon *m/z* 253, obtido por infusão direta do extrato acidificado com CH_3COOH da linhagem *Anabaena siproides* ITEP 25....94

Figura 20. Cromatogramas obtidos da análise por LC-MS da anatoxina-a(s) utilizando a coluna cromatográfica Synergy Polar® RP....95

Figura 21. Cromatogramas obtidos da análise por LC-MS de extrato contendo anatoxina-a(s) utilizando as colunas cromatográficas (A) Synergy Polar®, (B) Luna Sílica® e (C) ZIC HILIC....96

Figura 22. (A) Cromatograma obtido a partir da análise por LC-MS do extrato de *Anabaena spiroides* contendo anatoxina-a(s) (pico com t_{ret} 9,2 min) utilizando a coluna ZIC®-HILIC. (B) Espectro de massas MS^2 do pico correspondente à anatoxina-a(s)....97

Figura 23. Perfil cromatográfico da antx-a(s) obtido a partir da análise por LC-MS dos extratos utilizados nos tratamentos de camundongos sacrificados após (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 7dias....98

Figura 24. Atividade das enzimas AChE ($\mu mol.min^{-1}.g\ Hb^{-1}$) e BuChE ($U.l^{-1}$) em camundongos após 14 dias de tratamento com extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$) e triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$)....103

Figura 25. Atividade da enzima AChE ($Abs.min^{-1}$) após 5 min de incubação com diferentes concentrações de triclorfon (0,01; 0,1 e 1 $mg.ml^{-1}$)....104

Figura 26. Atividade locomotora de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 $mg.kg^{-1}$, respectivamente), avaliada no campo aberto após 24 h do tratamento....107

Figura 27. Atividade locomotora de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 $mg.kg^{-1}$, respectivamente) avaliada no campo aberto após 48 h do tratamento....109

Figura 28. Atividade locomotora de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 $mg.kg^{-1}$, respectivamente) avaliada no campo aberto após 7 dias do tratamento....111

Figura 29. Atividade locomotora de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 $mg.kg^{-1}$, respectivamente) avaliada no campo aberto após 14 dias do tratamento....113

Figura 30. Comportamento apresentado por camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 $mg.kg^{-1}$, respectivamente) avaliado no labirinto em cruz elevado após 24 h da administração....115

Figura 31. Comportamento apresentado por camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 mg.kg^{-1}, respectivamente) avaliado no labirinto em cruz elevado após 48 h da administração 117

Figura 32. Comportamento apresentado por camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 mg.kg^{-1}, respectivamente) avaliado no labirinto em cruz elevado após 7 dias da administração..... 119

Figura 33. Comportamento apresentado por camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 mg.kg^{-1}, respectivamente) avaliado no labirinto em cruz elevado após 14 dias da administração..... 121

Figura 34. Atividade da enzima AChE eritrocitária em camundongos tratados via intraperitoneal com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 dias (C) e 14 dias (D) de exposição 123

Figura 35. Atividade da enzima BuChE plasmática em camundongos tratados via intraperitoneal com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 dias (C) e 14 dias (D) de exposição 124

Figura 36. Atividade da enzima CAT eritrocitária em camundongos tratados via intraperitoneal com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 dias (C) e 14 dias (D) de exposição 126

Figura 37. Atividade da enzima GPx eritrocitária em camundongos tratados via i.p. com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 (C) e 14 dias (D) de exposição 127

Figura 38. Atividade da enzima GR eritrocitária em camundongos tratados via i.p. com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 (C) e 14 dias (D) de exposição 128

Figura 39. Atividade da enzima CuZnSOD em camundongos tratados via intraperitoneal com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 dias (C) e 14 dias (D) de exposição..... 129

Figura 40. Atividade das enzimas (A) GR, (B) CAT, (C) GPx, (D) GST em sementes de alfafa após sete dias de exposição a diferentes concentrações do extrato contendo anatoxina-a(s) (EA-1=1,8; EA-2= 0,18; EA-3= 0,018 e EA-4=0,0018 µg.µl^{-1}), extrato livre de cianotoxinas (ELT) e água destilada (Controle) 131

Figura 41. Identificação de ANAS no extrato de *Anabaena spiroides* por LC-MS. (A) Cromatograma do íon *m/z* 253 proveniente da ($M+H^+$) de anatoxina-a(s); (B) Espectro de massas *full scan*; (C) Espectro de massas MS^2 do íon *m/z* 253 mostrando os íons caraterísticos de anatoxina-a(s) 132

Figura 42. Avaliação da atividade residual e porcentagem de inibição da AChE após incubação com as soluções de extrato contendo anatoxina-a(s) utilizadas na preparação do CSIB 133

Figura 43. Efeito de diferentes doses de extrato contendo anatoxina-a(s) (EA) na frequência cardíaca de baratas *Leurolestes circunvagans* ao longo de 30 min. Cada ponto representa a média ± epm (n=9). *p<0,05; ANOVA/MANOVA 133

Figura 44. Proposta do desequilíbrio na atividade das enzimas antioxidantes que o extrato contendo antx-a(s) pode ter provocado nos dois modelos estudados neste trabalho (camundongos e sementes) 157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das principais cianotoxinas segundo o órgão alvo 31

Tabela 2. Parâmetros cinéticos obtidos a partir da incubação da anatoxina-a(s) com acetilcolinesterase de diversos organismos 43

Tabela 3 Avaliação clínica de camundongos para observação da toxicidade aguda (Adaptada de EPA, 2002) 71

Tabela 4. Avaliação clínica de camundongos tratados via i.p. com extrato contendo anatoxina-a(s) (antx-a(s)[1]) e anatoxina-a(s) purificada por LC-MS (antx-a(s)[2]) 99

Tabela 5. Avaliação clínica de camundongos (n=2 por grupo) tratados por *gavage* com doses decrescentes de triclorfon 100

Tabela 6. Avaliação clínica de camundongos (n=1 por grupo) tratados pelas vias oral e intraperitoneal com doses decrescentes de extrato contendo anatoxina-a(s) 101

Tabela 7. Avaliação clínica e atividade das enzimas AChE e BuChE em camundongos tratados via intraperitoneal com extrato contendo anatoxina-a(s) e triclorfon (n=2 por grupo; grupo controle, n=4) 102

Tabela 8. Avaliação do tempo de incubação da enzima AChE isolada de *Electrophorus electricus* em $\mu mol.min^{-1}$ após 0, 3,5 e 10 min de incubação antes da adição do substrato IATC 104

Tabela 9. Avaliação da atividade residual e porcentagem de inibição da AChE após incubação com as soluções de triclorfon e extrato contendo anatoxina-a(s) utilizadas nos tratamentos em camundongos 105

Tabela 10. Avaliação da atividade locomotora no campo aberto de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon após 24 h do tratamento 106

Tabela 11. Avaliação da atividade locomotora no campo aberto de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon após 48 h do tratamento 108

Tabela 12. Avaliação da atividade locomotora no campo aberto de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon após 7 dias do tratamento 110

Tabela 13. Avaliação da atividade locomotora no campo aberto de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon após 14 dias do tratamento 113

Tabela 14. Avaliação do comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado após 24 h de exposição aguda ao triclorfon (100 mg.kg-1) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg-1) 114

Tabela 15. Avaliação do comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado após 48 h de exposição ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$)..... 116

Tabela 16. Avaliação do comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado após 7 dias de exposição ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$) 118

Tabela 17. Avaliação do comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado após 14 dias de exposição ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$) 120

Tabela 18. Atividade da enzima AChE eritrocitária em camundongos após 24 h, 48 h, 7 e 14 dias de exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$)..... 122

Tabela 19. Atividade da enzima BuChE plasmática em camundongos após 24 h, 48 h, 7 e 14 dias de exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$)..... 123

Tabela 20. Atividade da enzima CAT eritrocitária em camundongos após exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$) durante 24h, 48h e 7 dias..... 125

Tabela 21. Atividade da enzima GPx eritrocitária em camundongos após exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$) durante 24 h, 48 h, 7 e 14 dias..... 127

Tabela 22. Atividade da enzima GR eritrocitária em camundongos após exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$) durante 24 h, 48 h, 7 e 14 dias..... 128

Tabela 23. Atividade da enzima CuZnSOD eritrocitária em camundongos após exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo antx-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$) durante 24 h, 48 h, 7 e 14 dias..... 129

Tabela 24. Atividade das enzimas GR, CAT, GPx e GST em nkat.mg-1 em sementes de alfafa (*Medicago sativa L.*) expostas durante 7 dias a diferentes doses de extrato contendo antx-a(s)..... 130

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Descrição dos componentes do equipamento HPLC Shimadzu utilizado na identificação de antx-a(s).....62

Quadro 2. Gradientes utilizados na análise por HPLC-MS dos extratos contendo anatoxina-a(s) preparados utilizando o protocolo 1 descrito no item 4.4.2.1.1. 64

Quadro 3. Gradientes utilizados na análise por HPLC-MS dos extratos contendo anatoxina-a(s) preparados utilizando o protocolo 2 descrito no item 4.4.2.1.2. 65

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Protocolo de extração da anatoxina-a(s).....68

LISTA DE ABREVIATURAS

2- PAM - 2- pralidoxima
AChE - Acetilcolinesterase
Antx-a(s) - Anatoxina-a(s)
ANOVA - Análise de Variância
BA - Braços Abertos
BF - Braços Fechados
BHE - Barreira Hematoencefálica
BuChE - Butirilcolinesterase
CA - Campo Aberto
CAT - Catalase
Cis - Cisteína
CSIB - Coração Semi-isolado de Barata
DL_{50} - Dose Letal média
DPF - Diisopropilfluorfosfato
DTE - Ditioeritrol
DTNB - Ácido de ditionitrobenzoico
EA - Número de entradas nos braços abertos
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético
EF - Número de entradas nos braços fechados
EO - Estresse Oxidativo
EPA - *Environmental Protection Agency*
epm - erro padrão da média
FAMS - *Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry*
Gli - Glicina
Glu - Glutamato
GPx - Glutationa Peroxidase
GR - Glutationa Redutase
GSH - Glutationa reduzida
GSSG - Glutationa oxidada
GST - Glutationa Transferase
HILIC - Hidrophilic Interaction Chromatography
HPLC-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
i.p.- Intraperitoneal
IATC - Iodeto de Acetiltiocolina
IOF - Inseticidas Organofosforados
LCE - Labirinto em Cruz Elevado
LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
logP - Coeficiente de partição octanol/água
MS - Espectrometria de Massas
NMR - *Nuclear Magnetic Resonance*
NTE - *Neuropathy Target Esterase*
OPIDP - *Organophosphate-Induced Delayed Polyneuropathy*
p.c. - Peso corpóreo
PM - Peso Molecular
RNS - Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico
SOD - Superóxido Dismutase
SPE - Extração em Fase Sólida
TA - Tempo de permanência nos braços abertos
TC - Tiocolina
TF - Tempo de permanência nos braços fechados
TMB4 - Trimedoxima
$\mathbf{t_{ret}}$ - Tempo de retenção

SUMÁRIO

RESUMO ..... **viii**

ABSTRACT ..... **ix**

LISTA DE FIGURAS ..... **x**

LISTA DE TABELAS ..... **xiv**

LISTA DE QUADROS ..... **xvi**

LISTA DE ESQUEMAS ..... **xvii**

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **xviii**

SUMÁRIO ..... **xx**

1. INTRODUÇÃO **24**

2. REVISÃO DA LITERATURA **26**

2.1 Cianobactérias e cianotoxinas 26
2.2 Anatoxinas 34
2.3 Anatoxina-a(s) 34
2.3.1 Características físico-químicas 34
2.3.2 Biossíntese da anatoxina-a(s) 35
2.3.3 Ocorrência de cianobactérias produtoras de anatoxina-a(s) 36
2.3.4 Mecanismo de ação da anatoxina-a(s) 37
2.3.4.1 Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase 37
2.3.4.2 Toxicologia aguda e aspectos clínicos da anatoxina-a(s) 39
2.3.4.3 Comparação da anatoxina-a(s) com inseticidas organofosforados 43
2.3.4.4 Toxicocinética e toxicodinâmica da anatoxina-a(s) 46
2.3.4.5 Outros efeitos produzidos pela anatoxina-a(s) 46
2.3.4.6 Métodos de detecção da anatoxina-a(s) 46
2.3.4.7 Possível aplicação da anatoxina-a(s) 47
2.4 Estresse Oxidativo 48
2.4.1 Sistema de defesa antioxidante 49
2.4.2 Cianotoxinas e estresse oxidativo 52
2.4.3 Inseticidas organofosforados e estresse oxidativo 53

3. OBJETIVOS **55**
3.1 Objetivo geral 55
3.2 Objetivos específicos 55

4. MATERIAL E MÉTODOS **57**
4.1 Material 57
4.1.1 Equipamentos 57
4.1.2 Reagentes 57
4.2 Escolha das linhagens de *Anabaena spiroides* 58
4.3 Animais utilizados 58

4.3.1 Camundongos 58
4.3.2 Baratas 59
4.4 Procedimentos 59
4.4.1 Manutenção das linhagens *Anabaena spiroides* 59
4.4.1.1 Obtenção de biomassa da linhagem *Anabaena spiroides* ITEP26 60
4.4.2 Identificação da anatoxina-a(s) 62
4.4.2.1 Determinação da anatoxina-a(s) por LC-MS 62
4.4.2.1.1 Protocolo 1 63
4.4.2.1.2 Protocolo 2 64
4.4.2.1.3 Protocolo 3 66
4.4.2.1.4 Protocolo 4 66
4.4.2.1.5 Protocolo 5 67
4.4.3 Determinação da atividade residual da enzima acetilcolinesterase 69
4.4.4 Ensaio de toxicidade aguda 70
4.4.5 Avaliações comportamentais 71
4.4.5.1 Medida da atividade locomotora em Campo Aberto 72
4.4.5.2 Labirinto em Cruz Elevado 74
4.4.6 Coleta de amostras de sangue para bioquímica sanguínea 77
4.4.7 Determinação da concentração de hemoglobina 77
4.4.8 Determinação da atividade das enzimas colinesterásicas e antioxidantes em sangue de camundongos 78
4.4.8.1 Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase 78
4.4.8.2 Determinação da atividade da enzima butirilcolinesterase 79
4.4.8.3 Determinação da atividade da enzima catalase 79
4.4.8.4 Determinação da atividade da enzima glutationa peroxidase 80
4.4.8.5 Determinação da atividade da enzima glutationa redutase 82
4.4.8.6 Determinação da atividade da superóxido dismutase 83
4.4.9 Exposição de sementes de alfafa ao extrato contendo anatoxina-a(s) 84
4.4.9.1 Preparo de amostra para determinação de enzimas antioxidantes em semente de alfafa 85
4.4.9.2 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes em sementes de alfafa 85
4.4.10 Preparação do coração semi-isolado de barata *Leurolestes circunvagans* 86
4.5 Delineamento experimental 87
4.5.1 Experimento 1 – Avaliação do crescimento da linhagem *Anabaena spiroides* (ITEP26) 87
4.5.2 Experimento 2 – Obtenção de biomassa das linhagens de cianobactéria produtoras de anatoxina-a(s) 87
4.5.3 Experimento 3 - Identificação da anatoxina-a(s) nos extratos de *Anabaena spiroides* por LC-MS 88
4.5.4 Experimento 4 – Pré-avaliação da toxicidade aguda do extrato contendo anatoxina-a(s) e de anatoxina-a(s) purificada por LC-MS 88
4.5.5 Experimento 5 – Escolha do controle de inseticida organofosforado 88
4.5.6 Experimento 6 – Escolha da via de administração para anatoxina-a(s) 89
4.5.7 Experimento 7 – Escolha da dose sub-letal de anatoxina-a(s) e triclorfon 89
4.5.8 Experimento 8 – Padronização do método para determinação da atividade residual da enzima acetilcolinesterase 89

4.5.9 Experimento 9 – Avaliação comportamental no campo aberto e labirinto em cruz elevado em camundongos após exposição ao extrato contendo anatoxina-a(s) 90
4.5.10 Experimento 10 – Avaliação da atividade das enzimas AChE e BuChE em camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon 90
4.5.11 Experimento 11 – Efeito do extrato contendo anatoxina-a(s) na atividade das enzimas CAT, GPx, GR e SOD em camundongos 90
4.5.12 Experimento 12 – Efeito do extrato contendo anatoxina-a(s) na atividade das enzimas CAT, GPx, GST e GR em sementes de alfafa (*Medicago sativa L.*) 91
4.5.13 Experimento 13 – Avaliação do efeito do extrato contendo anatoxina-a(s) em coração de barata *Leurolestes circunvagans* 91
4.6 Análise estatística 91

5. RESULTADOS 93
5.1 Experimento 1 – Avaliação do crescimento da linhagem *Anabaena spiroides* (ITEP26) 93
5.2 Experimento 2 – Obtenção de biomassa das linhagens de cianobactéria produtoras de anatoxina-a(s) 93
5.3 Experimento 3 - Identificação da anatoxina-a(s) nos extratos de *Anabaena spiroides* por LC-MS 94
5.4 Experimento 4 – Pré-avaliação da toxicidade aguda do extrato contendo anatoxina-a(s) e anatoxina-a(s) purificada por LC-MS 98
5.5 Experimento 5 – Escolha do controle do inseticida organofosforado 99
5.6 Experimento 6 – Escolha da via de administração para anatoxina-a(s) 100
5.7 Experimento 7 – Escolha da dose sub-letal de anatoxina-a(s) e triclorfon 101
5.8 Experimento 8 - Padronização do método para determinação da atividade residual da enzima acetilcolinesterase 103
5.9 Experimento 9 – Avaliação comportamental no campo aberto e labirinto em cruz elevado em camundongos após exposição aguda ao extrato contendo anatoxina-a(s) 105
5.10 Experimento 10 – Avaliação da atividade das enzimas AChE e BuChE em camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon 122
5.11 Experimento 11 – Efeito do extrato contendo anatoxina-a(s) na atividade das enzimas CAT, GPx, GR e SOD em camundongos 124
5.12 Experimento 12 – Efeito do extrato contendo anatoxina-a(s) na atividade das enzimas CAT, GPx, GST e GR de sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.) 130
5.13 Experimento 13 – Avaliação do efeito do extrato contendo anatoxina-a(s) em coração semi-isolado de barata *Leurolestes circunvagans* 131

6. DISCUSSÃO 134

7. CONCLUSÕES 160

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 162

9. ANEXOS 176

9.1 ANEXO I: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-FCF/USP 176
9.2 ANEXO II: Curriculum Vitae 177

9.3 ANEXO III: Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry (artigo publicado) 183
9.4 ANEXO IV: Anatoxin effects on the germination and the antioxidative enzymes of alfalfa (Medicago sativa) seedlings (artigo em preparação) 184
9.5 ANEXO V: Effects of the cyanobacterial organophosphate anatoxin-a(s) on cardiac rhythm of *Leurolestes circunvagans* (artigo submetido)..... 185
9.6 ANEXO VI: Capítulo de livro: Cianobactérias e Microalgas Tóxicas em Ambientes Aquáticos (capítulo de livro) 186
9.7 ANEXO VII: Certificados do doutorado sanduíche realizado na Alemanha (CAPES-DAAD-PROBRAL – Processo BEX1754/07-6) 187

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias representam uma fonte biológica praticamente inexplorada de uma grande diversidade de metabólitos secundários. Aproximadamente 150 gêneros destes organismos são capazes de produzir metabólitos biologicamente ativos, dentre os quais estão as cianotoxinas (PRASANNA *et al.*, 2010). Os mecanismos de toxicidade dessas substâncias são diversos podendo ser hepatotóxicos, neurotóxicos ou dermatotóxicos (CHORUS & BARTRAM, 1999).

As anatoxinas são neurotoxinas que podem ser produzidas por várias espécies de cianobactérias. Este grupo de toxinas é formado pela anatoxina-a, homoanatoxina e antx-a(s). Até o momento no Brasil, dentre o grupo de anatoxinas já descritas na literatura científica, somente a antx-a(s) foi documentada em dois estados, Pernambuco e Rio Grande do Sul (MOLICA et al 2005, BECKER et al 2010).

A antx-a(s) é um inibidor irreversível da enzima AChE. Esta cianotoxina é o único organofosforado conhecido com atividade inibitória irreversível da AChE produzido por cianobactérias (CARMICHAEL et al., 1990). A compreensão de outros mecanismos de ação da antx-a(s) se faz importante, pois através desse conhecimento seria possível propor marcadores de intoxicação por esta toxina, além de sugerir algum tratamento ou até mesmo uma possível aplicação comercial.

A utilização das cianobactérias como fonte de uma vasta diversidade de compostos, tais como lipopolisacarídeos, lipídeos, proteínas, vitaminas, esteróides, enzimas, algicidas, inseticidas e produtos de aplicação farmacêutica, está sendo muito estudada.

Considerando os aspectos descritos acima, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o potencial pró-oxidante de extratos contendo antx-a(s) em camundongos *Swiss* e em sementes de alfafa *Medicago sativa L.*, bem como avaliar o efeito destes extratos em coração semi-isolado de baratas *Leurolestes circunvagans* (Blattodea).

De acordo com os resultados obtidos, o extrato contendo antx-a(s) foi capaz de promover um desequilíbrio na atividade enzimática antioxidante em camundongos após diferentes tempos de exposição (24 h, 48 h, 7 dias e 14 dias),

bem como em sementes (7 dias). Dessa maneira foi possível sugerir que além da inibição das colinesterases, outros mecanismos mais complexos estariam envolvidos na toxicidade do extrato contendo antx-a(s).

Adicionalmente, este trabalho apresentou resultados inéditos demonstrando que o extrato contendo antx-a(s) provocou um efeito cardiotóxico em baratas. Estes resultados adicionais são promissores e destacam uma possível aplicação para antx-a(s) futuramente. Considerando-se que o Brasil é o terceiro maior país consumidor de agrotóxicos no mundo, o investimento na pesquisa de um inseticida de origem natural, sustentável e de baixo custo como antx-a(s), se faz importante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cianobactérias e cianotoxinas

As cianobactérias são microorganismos procariontes fotossintetizantes gram-negativos. Estes microorganismos pertencem ao domínio *Bacteria* e compreendem mais de 150 gêneros e 2000 espécies já descritas (PRASANNA *et al.*, 2010). As cianobactérias apresentam semelhanças tanto com as bactérias quanto com as algas. Assemelham-se às bactérias por não possuirem núcleo nem estruturas definidas e apresentarem reprodução assexuada e às algas por serem organismos fotossintetizantes (possuem clorofila-*a*) (SANT'ANNA *et al.*, 2004). Com origem estimada em mais de 3,5 bilhões de anos, as cianobactérias são reconhecidas por terem uma importante função no surgimento e manutenção da atmosfera terrestre, a partir da realização da fotossíntese (ARÁOZ *et al.*, 2010). A versatilidade destes microorganismos permite que possam sobreviver em diversos ecossistemas incluindo águas continentais e marinhas, sedimento e locais de condições extremas (solo de desertos, cinzas vulcânicas, fontes termais e geleiras), além de locais com baixas concentrações de oxigênio ou alta incidência de radiações ultravioleta (CHORUS & BARTRAM, 1999; OSSWALD *et al.*, 2007; CARNEIRO, 2009; ARÁOZ *et al.*, 2010). Ecologicamente, ocupam a posição de produtores primários nas cadeias alimentares do fitoplâncton marinho e dulcícola juntamente com as microalgas (CARDOZO *et al.*, 2007).

A morfologia básica das cianobactérias inclui as formas unicelular, colonial e filamentosa multicelular (Figura 1). Um exemplo da forma unicelular é a Ordem *Chroococcales* que possui células esféricas, ovóides ou cilíndricas, se reproduz por divisão binária e pode formar colônias irregulares unidas por mucilagem. Outras ordens com a mesma morfologia, porém com diferenças na liberação de novas células, são as *Chamaesiphonales* e *Pleurocapsales* ilustradas na figura 1. A morfologia filamentosa resulta de divisões celulares sucessivas num único plano e sua estrutura multicelular consiste de uma cadeia de células chamada tricoma, que pode ser reto ou em forma de espiral. O formato e tamanho das células das

cianobactérias filamentosas são muito variáveis e a reprodução é por fragmentação do tricoma ou formação de hormogonias (fragmentos reprodutivos do tricoma). Assim sendo, as espécies da Ordem *Oscillatoriales* são compostas por células praticamente idênticas. Já os tricomas das ordens *Nostocales* e *Stigonematales* contêm células vegetativas especializadas de composição variável chamada heterócito (célula com capacidade em fixar nitrogênio) e acineto (célula que armazena as reservas nutricionais) (CHORUS & BARTRAM, 1999).

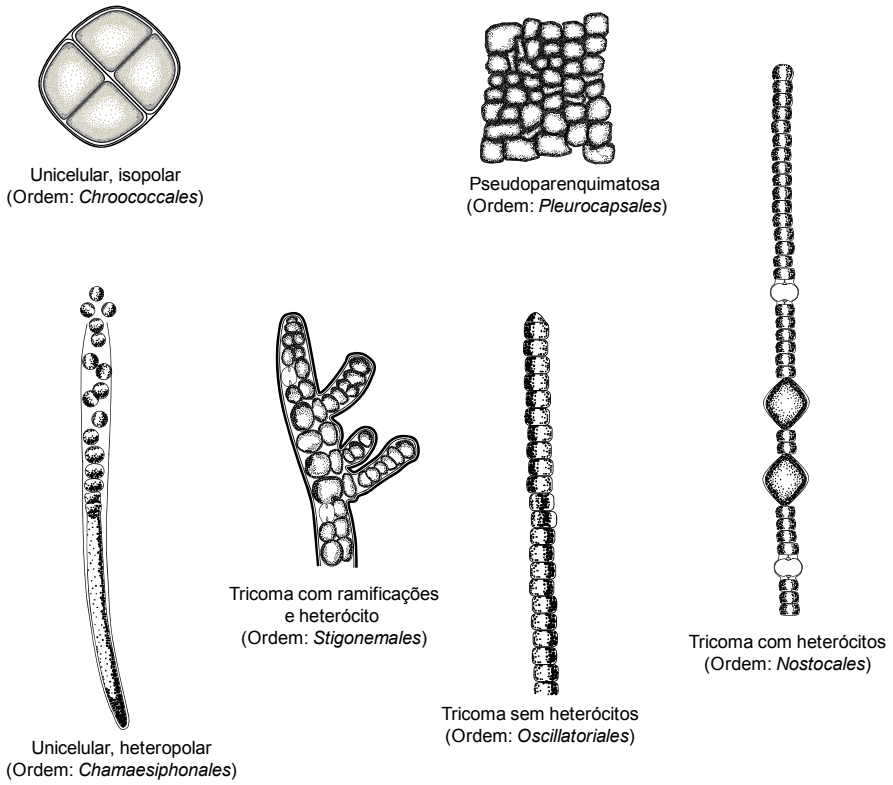


Figura 1. Morfologia básica das cianobactérias. (Adaptado de CHORUS & BARTRAM, 1999).

A ocorrência de cianobactérias no ecossistema de águas continentais é importante, porém estranhamente estes organismos os quais ajudaram na criação da vida no planeta, tem se tornado um problema de grandes proporções em termos de saúde pública e meio ambiente (SVRCEK & SMITH, 2004).

A eutrofização consiste no enriquecimento de nutrientes nos corpos d'água. Em condições normais, esse processo permite a depuração natural do ambiente aquático. No entanto, a atividade antropogênica é reconhecida como a principal

responsável pelo desequilíbrio ecológico dos corpos d'água além de acelerar o processo de eutrofização. Esse desequilíbrio é ocasionado pelo lançamento indiscriminado de nutrientes oriundos principalmente de esgoto doméstico e industrial. Em razão do excessivo aporte de nutrientes (principalmente fosfatos e nitratos) provindos dessas atividades antrópicas, há uma interrupção dos ciclos biológicos e/ou químicos em ambientes aquáticos (CHORUS & BARTRAM, 1999).

Uma das conseqüências da eutrofização causada pelo homem é a proliferação excessiva de cianobactérias conhecida como floração (BRAGA *et al.*, 2002). Segundo APELDOORN et al. (2007), as florações podem ser causadas pela complexa interação entre altas concentrações de nutrientes, temperatura entre 15-30°C, turbidez, meio neutro-alcalino, condutividade, salinidade, disponibilidade de carbono e fluxo lento ou estancamento de água.

Nos ambientes impactados, as florações de cianobactérias provocam uma série de problemas, tais como mudanças organolépticas (cor esverdeada, formação de aglomerados *"scum"* e odores desagradáveis causados geralmente pela presença das substâncias geosmina e metilisoborneol), aumento da turbidez, diminuição do oxigênio dissolvido, morte extensiva de outros organismos que residem no mesmo *habitat* e, a produção de toxinas (conhecidas como cianotoxinas). Essas toxinas atingem tanto a biota aquática como organismos superiores, incluindo o homem (OSSWALD *et al.*, 2007).

Atualmente, existe uma grande preocupação com a formação de florações em decorrência aos sérios riscos para saúde humana, animal, sustentabilidade dos ecossistemas aquáticos e economia (CHORUS & BARTRAM, 1999; DODDS *et al.*, 2009). Neste contexto, recentemente HUDNELL (2010) publicou um manuscrito onde relata o alto investimento (entre 2,2 e 4,6 bilhões de dólares americanos por ano) dos Estados Unidos no combate de florações presentes na água destinada para uso recreacional, comercial, abastecimento humano e água potável.

A duração e o tempo de permanência de uma floração de cianobactérias estão estreitamente ligados às condições climáticas de uma determinada região. Por exemplo, geralmente as florações são mais proeminentes durante o final do verão e início do outono, podendo durar de dois a quatro meses (CHORUS & BARTRAM,

1999). Na França as florações podem durar 4 meses e, no Japão, Portugal, Espanha e África do Sul, os relatos citam a persistência por 6 meses ou mais (CHORUS & BARTRAM, 1999; APELDOORN *et al.*, 2007).

No Brasil, diversos trabalhos relataram a presença de florações de cianobactérias tóxicas em corpos d'água continental (AZEVEDO *et al.*, 1994; LAGOS *et al.*, 1999; MOLICA *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2005; ANJOS *et al.*, 2006). Segundo D RR *et al*. (2010), onze dos vinte e seis estados brasileiros das regiões norte e sul, foram alvos da formação de florações, principalmente em reservatórios artificiais, lagoas, lagos, rios e estuários. Dentre os gêneros mais freqüentemente encontrados estão os gêneros *Microcystis* e *Dolichospermum* (antigamente classificada como *Anabaena*) (SANT'ANNA, 2000, WACKLIN *et al.*, 2009). De fato, as condições climáticas de países localizados em áreas tropicais e subtropicais como Brasil, China e Austrália favorecem a ocorrência de florações quase o ano inteiro, mesmo em condições de baixa precipitação pluvial (CHORUS & BARTRAM, 1999; APELDOORN *et al.*, 2007).

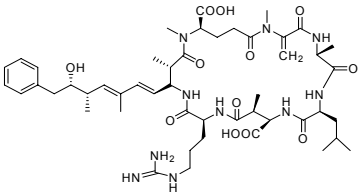
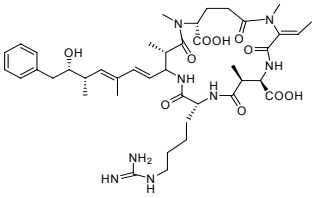
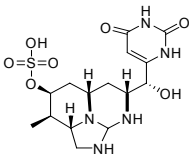
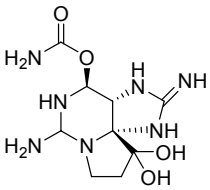
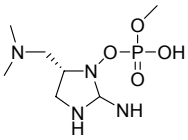
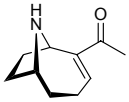
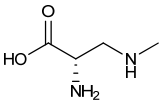
Como mencionado anteriormente, uma das maiores preocupações para a saúde pública é a capacidade que alguns gêneros de cianobactérias têm em produzir toxinas. Essas cianotoxinas são metabólitos secundários das cianobactérias, já que não existe nenhuma evidência descrita na literatura sobre o envolvimento destes compostos no metabolismo primário (divisão celular ou produção de energia) desses microorganismos (SVRCEK & SMITH, 2004). A importância fisiológica das cianotoxinas para as cianobactérias ainda não foi elucidada. Algumas linhas de pesquisa postulam que as cianotoxinas seriam utilizadas pelas cianobactérias como mecanismo de proteção contra predadores naturais (CARMICHAEL, 1992). Outras, como a levantada por PAERL & MILLIE (1996) consideram que as cianotoxinas poderiam estar mais relacionadas à comunicação celular intra-específica. Dentre os gêneros de cianobactérias produtores de toxinas mais freqüentes estão *Dolichospermum* (antigamente denominado *Anabaena*), *Oscillatoria*, *Aphanizomenon, Nodularia, Microcystis e Cilindrospermopsis* (DITTMANN & WIEGAND, 2006; WACKLIN *et al.*, 2009).

Por meio de estudos de biologia molecular verificou-se que, além das diferenças com relação à presença e/ou ausência de vacúolos entre as espécies planctônicas e benctônicas do gênero *Anabaena*, ambas são geneticamente distintas. Sendo assim, todos os morfotipos que apresentavam vacúolos das espécies planctônicas pertencentes ao gênero *Anabaena* foram transferidos para o gênero *Dolichospermum* (WACKLIN *et al.*, 2009). Porém, o nome *Anabaena* continua sofrendo mudanças e ainda não há um consenso entre os taxonomistas sobre a nomenclatura a qual o gênero irá pertencer. Desta forma, neste estudo optou-se por manter o nome *Anabaena* para designar tanto as linhagens já citadas na literatura como as linhagens estudadas neste trabalho.

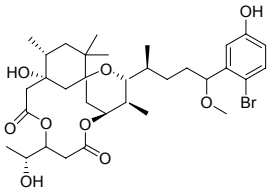
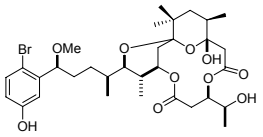
Os mecanismos de ação das cianotoxinas são diversos, podendo ser classificadas como hepatotóxicas, neurotóxicas e dermatotóxicas (CHORUS & BARTRAM, 1999). No entanto, elas também podem estar envolvidas em outros processos patológicos, como alteração no sistema imune e estresse oxidativo (KUJBIDA *et al.*, 2006; KUJBIDA, 2008)

As estruturas químicas, mecanismo de ação e gêneros produtores descritos das principais cianotoxinas estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Classificação das principais cianotoxinas segundo o órgão alvo.

CLASSIFICAÇÃO/ TOXINA	ESTRUTURA QUÍMICA	CIANOBACTERIA PRODUTORA	MECANISMO DE TOXICIDADE	DL_{50} ($\mu g.kg^{-1}$ p.c.) via i.p. (camundongo)
HEPATOTOXINAS				
Microcistina-LR		*Microcystis, Nostoc, Anabaena, Oscillatoria*	Promotor de tumor hepático, inibidor de fosfatases	50
Nodularina-R		*Nodularia*	Promotor de tumor hepático, inibidor de fosfatases	50
Cilindrospermopsina		*Aphanizomenon, Cylindrospermopsis*	Inibidor da síntese proteica	2.10^3
NEUROTOXINAS				
Saxitoxina		*Aphanizomenon*	Bloqueador de canais de sódio	10
Anatoxina-*a*(s)		*Anabaena*	Inibidor de colinesterase	20
Anatoxina-*a*		*Anabaena, Aphanizomenon, Oscillatoria*	Agonista nicotínico	375
ß-*N*-metil-*L*-alanina (BMMA)		*Nostoc*	Agonista glutamaérgico	Não definida

Continua...

CLASSIFICAÇÃO/ TOXINA	ESTRUTURA QUÍMICA	CIANOBACTERIA PRODUTORA	MECANISMO DE TOXICIDADE	DL_{50} ($\mu g.kg^{-1}$ p.c.) via i.p. (camundongo)
DERMATOTOXINAS				
Debromoaplisiatoxina		*Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix*	Inflamação da pele, promotor de tumor	Não definida
Lingbiatoxina		*Lyngbya*	Inflamação da pele e no trato gastrointestinal	Não definida

Fonte: CHORUS & BARTRAM, 1999

O primeiro relato toxicológico descrevendo morte de animais provocada por uma floração de cianobactérias ocorreu em 1878, no Lago Alexandrina no sul da Austrália, onde bovinos, ovinos, suínos e equinos morreram intoxicados após beberem água contaminada por cianobactérias da espécie *Nodularia spumigena* (*apud* FRANCIS, 1878). Após uma análise detalhada deste evento, comparando a situação ocorrida inicialmente naquela época com a situação após mais de um século, CODD *et al.* (1994) concluíram que apesar de todos os avanços tecnológicos, a ocorrência de cianobactérias naquele lago continuava sendo um problema. Apessar dos avanços tecnológicos, existe um grande número de acidentes toxicológicos envolvendo tanto animais domésticos como selvagens, sendo que alguns deles foram descritos detalhadamente enquanto outros foram apenas relatados (CHORUS & BARTRAM, 1999).

A literatura científica exemplifica alguns dos efeitos adversos em humanos provocados pelo contato com cianotoxinas. Normalmente, esses acidentes toxicológicos envolvendo as cianotoxinas estão associados à aplicação de sulfato de cobre ($CuSO_4$), um algicida muito utilizado em águas, devido à grande densidade

fitoplanctônica. O uso de $CuSO_4$ tem como objetivo controlar o crescimento de florações, porém, esta estratégia induz a lise celular e consequente liberação de toxinas para o meio ambiente (KUJBIDA, 2008). Em 1975, uma epidemia de gastro e hepatoenterite ocorrida nos Estados Unidos foi provocada por uma floração de cianobactérias, atingindo aproximadamente 63% da população vinculada ao sistema público de abastecimento. Em 1979, na Austrália, cento e quarenta crianças e dez adultos apresentaram sintomas gastrointestinais, hepáticos, renais e perda de sangue associados ao consumo de água potável de um reservatório contendo *Cylindroespermopsis raciborskii* (CHORUS & BARTRAM, 1999). No Brasil, na região de Paulo Alfonso, Estado da Bahia, durante a construção da Represa de Itaparica houve uma grave epidemia de gastroenterite onde, dentre 2000 casos reportados, 88 resultaram em morte. O número de células de cianobactérias dos gêneros *Anabaena* e *Microcystis* encontradas na água foi de 10000 unidades.ml^{-1}. (TEIXEIRA *et al.*, 1993). Contudo, o maior desastre toxicológico aconteceu no Centro de Doenças Renais em Caruaru-PE, onde ocorreu a morte de 76 pessoas em consequência do uso de água contaminada com microcistinas e cilindroespermopsinas (POURIA *et al.*, 1998; JOCHIMSEN *et al.*, 1998). Este foi o primeiro caso confirmado de morte de seres humanos por contato com cianotoxinas (AZEVEDO *et al.*, 1994). A partir desse evento, o Ministério da Saúde passou a exigir procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, tornando obrigatório o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas. A legislação mais atual sobre tal exigência do Ministério da Saúde é a Portaria 518, publicada em 2004, revogando a RE 1469, que apresenta uma lista de todos os compostos que devem ser monitorados em água para consumo humano (MS, 2004). Vale salientar que esta portaria estabeleceu um limite máximo permitido de 1 $\mu g.l^{-1}$ para microcistina-LR (MC-LR) na água potável e recomenda limites de 15 e 3 $\mu g.l^{-1}$ para cilindroespermopsina e saxitoxina, respectivamente.

2.2 Anatoxinas

As anatoxinas são o primeiro grupo de neurotoxinas alcaloídicas e de baixo peso molecular a serem descritas na literatura (GORHAM *et al.*, 1964). A estrutura química das três anatoxinas mais comuns, anatoxina-*a*, homoanatoxina-*a* e anatoxina-a(s) (antx-a(s)), é apresentada na figura 2.

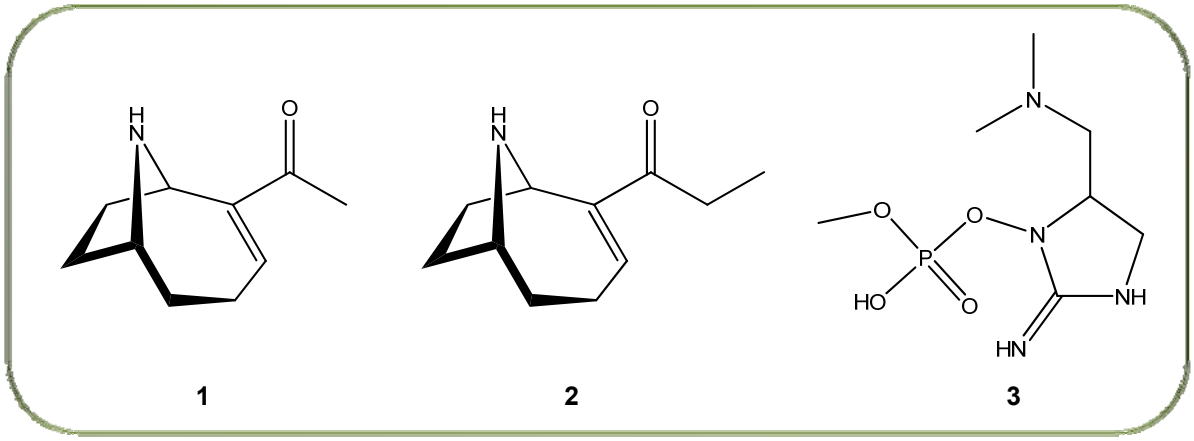


Figura 2. Estrutura química das anatoxinas: (1) anatoxina-*a*, (2) homoanatoxina-*a*, (3) anatoxina-a(s).

As anatoxinas podem ser produzidas por várias espécies de cianobactérias, isoladas ou concomitante à produção de hepatotoxinas. Até o momento no Brasil, dentre o grupo de anatoxinas já descritas, somente a antx-a(s) foi documentada (MOLICA *et al.*, 2005; BECKER *et al.*, 2010).

2.3 Anatoxina-a(s)

2.3.1 Características físico-químicas

Como apresentado na figura 2, a antx-a(s) possui estrutura química diferente das outras anatoxinas. A antx-a(s) é um éster metil-fosfato de uma *N*-hidroxiguanidina cíclica, fórmula molecular $C_7H_{17}N_4O_4P$, com absorção máxima em λ_{max}= 220 nm e massa molecular de 252 Da (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986; MATSUNAGA *et al.*, 1989). Até os dias atuais nenhuma variante estrutural desta toxina foi detectada (CHORUS & BARTRAM, 1999). MATSUNAGA *et al.* (1989) determinaram a estrutura molecular desta toxina por Espectrometria de Massas de

Bombardeio Rápido de Átomos (*Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry* – FABMS) e Ressonância Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance* – NMR). Para isso, a cepa *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17 foi mantida em cultura em meio enriquecido com 50% de ^{13}C e 90% de ^{15}N. Posteriormente, a toxina foi purificada e analisada por NMR. Após análise dos espectros obtidos por NMR observou-se que, possivelmente o grupamento *N*-CH_3 se ligou à cadeia lateral do anel imidazolínico e que, o grupamento metilfostato interagiu com um dos nitrogênios por uma ligação éster (MATSUNAGA *et al.*, 1989).

A antx-a(s) se decompõe rapidamente em soluções alcalinas (meia-vida de aproximadamente uma hora em pH >8,5) (MATSUNAGA *et al.*, 1989; BARROS *et al.*, 2004;) e quando submetida a alta temperatura (acima de 40 °C) (BARROS *et al.*, 2004). Por ser altamente hidrofílica, essa toxina é solúvel em solventes polares tais como água, metanol e etanol (COOK *et al.*, 1988), como também possui um coeficiente de partição octanol/água (CLogP) de -1,902 (CHEMDRAW®, 2010).

2.3.2 Biossíntese da anatoxina-a(s)

Na tentativa de elucidar a biossíntese da antx-a(s) alguns experimentos envolvendo a adição de compostos marcados às culturas de cepas produtoras de antx-a(s) foram realizados (MOORE *et al.*, 1992; HEMSCHEIDT *et al.*, 1995; SHIMIZU, 1996).

MOORE *et al.* (1992) acrescentaram, no décimo primeiro e décimo quarto dias, possíveis precursores da antx-a(s) marcados, como por exemplo [metil-^{14}C]-L-metionina, [2-^{14}C]-glicina, [U-^{14}C]-serina, [*guanido*-^{14}C]-L-arginina, [U-^{14}C]-L-arginina, [U-^{14}C]-L-ornitina, [4,5-^{3}H]-L-arginina e [1,2-^{14}C]-acetato de sódio. Após 21 dias de cultura o material foi liofilizado e a antx-a(s) extraída. Apesar dos aminoácidos [metil-^{14}C]-L-metionina, [2-^{14}C]-glicina e [U-^{14}C]-serina terem sido aparentemente incorporados à estrutura da antx-a(s), um terço da radioatividade dos mesmos foi perdida após hidrólise ácida.

Esses pesquisadores comprovaram mais tarde que, adicionando-se [U-^{13}C]-L-arginina ao meio de cultura, este composto seria totalmente incorporado à antx-a(s). Três anos depois, este mesmo grupo confirmou que a 4-hidroxiarginina seria

um composto intermediário na ciclização da arginina via substituição nucleofílica bimolecular (SN2) (HEMSCHEIDT *et al.*, 1995). Em contrapartida, na tentativa de compreender a biossíntese de metabólitos por microalgas, SHIMIZU (1996) propôs que a biossíntese da antx-a(s) seria a partir de um catabolismo pouco comum da arginina com perda de uma glicina, porém o mecanismo seria diferente ao descrito anteriormente (Ver figura 3).

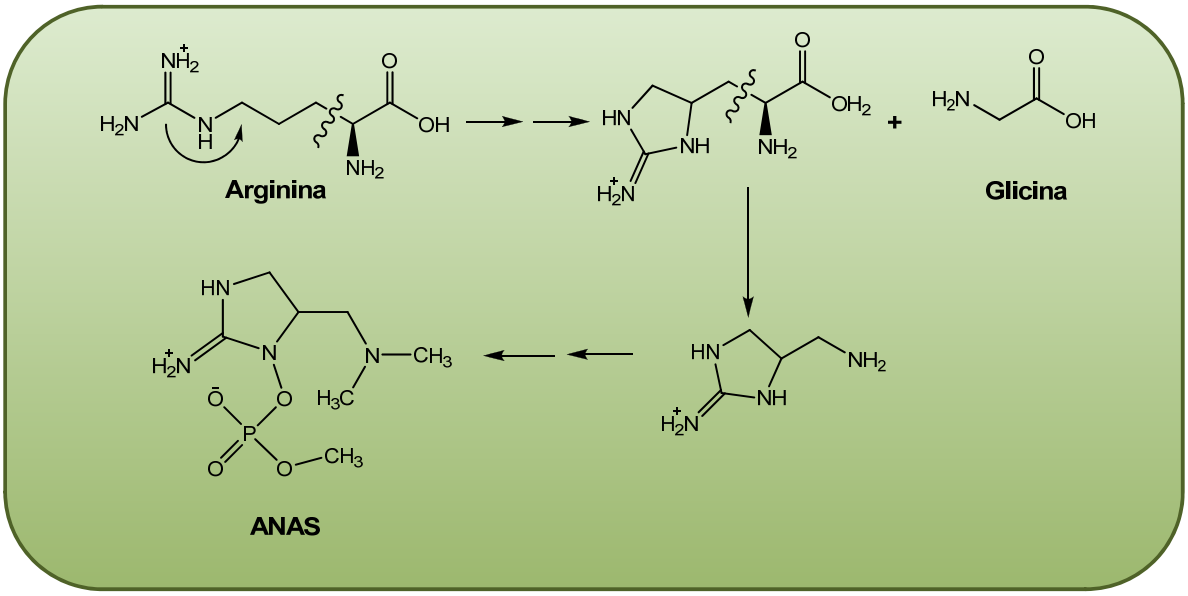


Figura 3. Rota de biossintese da antx-a(s) proposta por SHIMIZU (1996).

2.3.3 Ocorrência de cianobactérias produtoras de anatoxina-a(s)

A primeira ocorrência documentada de uma cepa de produtora de antx-a(s) foi *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17 no lago *Buffalo Pound* na província de Saskatchewan - Canadá em 1965 (CARMICHAEL & GORHAM, 1978). Mesmo assim, tanto o isolamento da toxina como sua elucidação estrutural e mecanismo de ação foram tardios. Nos Estados Unidos, a antx-a(s) foi causa de morte de nove cães que viviam próximo ao lago Richmond, no Estado Dakota do Sul (MAHMOOD *et al.*, 1988). COOD *et al.* (1995) relataram que em 1988 no lago *Muidhe* - Escócia, uma floração neurotóxica de *Anabaena flos-aquae* produziu uma forte inibição de acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), porém não foi determinada a natureza química da neurotoxina presente. Também, na Dinamarca,

no período compreendido entre 1993 a 1995, florações de cianobactéria ocorridas durante o verão foram colhidas no lago *Knud*. Após análises por bioensaio, essas amostras demonstraram teor neurotóxico. É importante ressaltar que, nas análises cromatográficas dessas amostras não foram detectadas as toxinas anatoxina-a e saxitoxinas, mas sim, um perfil cromatográfico semelhante ao da antx-a(s) (HENRIKSEN *et al.*, 1997).

No Brasil, a presença da antx-a(s) já foi reportada em duas ocasiões. A primeira foi no reservatório de Tapacurá-PE e, mais recentemente, no reservatório de Faxinal-RS (MOLICA *et al.*, 2005; BECKER *et al.*, 2010).

Atualmente o único gênero conhecido e publicado vinculado à produção de antx-a(s) é o gênero *Anabaena*. As espécies descritas na literatura como produtoras de antx-a(s) são *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17, *Anabaena lemmermannii*, *Anabaena spiroides* e *Anabaena crassa* (CARMICHAEL & GORHAM, 1978; HENRIKSEN *et al.*, 1997; MOLICA *et al.*, 2005; BECKER *et al.*, 2010)

Por outro lado, todos os eventos toxicológicos relacionados com antx-a(s) descritos relataram morte de animais (cães, diversos tipos de aves e porcos) após consumo de água contaminada com esta toxina (MAHMOOD *et al.*, 1988; ONODERA *et al.*, 1997, COOK, W. O. *et al.*, 1989a).

2.3.4 Mecanismo de ação da anatoxina-a(s)

Animais tratados com antx-a(s) podem apresentar efeitos colinérgicos (muscarínicos e/ou nicotínicos) através da inibição enzimática das colinesterases sanguíneas. Para o melhor entendimento do mecanismo de ação da antx-a(s) primeiramente é apresentada uma breve resenha das enzimas colinesterásicas.

2.3.4.1 Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase

Acetilcolinesterase (AChE) (E.C. 3.1.1.7) é uma glicoproteína tetramérica cuja unidade é um monômero globular de peso molecular relativo igual a 80000 Da. A estrutura quaternária da AChE pode ser apresentada em 6 diferentes formas, três globulares e três assimétricas (G1, G2, G4, A4, A8 e A12) (KERKUT, 1984).

Sabe-se que os dímeros podem ser formados a partir de ligações dissulfeto (S-S) entre monômeros e estes por sua vez, podem formar tetrâmeros que podem

estar associados a três caudas. Cada cauda pode se ligar a um tetrâmero via ligação S-S (BRIMIJOIN, 1983).

Após análises da estrutura tridimensional da AChE, observou-se que o sítio ativo estaria localizado na região central a uma distância simétrica da cada subunidade na base de um fino gargalo de aproximadamente 20 Å de profundidade. Na base deste gargalo estão os resíduos da tríade do sítio catalítico serina, histidina e glutamato. A AChE é uma das enzimas mais eficientes, ou seja, apresenta capacidade de hidrólise de 6 x 10^5 moléculas de acetilcolina por molécula de enzima por minuto (TAYLOR, 1985).

A AChE catalisa a reação de hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em ácido acético e colina. Além dessa função existem outras esterases capazes de hidrolisar a acetilcolina e outros ésteres de colina, como por exemplo, a butirilcolinesterase (BuChE) (E.C. 3.1.1.8) (AUGUSTINSSON, 1950). O monômero da BuChE possui PM de 85000 Da e sua estrutura quaternária pode ter formas semelhantes à AChE (KERKUT, 1984). Tanto a AChE como a BuChE pertencem ao grupo das “azolesterases” pela sua propriedade em hidrolisar ésteres em ácido e álcool nitrogenado (GLICK D., 1942 citado por AUGUSTINSSON, 1950). Ambas as enzimas, AChE e BuChE, são codificadas por diferentes genes e apresentam funções distintas (KERKUT, 1984). Dentre os locais que contêm altas concentrações de AChE estão o sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico (SNP), músculo estriado e eritrócitos. A BuChE é mais encontrada no soro sanguíneo (AUGUSTINSSON, 1950).

A figura 4 apresenta um esquema de sinapse neuromuscular mostrando as etapas envolvidas no processo de contração muscular de um músculo estriado e o local onde os inibidores das colinesterases interrompem este processo.

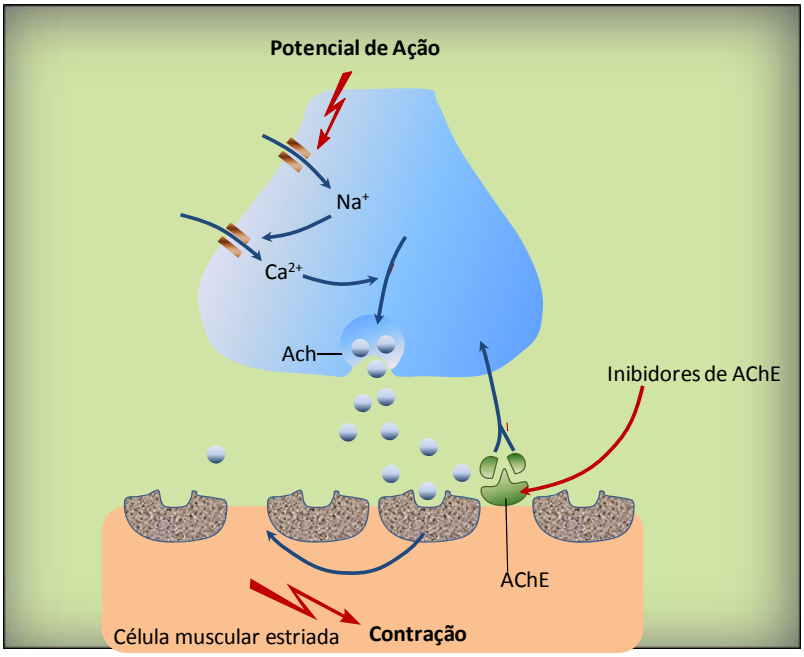


Figura 4. Esquema simplificado de uma sinapse neuromuscular estriada mostrando os componentes e as etapas envolvidas no processo de contração muscular (Fonte: LANG, 2006).

2.3.4.2 Toxicologia aguda e aspectos clínicos da anatoxina-a(s)

A antx-a(s) é um inibidor irreversível da AChE. Esta cianotoxina possui um mecanismo de toxicidade muito semelhante ao dos inseticidas organofosforados, sendo considerado o único organofosforado conhecido com atividade inibitória irreverssível da AChE de ocorrência natural em cianobactérias (CARMICHAEL, 1990). A dose letal média (DL_{50}) reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (WHO) para antx-a(s) é de 20 $\mu g.kg^{-1}$, quando administrada via intraperitoneal (i.p.) em camundongos (CHORUS & BARTRAM, 1999).

Os primeiros estudos farmacológicos realizados por CARMICHAEL (1982) já mostravam que extratos contendo antx-a(s) não produziam efeitos compatíveis com agentes agonistas colinérgicos ou bloqueadores neuromusculares. Desta maneira, foi possível concluir que a antx-a(s) age de maneira diferente à anatoxina-a. MAHMOOD & CARMICHAEL (1986) foram os primeiros pesquisadores que avaliaram o potencial toxicológico e o mecanismo de ação da antx-a(s). A partir deste trabalho puderam ser confirmadas experimentalmente as diferenças nos sinais de toxicidade apresentados pelos animais tratados com extratos de diferentes cepas

de *Anabaena flos-aquae* (CARMICHAEL & GORHAM, 1978; MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986). A antx-a(s) recebeu essa denominação em decorrência do nome do gênero de onde foi isolada pela primeira vez (o gênero *Anabaena*) e, devido à excessiva salivação viscosa observada em camundongos tratados com essa toxina. A partir deste sinal clínico característico fez-se referência à letra “S”, o qual diferencia a antx-a(s) da anatoxina-a (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986; RODRÍGUEZ *et al.*, 2006; WACKLIN *et al.*, 2009).

CHAN *et al.* (1992) foram os primeiros a observar efeitos muscarínicos e nicotínicos em roedores machos tratados com extrato purificado da cepa *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. Os sinais apresentados em animais tratados com antx-a(s) foram salivação, lacrimejamento, cromodacriorréia (lágrima marrom), incontinência urinária, diarréia, tremores, fraqueza muscular, fasciculação, convulsão, opistótono (rigidez e arqueamento acentuado das costas) e morte por parada respiratória (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986; COOK *et al.*, 1991). MAHMOOD & CARMICHAEL (1986) observaram que, as contrações involuntárias (fasciculações) nos membros inferiores de roedores previamente tratados com antx-a(s) permaneceram 1-2 minutos após a morte dos mesmos e, foram também dose-dependentes. Outras evidências que confirmaram o efeito anticolinesterásico da antx-a(s) foram obtidas a partir de estudos realizados em músculos isolados de sapo, pintainho (filhote de galinha) e rato, além do ensaio de inibição de colinesterase sérica em ratos tratados com antx-a(s) (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986).

Apesar de alguns trabalhos sugerirem o uso da atropina nos casos de intoxicação aguda por antx-a(s), ainda não existe um tratamento aceito. O uso de atropina é recomendado apenas como parte do tratamento, devido às altas doses necessárias (50 $mg.kg^{-1}$) e ao reduzido efeito protetor (apenas 2 minutos a mais de sobrevida) observado em rato (COOK *et al.*, 1990).

Por outro lado, estudos histopatológicos não revelaram nenhuma lesão tecidual no cérebro, nervo ciático, diafragma, pulmão, coração, baço, trato gastrointestinal, pâncreas, fígado ou rins de camundongos sacrificados após 24 h de tratamento com antx-a(s) (COOK *et al.*, 1991).

MAHMOOD & CARMICHAEL (1987) analisaram detalhadamente qual o tipo de inibição que a antx-a(s) exercia nas colinesterases de rato, bem como, as cinéticas de inibição *in vitro* da AChE de enguia elétrica e, da BuChE sérica de cavalo. De acordo com os resultados obtidos, estes autores propuseram que a antx-a(s) seria um inibidor irreversível não competitivo de AChE e que, essa inibição seguia uma cinética de primeira ordem. Segundo estes pesquisadores o esquema de inibição de AChE pela antx-a(s) seria semelhante ao diisopropilfluorfosfato (DPF), um inibidor irreversível que se liga na região esterásica do sítio ativo da AChE. O DPF inicialmente forma um complexo reversível enzima-substrato, seguido por uma etapa de fosforilação irreversível da enzima AChE. Vale salientar que, após estudos de reativação enzimática *in vivo* e *in vitro*, foi proposto que a antx-a(s) se ligaria às duas regiões (esterásica e iônica) presentes no sítio ativo da AChE (HYDE & CARMICHAEL, 1991). Porém estudos mais específicos são necessários para confirmar exatamente quais regiões da AChE se ligam a antx-a(s). A figura 5 mostra a hidrólise de antx-a(s) pela AChE proposta por HYDE & CARMICHAEL (1991).

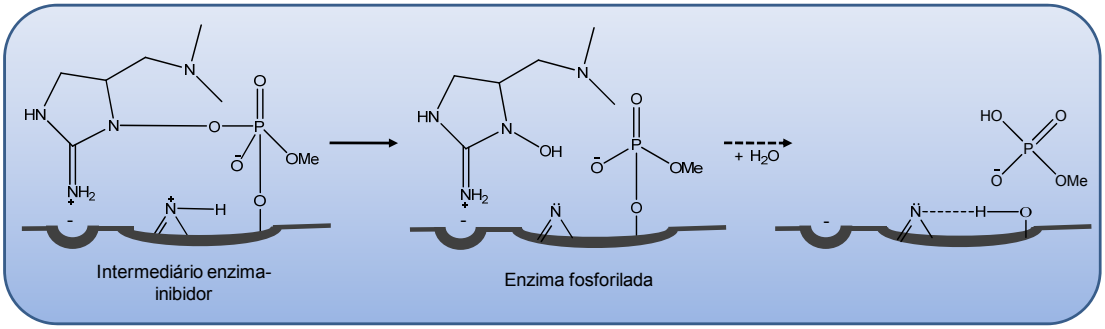


Figura 5. Hidrólise da anatoxina-a(s) produzida pela acetilcolinesterase. Mecanismo proposto por HYDE & CARMICHAEL (1991).

A irreversibilidade da inibição das colinesterases causada pela antx-a(s), assim como os possíveis agentes que permitissem revertê-la, continuou sendo objeto de pesquisa até início da década de 90. Um aspecto muito importante a ser considerado na intoxicação por organofosforados é a capacidade que os mesmos têm em atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e inibir a colinesterase cerebral (TAYLOR, 1985). A antx-a(s) demonstrou inibir fortemente as colinesterases

plasmática, eritrocitária e diafragmática de roedores, porém não inibiu a colinesterase cerebral (COOK *et al.*, 1988; COOK, W.O. *et al.*, 1989b; COOK *et al.*, 1991). Desta maneira chegou-se à conclusão de que a antx-a(s) estaria estritamente relacionada à inibição das colinesterases periféricas (COOK, W.O. *et al.*, 1989b).

Com relação à reativação enzimática, HYDE & CARMICHAEL (1991) demonstraram que o complexo formado entre a antx-a(s) e a AChE é tão estável que nenhuma das oximas analisadas (2-pralidoxima e trimedoxima) mostrou-se efetiva para reativar a colinesterase inibida. Ao ocupar as duas regiões do sítio ativo, a antx-a(s) provocaria mudanças na configuração da enzima tornando-a resistente à reativação por oximas (HYDE & CARMICHAEL, 1991).

Na tabela 2 estão descritos os parâmetros cinéticos de AChE de vários organismos após incubação com antx-a(s).

Tabela 2. Parâmetros cinéticos obtidos a partir da incubação da anatoxina-a(s) com acetilcolinesterase de diversos organismos.

Amostra	Parâmetro cinético	Fonte de AChE	Referência
Antx-a(s) purificada	$K_m = 2,2 \times 10^{-4}$ M $K_a = 0,5$ µg.ml^{-1}	*Electrophorus electricus*	MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986
Extrato de *Anabaena flos-aquae*	$k_i = 4 \times 10^5$ M^{-1}.min^{-1} $k_i = 2 \times 10^5$ M^{-1}.min^{-1} $k_i = 1,5 \times 10^5$ M^{-1}.min^{-1} $k_i = 1,8 \times 10^5$ M^{-1}.min^{-1} $k_i = 3,6 \times 10^5$ M^{-1}.min^{-1}	*Electrophorus electricus* Eritrócito humano Cavalo*** Nippostrongylus brasiliensis *Drosophila melanogaster*	VILLATTE *et al.*, 2002
Extrato de *Anabaena lemmermanni*	$k_is = 0,55 \times 10^6$ $k_is = 0,12 \times 10^6$ $k_is = 0,35 \times 10^6$	*Drosophila* *Electrophorus electricus* Mamífero (boi)	DEVIC *et al.*, 2002
Extrato de *Anabaena spiroides*	$K_m = 0,09 \pm 0,01$ nM (fração solúvel) $K_m = 0,10 \pm 0,01$ nM (fração solúvel em Triton X) $K_i = 3,6 \times 10^{-5}$ mg.l^{-1}.min^{-1} $K_a = 5,068,4$ mg.l^{-1} $K_p = 0,18$.min^{-1}	*Odontesthes argentinensis*	BARROS *et al.*, 2004

*2-PAM = 2-pralidoxima **TMB4 = Trimedoxima *** BuChE
K_i (Constante de inibição), k_{obs} (Taxa constante de reativação (*Rate Constant of Reactivation*), k_is (Taxa de inibição constante), k_i (Constante Bimolecular), K_m (Constante de Michaelis-Menten), K_a (Constante de afinidade), K_p (Constante de fosforilação).

2.3.4.3 Comparação da anatoxina-a(s) com inseticidas organofosforados

A partir da descoberta de que os extratos da cepa *Anabaena flos-aquae* apresentaram atividade inibitória da AChE, tanto *in vivo* como *in vitro*, alguns trabalhos foram publicados comparando os sinais clínicos, a capacidade anticolinesterásica e a reversibilidade da inibição das colinesterases entre antx-a(s), inseticidas organofosforados e carbamatos (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986; COOK *et al.*, 1988; COOK, W. O. *et al.*, 1989; COOK *et al.*, 1991).

A antx-a(s) apresentou capacidade inibitória e irreversibilidade da inibição das colinesterases (eritrocitária, plasmática e diafragmática) maior ou igual ao paraoxon, um dos organofosforados mais conhecido pelo seu potencial inibitório (COOK *et al.*, 1991). Os sinais clínicos nos roedores tratados com antx-a(s), paraoxon e dois carbamatos (fisostigmina e piridostigmina) foram iguais ou mais persistentes nos animais tratados com antx-a(s) quando comparados aos animais tratados com paraoxon (COOK *et al.*, 1988; COOK *et al.*, 1991).

A incapacidade da antx-a(s) em atravessar a BHE também foi comprovada mediante comparação da atividade da AChE cerebral de roedores tratados com os mesmos agentes mencionados acima (COOK *et al.*, 1988).

A figura 6 mostra um esquema simplificado do mecanismo de hidrólise da acetilcolina pelas colinesterases, bem como o mecanismo de inibição destas enzimas por um inseticida organofosforado.

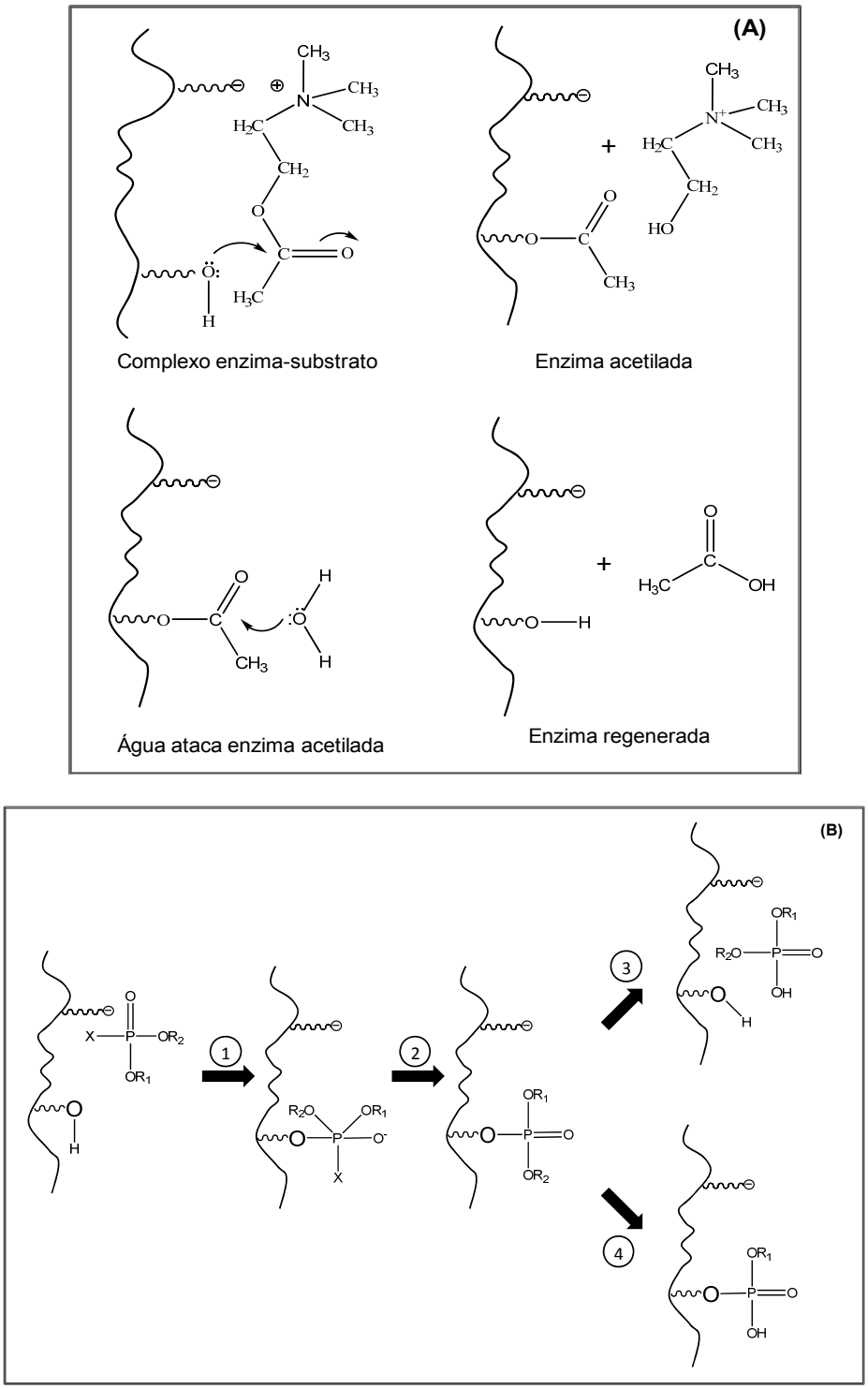


Figura 6. (A) Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pelas colinesterases. (B) Mecanismo de inibição da uma colinesterase por um inseticida organofosforado. 1) Interação do organofosforado com o sítio esterásico da enzima colinesterase, 2) Perda do grupamento –X do organofosfato, 3) Regeneração da enzima colinesterase 4) Complexo altamente estável do organofosforado com a enzima (Adaptado de MÍDIO & SOARES, 1995).

2.3.4.4 Toxicocinética e toxicodinâmica da anatoxina-a(s)

Em decorrência de certas limitações como a indisponibilidade de amostras de antx-a(s) para ensaios toxicológicos e a instabilidade da molécula, até os dias atuais não existe nenhum estudo referente à toxicocinética (absorção, biotransformação e excreção) e toxicodinâmica da antx-a(s). COOK *et al*. (1989a) administraram extrato contendo antx-a(s) e paraoxon via intraperitoneal em roedores e depois estudaram várias regiões do cérebro. Os resultados obtidos apontaram que, embora o metabolismo da antx-a(s) seja reduzido no cérebro, essa toxina pode ser absorvida pela cavidade intraperitoneal, atingindo outros sítios em quantidades suficientes para causar inibição das colinesterases sanguíneas, seguido de alteração dos sinais clínicos e morte. Embora a via oral seja a indicada para os estudos de toxicidade aguda de xenobióticos outras vias de administração como a via intraperitoneal (i.p.), subcutânea, intramuscular e endovenosa também são frequentemente utilizadas (ROZMAN & KLAASSEN, 2001).

2.3.4.5 Outros efeitos produzidos pela anatoxina-a(s)

Diversas concentrações de extratos contendo antx-a(s) (0,5 a 2 $mg.ml^{-1}$) mostraram-se não mutagênicas pelo teste de Ames em cepas de *Salmonella* TA 98, 100 e 102, com e sem ativação metabólica (REPAVICH *et al.*, 1990).

Com relação aos efeitos causados em outros organismos, o extrato algal da espécie *Anabaena spiroides* coletado num reservatório de Caxias do Sul-RS, Brasil, inibiu a atividade da enzima AChE de peixe (*Odonthestes argentinensis*) e de caranguejo (*Callinectes sapidus*), ambos *in vivo* e, de *Electrophorus electricus in vitro*. Embora a presença da antx-a(s) não tenha sido confirmada nesses extratos por técnicas mais precisas como espectrometria de massas, suspeitou-se da presença da antx-a(s) nas amostras coletadas em função da inibição da AChE (MONSERRAT *et al.*, 2001).

2.3.4.6 Métodos de detecção da anatoxina-a(s)

A detecção da antx-a(s) tanto em amostras biológicas (sangue, tecidos, urina, etc.) como ambientais (água, florações) apresenta vários obstáculos a serem

superados. Do ponto de vista analítico, fatores como a instabilidade da molécula em meio alcalino (pH > 8,5), temperatura acima de 40°C, carência de um grupo cromóforo e de um padrão analítico comercial, tornam o desenvolvimento de métodos que permitam a identificação e quantificação dessa toxina um grande desafio. Mesmo assim, existem algumas ferramentas disponíveis e que podem ser aplicadas na detecção da antx-a(s). As metodologias utilizadas para este fim variam desde técnicas convencionais, como bioensaios e métodos colorimétricos de inibição da colinesterase, até técnicas mais seletivas e modernas, tais como biosensores específicos, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD), Espectrometria de Massas (FABMS, MS/MS) e NMR (CARMICHAEL, 1982; MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986; MATSUNAGA *et al.*, 1989; VILLATTE *et al.*, 2002; DEVIC *et al.*, 2002; DÖRR, F. *et al.*, 2010). Apesar dos avanços tecnológicos para a identificação da antx-a(s), atualmente a principal dificuldade para a quantificação da mesma é a inexistência de um padrão analítico comercial (DÖRR, F. *et al.*, 2010).

2.3.4.7 Possível aplicação da anatoxina-a(s)

As cianobactérias representam uma fonte biológica relativamente pouco explorada de uma grande diversidade de metabólitos secundários muito semelhantes aos compostos de origem animal e vegetal (NAMIKOSHI & RINEHART, 1996). Alguns metabólitos de cianobactéria vêm sendo estudados como fonte importante de compostos farmacológicos ativos, pigmentos, suplementos alimentares, entre outros (PRASANNA *et al.*, 2010).

Os inseticidas organofosforados e carbamatos são amplamente utilizados no controle de pragas tanto no interior das residências como ao ar livre. Nesse sentido, o combate a proliferação das baratas tem se tornado um desafio, já que é uma praga comumente encontrada no interior de residências e em quase todo tipo de ambientes (MA & CHANG, 2007). A preocupação com as baratas se deve ao fato destes organismos serem disseminadores de uma diversidade de agentes patogênicos (PAI *et al.*, 2005). Além do mais, cada vez aumenta o número de populações de baratas e outros insetos que desenvolveram resistência a inseticidas.

Sendo assim, a pesquisa de novos inseticidas livres de resistência e menos tóxicos para os outros organismos e para o ser humano é de grande interesse e bastante aceita na comunidade científica (POLSINELLI *et al.*, 2010).

Em função da AChE ser a principal esterase responsável pela hidrólise da acetilcolina tanto em organismos vertebrados como invertebrados, são vários os pesquisadores que usam o modelo de bioensaio em coração de baratas para avaliação dos efeitos de venenos, agentes farmacológicos, neurotransmisores e inseticidas organofosforados (NACHMANSOHN & ROTHENBERG, 1945; MILLER & METCALF, 1968a e b; SCHAEFER & MILES, 1970; MAJORI *et al.*, 1972; KLOWDEN *et al.*, 1992). Considerando a semelhança no mecanismo de ação da antx-a(s) e os inseticidas organofosforados comerciais é possível considerar sua aplicação no controle de insetos, por exemplo.

2.4 Estresse Oxidativo

Embora o termo estresse oxidativo (EO) seja amplamente utilizado na literatura ele ainda não foi claramente definido. Em 1997, SIES introduziu o termo EO e o definiu como “o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes com predomínio dos agentes pró-oxidantes, ocasionando um potente dano oxidativo”. SIES foi claro ao destacar que o conceito que ele mesmo propôs precisava ser melhorado, já que nem todos os danos produzidos pelo EO são do tipo oxidativo (AUGUSTO, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). HALLIWELL & GUTTERIDGE (2007) definem EO em duas formas. A primeira definição aponta o EO como “o dano molecular causado pelo ataque de espécies reativas sobre os constituintes dos organismos vivos” e a segunda como “o desequilíbrio metabólico em que a condição pró-oxidante predomina, em relação à antioxidante.” De qualquer maneira, o raciocínio acaba sendo o mesmo pois ambos levam em consideração o estado de desequilíbrio celular pelas condições que promovem alteração do sistema redox.

Basicamente o EO pode ser resultado de duas condições, as quais podem se apresentar de forma independente ou concomitante. A primeira condição é a redução nos níveis de antioxidantes ocasionada por (i) mutações, as quais são responsáveis

pela diminuição nos níveis de defesas antioxidantes, como por exemplo glutationa ou superóxido dismutase ou (ii) pela diminuição da ingesta de antioxidantes na dieta. A segunda causa é o aumento na produção de espécies reativas devido à exposição a elevadas concentrações de O_2 ou toxinas que produzem espécies reativas. Dentre as principais consequências que o EO pode acarretar estão o aumento da proliferação celular, adaptação das células ou organismos através do estímulo dos sistemas de defesa, lesão celular pelo dano a biomoléculas (DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos), senescência (perda da capacidade de divisão celular) e morte celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Os processos de sinalização redox envolvem diferentes moléculas sensíveis e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS, respectivamente). Dentra as principais ROS e RNS estão o ânion superóxido $O_2^{\bullet -}$, peróxido de hidrogênio H_2O_2, oxigênio singlete O_2 ($^1\Delta_g$), radical hidroxila $HO^\bullet$, óxido nítrico $NO^\bullet$, NO_3, NO_2, peroxinitrito $ONOO^{\bullet -}$ e 3-nitrotirosina (BOVE & VAN DER VLIET, 2006; FILOMENI & CIRIOLO, 2006). Vale salientar que, apesar das ROS e RNS muitas vezes serem conhecidas somente pelos seus efeitos deletérios sobre as células, essas espécies também podem exercer uma função protetora como moléculas sinalizadoras em diferentes processos celulares (FILOMENI & CIRIOLO, 2006).

2.4.1 Sistema de defesa antioxidante

Tendo em vista que, mesmo durante o metabolismo celular normal, as espécies reativas são continuamente geradas em baixas concentrações, os organismos desenvolveram um sistema de defesa que permite o controle e remoção dessas espécies (TORRES, 2009). O sistema de defesa antioxidante compreende (i) agentes que removem cataliticamente as espécies reativas como as enzimas superoxido dismutase (SOD), superoxido redutase, catalase e peroxidases, (ii) agentes que diminuem a formação de espécies reativas, como a proteína ceruloplasmina que minimiza a disponibilidade de agentes pró-oxidantes, (iii) proteínas que protegem as biomoléculas contra o dano oxidativo por outros mecanismos, (iv) a “supressão” física das espécies reativas, como por exemplo, a supressão do oxigênio singlete pelos

carotenóides e (v) a substituição de moléculas sensíveis ao dano oxidativo por moléculas mais resistentes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A descoberta da enzima SOD (E.C. 1.15.1.1) foi muito importante para compreender o mecanismo de defesa enzimático antioxidante. A SOD foi isolada pela primeira vez no final da década de trinta em sangue de bovinos, porém somente em 1969 MCCORD & FRIDOVICH descobriram que essa enzima seria capaz de eliminar o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Em 1970 descobriu-se que, a SOD contem íons cobre (Cu^{+2}) e zinco (Zn^{+2}) em seu sítio ativo (daí originou-se o nome da isoforma da enzima, CuZnSOD) e que ela apresenta PM de 32000 Da. Esta enzima está presente em quase todas as células eucarióticas. Em mamíferos, foi isolada de eritrócitos, coração, cérebro, fígado e músculo esquelético (MCCORD & FRIDOVICH, 1969). Nas células animais, a enzima CuZnSOD está presente principalmente nos lisossomas, no núcleo e no espaço intermembrana da mitocondria e nos peroxissomas. Atualmente, são conhecidas outras três isoformas da SOD (MnSOD, FeSOD, NiSOD), as quais se diferenciam entre si pelo íon presente no sítio ativo e pela sua massa molecular. Apesar dessa diferença, todas elas têm como função catalisar a reação de dismutação do $O_2^{\bullet -}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio no estado fundamental (O_2) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O H_2O_2 gerado na reação de dismutação, por sua vez, é consumido e transformado em água (H_2O) através das enzimas catalase (CAT) ou glutationa peroxidase (GPx). Vale salientar que, quando existe uma superprodução de H_2O_2 ou deficiência da CAT ou GPx, na presença de íons ferro ou cobre, o H_2O_2 pode formar radical $OH^{\bullet}$ através da reação de Fenton, conforme descrito na figura 7 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A enzima CAT (E.C. 1.11.1.6) é uma hemeproteína cuja função é catalisar especificamente a decomposição do H_2O_2 em O_2 e H_2O. A maioria dos organismos aeróbicos contém CAT e ela está presente em elevadas concentrações no fígado e eritrócitos. Nos eritrócitos a CAT ajuda a protegê-los do H_2O_2 gerado a partir da auto-oxidação da hemoglobina (WINTERBOURN & STERN, 1987). Nas células animais (exceto em eritrócitos) e vegetais a CAT se encontra nas organelas sub-

celulares ligadas à membrana do peroxissoma (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A enzima GPx (E.C. 1.11.1.9) foi descoberta em meados da década de 50 (1957) em tecido de animais, sendo menos comuns em plantas ou bactérias. A GPx é a enzima responsável pela catálise da redução do H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos com concomitante oxidação da glutationa reduzida (GSH). Existem ao menos quatro tipos de GPx (GPx1, GPx2, GPx3 e GPx4) distribuídas em vários tecidos. As GPx contêm um resíduo de selenocisteína no seu sítio ativo (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A enzima GR (E.C. 1.6.4.2) foi descrita pela primeira vez em 1951. Posteriormente descobriu-se que ela possui a coenzima flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ligada ao seu sítio ativo em cada uma de suas duas subunidades. A função desta enzima é manter a concentração intracelular de glutationa reduzida (GSH). A GR cataliza a redução de uma molécula de GSSG em duas moléculas de GSH com participação da coenzima NADPH (GOLDBERG DM & SPOONER RJ, 1983; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A Figura 7 mostra a reação de Fenton e as principais reações catalisadas pelas enzimas descritas acima.

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 \text{ ou } ROOH + 2GSH \xrightarrow{GPx} 2H_2O \text{ ou } ROH + GSSG$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow OH^- + {}^{\cdot}OH + Fe^{3+} \text{ (Rx. Fenton)}$$

Figura 7. Reações químicas catalizadas pelas principais enzimas de defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx e GR) responsáveis pelo controle dos níveis das espécies reativas de oxigênio e GSH e, reação de Fenton.

Entre as substâncias que fazem parte do sistema não-enzimático de defesa antioxidante estão a glutationa ou glutationa reduzida (GSH), vitamina C, vitamina E,

carotenóides, flavonóides, bilirrubina, ácido úrico e tióis. Além destes, existem os compostos fenólicos que são abundantes em vegetais e ajudam a atenuar danos oxidativos (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Ressalta-se o papel da GSH como principal antioxidante intracelular. A GSH é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glutamato (Glu), cisteína (Cis) e glicina (Gli) e, está presente em altas concentrações (da ordem de 5 a 10 mM) em todas as formas de vida e na maioria das células de mamíferos. No organismo, quando se tem um aumento na produção celular de radicais livres, a GSH é rapidamente oxidada a dissulfeto de glutationa ou glutationa oxidada (GSSG). Daí a importância de se manter elevada a concentração intracelular de GSH. A capacidade antioxidante da GSH se deve ao grupo sulfidrila (SH) do aminoácido cisteína que se oxida facilmente, agindo como um agente redutor celular (AUGUSTO, 2006).

2.4.2 Cianotoxinas e estresse oxidativo

A capacidade que as cianotoxinas têm em ocasionar o aumento de ROS e, consequentemente induzir EO em plantas, algas, organismos aquáticos e terrestres, tem sido um tópico muito investigado nos últimos anos.

Efeitos negativos no crescimento e na fisiologia de plantas agrícolas irrigadas com água contaminada contendo cianobactérias foi demonstrado por PFLUGMACHER *et al*. (2006). Embora a maioria dos trabalhos publicados com relação ao poder pró-oxidante das cianotoxinas em organismos terrestres e aquáticos sejam referentes ao grupo das toxinas microcistinas, existem também outras evidências de que as cianotoxinas nodularina e anatoxina-a são capazes de desencadear aumento no sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (MITROVIC *et al.*, 2004; DEWES *et al.*, 2006; PFLUGMACHER *et al.*, 2006; PFLUGMACHER *et al.*, 2007; AMADO & MONSERRAT, 2010; PEUTHERT & PFLUGMACHER, 2010). Porém, até o momento não há nenhum trabalho na literatura sobre a antx-a(s) relacionado à sua capacidade pró-oxidante nos organismos.

2.4.3 Inseticidas organofosforados e estresse oxidativo

O termo organofosforado é usado genericamente incluindo todos os inseticidas obtidos através da reação entre o ácido fosfórico e seus homólogos com diferentes alcoóis (MÍDIO & SOARES, 1995). Os inseticidas organofosforados (IOF) podem induzir ao EO por meio da geração de radicais livres e aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante (ALY *et al.*, 2010). Até meados da década de 90 considerava-se que o principal mecanismo de toxicidade dos IOF, em intoxicações agudas, era a capacidade de se ligar de forma irreversível à enzima AChE. A inibição dessa enzima certamente desempenha um papel importante na toxicidade dos IOF. Contudo, há relatos indicando que esse mecanismo seria muito mais complexo (KOVACIC, 2003).

A intoxicação aguda por IOF pode causar um aumento na formação de ROS provocando um desequilíbrio na homeostase celular e EO, tanto em humanos quanto em animais (AKHGARI *et al.*, 2003; POSSAMAI *et al.*, 2007). Alguns trabalhos demonstraram que o EO também desempenharia um papel importante na toxicidade dos IOF. Recentemente, antioxidantes como as vitaminas C e E, têm sido utilizados para auxiliar no combate às ROS geradas por IOF, como por exemplo, o malation e o dimetoato (ABDALLAH *et al.*, 2010; EL-SHENAWY *et al.*, 2010). YANG *et al.* (1996) sugeriram que a inibição da AChE tem início com o acúmulo de ROS, ocasionando um aumento na lipoperoxidação.

A peroxidação lipídica é um dos processos mais ligados aos danos nas biomoléculas. Este processo compreende três fases, sendo que a primeira inicia-se com a remoção de um hidrogênio de um ácido graxo insaturado de lipídio por um radical reativo (como por exemplo, o radical hidroxila) formando um radical lipídio ($^{\bullet}L$) (fase de iniciação). Na segunda fase, este radical reage com o oxigênio molecular e forma um radical peroxila ($LOO^{\bullet}$) que pode remover um hidrogênio de outro lipídio, formando um hidroperóxido lipídio (LOOH) e outro $^{\bullet}L$. Esse último reage com o oxigênio molecular promovendo novamente a sequência de reações descrita acima (fase de propagação). Na terceira fase conhecida como fase de terminação, dois radicais podem combinar entre si e formar um não radical (AUGUSTO, 2006). O dano celular é produzido através da oxidação de biomoléculas fundamentais como lipídeos

de membrana, proteínas e ácidos nucléicos com ROS e RNS. Como consequência podem ser observadas alterações drásticas na conformação nativa protéica, bem como em sua função biológica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

KOVACIC (2003) sugeriu que a capacidade dos IOF em produzirem ROS seria em função da atividade cíclica redox (*redox-cycling activity*) destes compostos. Esta propriedade redox faz com que, os IOF sejam aceptores de elétrons ocasionando assim, a geração de radicais livres. Esses radicais livres formados transfeririam esses elétrons ao oxigênio gerando ROS como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e $^{\bullet}OH$ (KOVACIC, 2003). Segundo VIDYASAGAR *et al*. (2004) a justificativa dos IOF produzirem EO estaria relacionada às mudanças na homeostase antioxidante, a qual resultaria numa depleção dos sistemas antioxidantes cuja capacidade de defesa seria ultrapassada pela excessiva formação de radicais livres.

É sabido que a AChE participa na manutenção da integridade da membrana celular. Portanto, a inibição desta enzima também provocaria uma deformação nas membranas celulares. A AChE está ligada à membrana do eritrócito e é altamente suscetível à lipoperoxidação, decorrente da presença do íon ferro (Fe^{2+}) e do O_2 na hemoglobina. Como comentado anteriormente, as ROS são espécies que por si só podem produzir alterações nos fosfolipídeos de membrana, seja pela reação de Fenton ou pelo ganho de um elétron, deixando a membrana eritrocitária ainda mais suscetível (DATTA *et al.*, 1994).

Considerando as informações obtidas de que, tanto algumas cianotoxinas como alguns IOF são capazes de promover EO em diferentes organismos, estudos que permitam o conhecimento deste efeito da antx-a(s) se fazem necessários. Um dos escopos desta tese foi verificar se a antx-a(s) também exerceria efeito pró-oxidante em dois organismos diferentes (camundongos e sementes). A avaliação da capacidade do extrato contendo a antx-a(s) de promover EO em sementes torna-se importante ao considerar o fato de que águas contaminadas com a toxina podem estar sendo utilizadas para irrigar plantações de alimentos a serem consumidos tanto pelo homem quanto pelos animais. Todavia, considerando a capacidade de inibição da AChE pela antx-a(s), também avaliou-se o efeito dessa toxina em coração semi-isolado de baratas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito pró-oxidante de extratos de cianobactérias contendo anatoxina-a(s) no sistema enzimático de defesa antioxidante de camundongos *Swiss* e de sementes de alfafa *Medicago sativa* L., bem como, avaliar o efeito destes extratos em coração de baratas *Leurolestes circunvagans* (Blattodea).

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

i. Desenvolver um método para extração e purificação da antx-a(s) a partir de cultura de cianobactérias;

ii. Desenvolver um método analítico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para detecção e identificação da antx-a(s);

iii. Estudar os sinais clínicos apresentados em camundongos tratados com diferentes doses de extrato contendo antx-a(s);

iv. Avaliar a atividade locomotora geral e comportamental de animais tratados via i.p. com uma dose sub-letal de extrato contendo antx-a(s) nos modelos Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado após diferentes tempos de exposição;

v. Avaliar a atividade das enzimas colinesterásicas (AChE e BuChE) em camundongos tratados via i.p. com uma dose sub-letal do extrato contendo antx-a(s) após diferentes tempos de exposição;

vi. Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GPx, GR e SOD) em camundongos tratados via i.p. com uma dose sub-letal do extrato contendo antx-a(s) após diferentes tempos de exposição;

vii. Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes em sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.) irrigadas com diferentes concentrações de extrato contendo antx-a(s) durante 7 dias;

viii. Avaliar a frequência cardíaca em baratas *Leurolestes circunvagans* expostas a diferentes concentrações do extrato contendo antx-a(s).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos

Autoclave vertical (Mod. 415, Fanem®); balança analítica (Mod. APX-60, Denver Instrument); banho-maria (mod. TE-054 MAG, Tecnal); câmara de Neubauer (Optik Labor); centrífuga e microcentrífuga refrigeradas (Mod. 5804R e Mod. 5415R, respectivamente, Eppendorf®); pHmetro (MPA-210, Solumix); vortex Genie 2 (mod. G560, Scientific Industries); microscópio óptico (Primo Star, Zeiss); fluxo laminar (Mod. PA620, Pachane Linha 600); programa de análise de imagem Ethovision® Pro-Color 1.9 (Noldus Information Technology); liofilizador (Mod. L101, Liotop); HPLC (Shimadzu Co., Japão), espectrômetro de massas (Esquire HCT, Bruker Daltonics, MA, USA); incubadoras de cultura (Mod. Te-401, Tecnal); probe de sonicação (Mod. 475, Virtis Virsonic); Speed Vac (Mod. SPD 1010-115, Thermo Electron Corporation®); sistema de vácuo para extração em fase sólida (Supelco®); cartuchos de extração em fase sólida (SPE) Sep-Pack C18 e Sep Pack de sílica da Waters (Milford, Massachusetts); espectrofotômetros (Mod. Libra S12, Biochrom e Power Wave X340, Bio-Tek Instruments, Inc).

4.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza. Todos os sais usados foram grau analítico obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A água utilizada foi do tipo ultra-pura. Todos os solventes utilizados foram grau cromatográfico obtidos da JT Baker (Phillisburg, Nova Iorque, USA). Os agentes utilizados na anestesia foram cloridrato de ketamina 0,116 $g.ml^{-1}$ – Dopalen® (Vetbrands, Jacareí, Brasil) e cloridrato de xilazina 2% - Calmiun® (Agener União, Embu-Guaçu, Brasil). A heparina foi adquirida da Roche (Basiléia, Suiça). Padrão de Malation - Pestanal® foi obtido da Riedel-de-Haën (Seelze-Alemanha) e o padrão de triclorfon 97% - Neguvon® da Bayer (Pymble-Australia).

4.2 Escolha das linhagens de *Anabaena spiroides*

Neste trabalho foram utilizadas três linhagens (ITEP24, ITPE25 e ITE26) de cianobactéria classificadas como *Anabaena spiroides (*MOLICA *et al.*, 2005), isoladas do reservatório Tapacurá – PE, Brasil, gentilmente cedidas pelo professor Renato José Reis Molica, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. As linhagens são mantidas na coleção de culturas do Laboratório de Produtos Naturais e Toxinas de Algas do Departamento de Análisis Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). A produção de antx-a(s) por estas linhagens foi caracterizada por bioensaios em camundongos, ensaios de inibição de AChE *in vitro* e LC-MS/MS (MOLICA *et al.*, 2005; DÖRR, F. *et al.*, 2010). Cabe salientar que as linhagens ITEP24 e ITEP26 estão em proceso de reclassificação através de técnicas moleculares.

4.3 Animais utilizados

4.3.1 Camundongos

Neste trabalho foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss*, com aproximadamente 40-50 dias de vida (peso 25-35 g) provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram alojados em grupos de dois ou três, em gaiolas de polipropileno com tampas de arame zincado medindo 30 x 20 x 13 cm, forradas com maravalha autoclavada. Os camundongos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 3ºC) e ciclo de iluminação de 12 horas claro-escuro. Água filtrada e ração comercial foram fornecidas *ad libitum*. Antes do início de cada experimento, os animais passaram por um período de aclimatação de 7 dias. Todos os experimentos realizados em camundongos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEEA-FCF-USP) em 12 de março de 2007 (Protocolo CEEA nº 137) (ANEXO I). Foram atendidas as sugestões da *Environmental Protection Agency* (EPA) com relação à utilização inicial de somente um ou dois animais nos testes iniciais de toxicidade aguda (EPA, 2002).

4.3.2 Baratas

Baratas adultas da espécie *Leurolestes circunvagans* fornecidas pela Nutrinsecta Criação e Comercio de Insetos Ltda. foram mantidas em laboratório, em gaiola de polipropileno, em temperatura ambiente e ciclos de 12 h claro - 12 h escuro. Água de torneira (em algodões umedecidos) e ração comercial para filhote de cachorro foram fornecidos *ad libitum*. Os animais passaram por um período de aclimatação de 5 dias antes de se iniciarem os experimentos.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Manutenção das linhagens *Anabaena spiroides*

O meio utilizado na cultura das linhagens *Anabaena spiroides* foi o meio ASM-1 descrito por GORHAM *et al*. (1964). As culturas foram mantidas em tubos de ensaio de 25 ml e frascos Erlenmeyer de 0,5 e 2 l, em meio esterilizado, pH inicial 8,0, sem aeração, temperatura de 25 ± 2 ºC, sob intensidade luminosa de 22 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} e fotoperíodo de 12 h, em incubadoras (Figura 8). Todas as condições acima citadas foram mantidas ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 8. Sistema de cultura das linhagens de *Anabaena spiroides* em incubadora com temperatura e luz controlada

4.4.1.1 Obtenção de biomassa da linhagem *Anabaena spiroides* ITEP26

As três linhagens cultivadas (ITEP24, 25 e 26) foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 2 l, como descrito acima. Alíquotas foram retiradas de cada uma das culturas, nos tempos 0, 5, 15 dias, para verificação da variação do crescimento celular, neste período. Foram contados os filamentos nos quatro quadrantes das extremidades do retículo da câmara de Neubauer destacados na figura 9. Todas as contagens foram realizadas em duplicata. Para o cálculo do número de filamentos.ml^{-1} foi considerado um volume de 0,0001 ml para cada quadrante, aplicando-se a fórmula descrita a seguir:

$$\text{No. filamentos.ml}^{-1} = \frac{\text{No. total de filamentos}}{\text{No. de quadrantes contados}} \times 10000$$

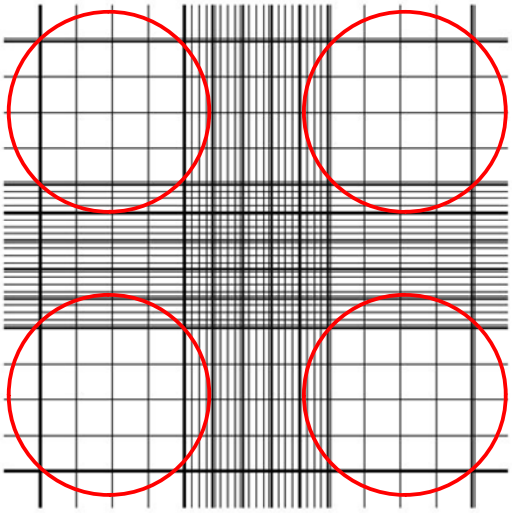


Figura 9. Reticulo da câmara de Neubauer com os quatro quadrantes das extremidades, onde foi realizada a contagem dos filamentos, destacados em círculos vermelhos.

Como não houve diferenças estatítiscas entre a variação do número de células, comparando as diferentes linhagens (ANOVA, Test de Dunn; $P>0.05$), foi escolhida apenas a linhagem ITEP026, para elaboração de uma curva de crescimento. O período da fase exponencial de crescimento foi definido traçando uma tangente na curva de crescimento obtida com a plotagem do número de filamentos por ml (eixo X) vs o tempo de contagem (eixo Y). O crescimento foi avaliado através do cálculo do fator "r" que representa a taxa instantânea ou intrínseca de crescimento (REYNOLDS, 2006). As fórmulas utilizadas no cálculo deste fator estão representadas a seguir:

$$r = \mu - m \quad ; \quad \mu = \frac{\ln (N_t/N_0)}{\Delta t}$$

Onde:

μ = Taxa de crescimento específico.dia^{-1}

m = Taxa de mortalidade da população

N_t = Número de filamentos no final da fase exponencial de crescimento

N_0 = Número de filamentos no início da fase exponencial de crescimento

Δt = Intervalo de tempo em dias da fase exponencial de crescimento

Partindo do principio de que a taxa de mortalidade na fase exponencial de crescimento é nula (0), a taxa de crescimento instantânea (r) foi considerada nominalmente igual à taxa de crescimento específico (μ) (REYNOLDS, 2006).

4.4.2 Identificação da anatoxina-a(s)

A identificação de antx-a(s) foi realizada usando a metodologia desenvolvida ao longo deste trabalho pelo doutorando Felipe Dörr (DÖRR, F. *et al.*, 2010). As etapas de preparo de amostra para obtenção de um extrato com elevado teor de antx-a(s), assim como, a avaliação de algumas condições cromatográficas foram realizadas em conjunto. Os detalhes do sistema LC-MS utilizado (Shimadzu-Bruker) estão descritos no quadro 1.

Quadro 1. Descrição dos componentes do equipamento HPLC Shimadzu utilizado na identificação de antx-a(s).

Componentes	Descrição
Controlador	CBM-20ª
Bombas	LC-20AD
Forno	CPO-20ª
Aplicativo	CLAS-VP
Detector	Espectrômetro de massas Modelo Esquire HCT- fonte de ionização *electrospray* – analizador *ion trap*

4.4.2.1 Determinação da anatoxina-a(s) por LC-MS

Para determinação da produção da antx-a(s) pelas diferentes linhagens de *A. spiroides* utilizadas neste estudo, foram desenvolvidos e testados cinco protocolos diferentes. De modo a facilitar o entendimento, diminuir a omissão de etapas importantes dos procedimentos adotados e permitir a reprodutibilidade será minuciosamente descrito, e em forma de tópicos, cada um dos protocolos avaliados neste estudo.

4.4.2.1.1 Protocolo 1

1- Trinta miligramas de células liofilizadas das três linhagens cultivadas foram ressuspensos em 5 ml da mistura dos solventes CH_3CH_2OH:H_2O (2:8, v/v) acidificada com HCOOH 0,1 M (pH da solução em torno de 2-3).

2- As células ressuspensas foram submetidas ao ultrasom (1 min de pulsação durante 3 min com intervalo de dois minutos entre cada pulsação) e centrifugadas (6300 *g*, 10 min, 15°C).

3- Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado. Para garantir a completa lise celular e recuperação de antx-a(s), a extração foi repetida mais duas vezes, com a adição da solução descrita acima, sobre o material precipitado.

4- Os sobrenadantes foram combinados e concentrados, sob vácuo, no sistema *Speed Vac*, até redução de 90% do volume inicial dos sobrenadantes combinados.

5- Os extratos obtidos foram filtrados em filtros de nylon (Millipore 0,45 µm) e analisados por LC-MS. Este mesmo procedimento foi repetido, variando o ácido e pH da solução de extração (HCOOH foi substituído por CH_3COOH 0,1M, pH 3).

6- Durante as análises por LC-MS foi determinado e isolado o pico que apresentara o íon *m/z* 253 (PM da antx-a(s) [252 + H^+]) para obtenção do espectro de massas MS^2.

Condições cromatográficas

As amostras foram analisadas em coluna cromatográfica: Synergy Polar® 4 µm – RP 80 Å 150 x 2.0 mm utilizando duas fases móveis. Fase móvel 1: (A) $HCOONH_4$ 10 mM + 0,01% HCOOH e (B) Acetonitrila (ACN) 100%; fase móvel 2: (A) $HCOONH_4$ 10 mM + 0,01% HCOOH e (B) Metanol (MeOH) 100%. Três gradientes foram testados. Os gradientes I e II foram testados com a fase móvel 1 e o gradiente III com a fase móvel 2. O detalhe dos três gradientes testados na analise das amostras preparadas usando este protocolo está descrito no quadro 2.

Quadro 2. Gradientes utilizados na análise por HPLC-MS dos extratos contendo anatoxina-a(s) preparados utilizando o protocolo 1 descrito no item 4.4.2.1.1.

	Tempo (min)	*% Fase móvel A*	*% Fase móvel B*
Gradiente I	0	90	10
	5	90	10
	12	20	80
	12,5	90	10
	15	90	10
Gradiente II	0	100	0
	5	100	0
	7	90	10
	12	20	80
	14	20	80
	14,5	100	0
	17	100	0
Gradiente III	5	95	5
	7	80	20
	8	20	80
	10	20	80
	11	95	5
	15	95	5

Assim também, foi coletado o pico que apresentou o íon *m/z* 253 (PM da antx-a(s) [252 + H^+]) obtido aos 6 minutos de tempo de retenção da análise do extrato, usando a fase móvel 2 e gradiente III.

4.4.2.1.2 Protocolo 2

1. Cem miligramas de células liofilizadas foram ressupensas em 5 ml da solução extratora (mistura de solventes CH_3CH_2OH:H_2O 2:8 v/v, pH=4, acidificada com CH_3COOH 0,1M).
2. Os extratos foram submetidos ao ultrasom (1min de pulsação durante 3 min com intervalo de dois minutos entre cada pulsação) e centrifugados (6300 *g*, 10 min, 15°C).
3. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado. Para garantir a completa lise celular e a recuperação de antx-a(s), a extração foi repetida mais duas vezes, com a adição da solução descrita acima, sobre o material precipitado.
4. As amostras obtidas foram pré-purificadas em coluna de extração em fase sólida (SPE) Sep-Pack C18 (500 mg), condicionada com 2 ml de MeOH, seguido de 2 ml de H_2O. Após o condicionamento da coluna os extratos

obtidos foram aplicados na coluna. Seguidamente, a coluna foi lavada com 2 ml de solução extratora CH_3CH_2OH:H_2O (1:1, v/v) acidificada com CH_3COOH 0,1 M (pH da solução = 4) e o mesmo volume de CH_3CH_2OH 100% acidificado com CH_3COOH 0,1 M (pH da solução = 5).

5. Todos os eluatos foram coletados (frações amostral e seguintes) e secos, sob vácuo, em sistema de *Speed Vac*.
6. Após a secagem total das amostras eluídas, estas foram ressupensas em 1 ml de MeOH acidificado com CH_3COOH 0,1 M, centrifugados (1200 g, 5 min, 15 ^oC) e filtrados em filtros de nylon (Millipore, 45 µm).
7. Todas as amostras obtidas foram analisadas por LC-MS.
8. Durante as análises por LC-MS foi determinado e isolado o pico que apresentara o íon *m/z* 253 (PM da antx-a(s) [252 + H^+]).

As amostras foram analisadas em coluna cromatográfica Luna Sílica® (5µm, NP Å100 250 x 2,0m) utilizando duas fases móveis descritas a seguir. Fase móvel 1: (A) $HCOONH_4$ 1 mM + 0,1% HCOOH e (B) Acetonitrila (ACN) 100% e fase móvel 2: (A) $HCOONH_4$ 1 mM + 0,1% HCOOH e (B) Metanol (MeOH) 100%. Para cada fase móvel um gradiente foi testado, ambos os gradientes estão descritos no quadro 3.

Quadro 3. Gradientes utilizados na análise por HPLC-MS dos extratos contendo anatoxina-a(s) preparados utilizando o protocolo 2 descrito no item 4.4.2.1.2.

	Tempo (min)	*% Fase móvel A*	*% Fase móvel B*
Gradiente I	0,01	50	50
	10	50	50
	12	90	10
	15	90	10
	16	50	50
	20	50	50
Gradiente II	0,01	30	70
	10	30	70
	15	90	10
	18	90	10
	19	30	70
	25	30	70

4.4.2.1.3 Protocolo 3

1. Os passos do protocolo 2 descrito no item 4.4.2.1.2 foram repetidos até o passo 3.
2. O extrato foi dividido em três alíquotas designadas como alíquota (A),(B) e (C).
3. Uma coluna de SPE Sep-Pack C18 foi condicionada com 2 ml de MeOH e o mesmo volume de H_2O.
4. A alíquota (A) foi aplicada na coluna de SPE Sep-Pack C18 e o eluato foi coletado;
5. As alíquotas (A), (B) e (C) foram secas no *Speed Vac* e posteriormente ressuspensas em acetonitrila:H_2O (1:1, v/v).
6. Foram coletadas todas as frações resultantes da aplicação de cada uma das 3 alíquotas ressuspensas (A), (B) e (C) em uma segunda coluna de SPE (Sep-Pak® de sílica) previamente condicionada com 2 ml de diclorometano, 2 ml de acetonitrila e o mesmo volume de acetonitrila:H_2O (1:1, v/v).
7. Posteriormente, também foram coletadas todas as frações resultantes da lavagem das colunas: das alíquotas (A) e (B) com 2 ml de acetonitrila:H_2O (1:1 e 9:1, v/v, respectivamente) e H_2O, e as frações da lavagem da coluna da alíquota (C) com acetonitrila:H_2O (1:1, v/v), MeOH com 0,1% TFA e H_2O.
8. Todas as frações coletadas (tanto amostrais como as de lavagem) foram secas e ressupensas em MeOH + CH_3COOH 0,1 M;
9. As frações foram centrifugadas a 20000 *g*, 5 min, 15 ºC e filtradas em filtro nylon 0,45 µm;
10. Todas as amostras obtidas foram analisadas por LC-MS usando as condições cromatográficas descritas no item 4.4.2.1.2 gradiente II.

4.4.2.1.4 Protocolo 4

1. Amostras foram preparadas repetindo as etapas do protocolo 2, descrito no item 4.4.2.1.2, até o passo 6.
2. Posteriormente, o eluato ressuspenso em MeOH + CH_3COOH 0,1M foi aplicado em uma coluna de SPE Sep-Pak de sílica previamente condicionada com MeOH e MeOH:H_2O (1:1, v/v) e a fração amostral coletada;

3. A coluna de SPE Sep-Pak de sílica foi lavada com 2 ml de MeOH e o mesmo volume de MeOH:H_2O nas proporções 8:2, 6:4, 4:6 e 2:8 v/v, respectivamente.
4. Todas as frações foram coletadas, secas no *Speed Vac* e ressuspensas em MeOH + CH_3COOH 0,1 M para posterior análise por LC-MS usando as condições cromatográficas descritas no item 4.4.2.1.2 gradiente II.

4.4.2.1.5 Protocolo 5

1. Cem miligramas de células liofilizadas foram ressuspensas com 5 ml da solução extratora CH_3CH_2OH : H_2O (2:8, v/v) contendo CH_3COOH 0,1M;
2. Seguidamente o material ressuspenso foi sonicado (1 min de pulsação durante 3 min com intervalo de dois min entre cada pulsação) e centrifugado a 6300 *g*, 10 min, 15°C;
3. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado. Para garantir a completa lise celular e a recuperação de antx-a(s), a extração foi repetida mais duas vezes, com a adição da solução descrita acima, sobre o material precipitado.
4. As amostras obtidas foram pré-purificadas em coluna de extração em fase sólida (SPE) Sep-Pack C18, previamente condicionada com 2 ml de MeOH, seguido de 2 ml de H_2O.
5. O eluato coletado foi seco no *Speed Vac*, ressuspenso com 1 ml de MeOH acidificado com CH_3COOH 0,1M, centrifugado (12000 *g*, 5 min, 15 ºC) e filtrado em filtro de nylon de 0,45 µm;
6. A amostra foi analisada por LC-MS.

Este procedimento de preparo de amostra corresponde ao protocolo adotado de forma definitiva. As etapas deste procedimento estão apresentadas graficamente no esquema 1.

Condições cromatográficas

Coluna cromatográfica:	ZIC®-HILIC (150 x 2.0 mm, 5 µm, SeQuant, Umeå, Sweden)
Fases móveis:	(A) $HCOONH_4$ 5 mM + 0,05% HCOOH
	(B) Acetonitrila
Fluxo:	0,150 $ml.min^{-1}$

Volume de injeção: 5 µl

Split: 1:4

Modo de ionização: positivo

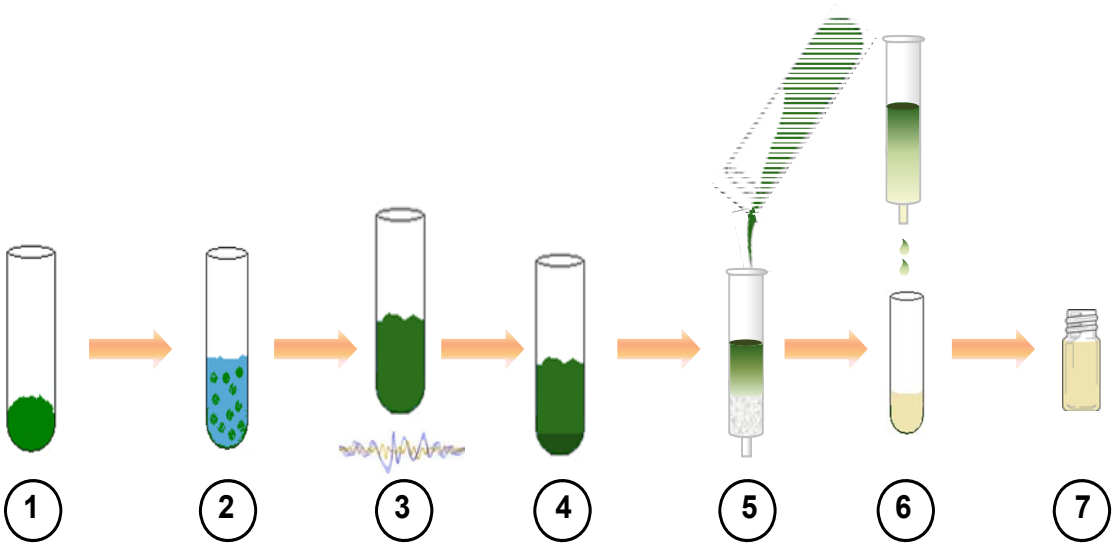
Gradiente:

Tempo (min)	*% A*	*% B*
0,01	20	80
5	20	80
10	60	40
14	60	40
15	20	80
2	20	80
25,01	STOP	

Condições do MS:

Parâmetros da fonte: Voltagem do capilar -4000 V, nebulizador 30,0 psi, fluxo de N_2 0,6 $l.min^{-1}$, temperatura 300°C. Parâmetros do analisador: skimmer 40 V, voltagem da saída do capilar 104,1 V, varredura 50-600 *m/z*. Estas condições correspondem às adotadas de forma definitiva.

Esquema 1. Protocolo de extração de anatoxina-a(s)



1. Pesar o material liofilizado;
2. Ressuspender o material com H_2O: CH_3CH_2OH (8:2, pH=3);
3. Sonicar;
4. Centrifugar e retirar o sobrenadante. Repetir 3x as etapas 2,3 e 4;
5. Adicionar o extrato na coluna de SPE pré-condicionada;
6. Coletar o eluato e secá-lo no *Speed Vac*;
7. Ressuspender o eluato com MeOH, filtrar e analisar por LC-MS

4.4.3 Determinação da atividade residual da enzima acetilcolinesterase

O método utilizado na determinação da atividade residual da enzima AChE foi realizado segundo ELLMAN *et al.* (1961) e INGKANINAN *et al.* (2003), com algumas modificações. O princípio do método de Ellman consiste na medida da velocidade da produção de tiocolina (TC) formada a partir da hidrólise do iodeto de acetiltiocolina (IATC) numa reação catalisada pela AChE. O grupamento tiol (-SH) da tiocolina reage com o anion 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoato formando o íon ácido 5-tio-2-nitrobenzoico monitorado no espectrofotômetro em 405 nm (Figura 10).

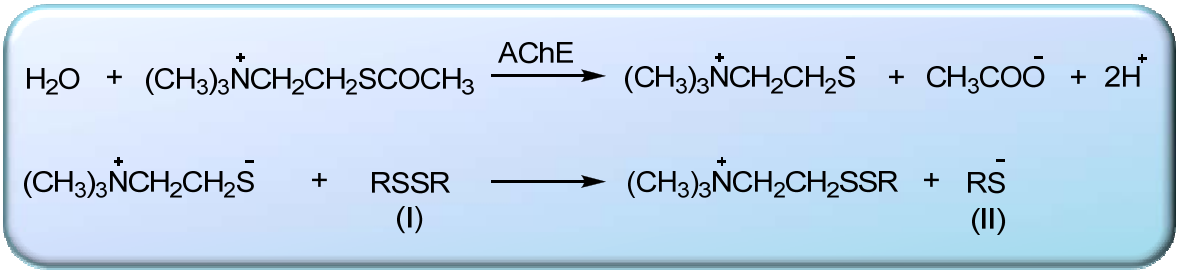


Figura 10. Reações envolvidas na determinação da AChE pelo método de Ellman (Fonte: ELLMAN *et al.*, 1961) (I) DTNB, (II) íon tio-2-nitrobenzóico.

Em microplaca de polipropileno de 96 poços (TPP®, Suiça) foram incubados 162,5 µl de tampão TRIS-HCl pH 8,0 por 10 min a 37 °C. Posteriormente foram adicionados 12,5 µl de DTNB (Sigma-Aldrich, Steinhem, Alemanha) 30 mM, 25 µl do agente inibidor de AChE (extrato contendo antx-a(s) ou triclorfon), 25 µl de AChE (0,28 $U.ml^{-1}$ *Electrophorus electricus*, tipo V-S, Sigma-Aldrich, Steinhem, Alemanha) e incubados durante 5 min na mesma temperatura. Foram adicionados 25 µl de IATC (Sigma-Aldrich, Steinhem, Alemanha) 15 mM. Imediatamente o aumento da absorbância foi monitorado no espectrofotômetro a cada 5 segundos durante 3 min em 405 nm. A hidrólise espontânea do IATC e DTNB foi monitorada antes de cada ensaio através da análise de poços nos quais foi substituído o agente inibidor e IATC ou DTNB por tampão. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

A atividade enzimática residual foi calculada como a porcentagem da velocidade de formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico no ensaio ($\Delta abs.min^{-1}$= diferença de absorbância por minuto). Foi considerado 100% de atividade o $\Delta abs.min^{-1}$ obtido nos poços onde o agente inibidor foi substituído por tampão

(controle da enzima). Em razão do decaimento da atividade da AChE ao longo do ensaio, as absorbâncias de controles da enzima foram lidos juntamente com cada inibidor testado. A fórmula utilizada para determinar a atividade residual da AChE *in vitro* está descrita a seguir:

$$\textit{Atividade residual} = \frac{k_I}{k_C} \times 100$$

Onde:

Atividade residual = Atividade residual da AChE (%)

k_I = coeficiente angular da reta do inibidor (Δabs.min^{-1})

k_C = coeficiente angular da reta do controle da enzima (Δabs.min^{-1})

4.4.4 Ensaio de toxicidade aguda

Foi seguido o protocolo estabelecido pela *United States Environmental Protection Agency* (EPA, 2002), com algumas modificações. Camundongos receberam via intra-peritoneal e por *gavage* uma dose única de diferentes concentrações do extrato contendo antx-a(s) (preparado e analisado de acordo com o protocolo descrito no item 4.4.2.1.5), malation e triclorfon. Todos os animais foram colocados individualmente em gaiolas de vidro e observados por até uma hora (com os intervalos de 5, 10, 15, 30 e 60 min) para detecção de possíveis alterações físicas e clínicas (de acordo com a tabela 3) e/ou ocorrência de morte. A presença (P) ou ausência (A) de cada sinal clínico foi avaliada. Cada sinal clínico recebeu uma escala de pontuação na faixa de um (1=leve) até quatro (4=muito intenso). Valores intermediários indicam variações na intensidade desses sinais (2=moderado, 3= intenso). Animais controle receberam, pelas mesmas vias, solução salina 0,9%.

Tabela 3 Avaliação clínica de camundongos para observação da toxicidade aguda (Adaptada de EPA, 2002)

Observações gerais	*Descrição dos sinais de toxicidade*
Contorção	Verificar se está presente ou não. (0)*
Ataxia[(a)]	Observar se estão presentes ou não. (0)*
Tremores[(b)]	Observar se estão presentes ou não. (0)*
Tetania[(c)]	Observar se estão presentes ou não. (0)*
Lacrimejamento	Observar se há lágrimas presentes ou não. (0)*
Micção e/ou diarréia	Para estes dois parâmetros, anotar se houver alguma alteração nitidamente diferente do normal. (0)*
Sialorréia[(d)]	Observar se estão presentes ou não. (0)*
Morte	Anotar o tempo e se possível descrever os episódios anteriores à morte. (0)*

* Pontuação basal
[(a)]Ataxia: perda da capacidade de coordenar os movimentos durante a marcha.
[(b)]Tremor: movimento muscular involuntário, de certa forma rítmico, que envolve movimentações oscilatórias de uma ou mais partes do corpo.
[(c)] Tetania: Hiperestimulação periférica. Sindrome que se caracteriza por manifestações neuromusculares bruscas, como por exemplo espasmos.
[(d)] Sialorréia: Salivação abundante.

4.4.5 Avaliações comportamentais

Os efeitos comportamentais (locomoção e ansiedade) de animais tratados com extrato contendo antx-a(s) e triclorfon foram avaliados através do sistema de rastreamento em vídeo, análise de movimento e reconhecimento comportamental, chamado Ethovision® (Noldus Information Technology®, Wageningen, Holanda). Esse sistema é composto pelo programa EthoVision Pro-Color 1.9 e pelos itens de hardware: câmera filmadora (CCD-Iris Color Sony), monitor de vídeo (Sony), computador (Pentium 133, 16MB de memória RAM, 1,2 gB de disco rígido) com placa de vídeo (TARGA + Truevision, 2D NTSC), monitor, teclado e mouse. A partir das imagens recebidas pela câmera filmadora e digitalizadas na placa de captura, o programa gera coordenadas espaciais do centro de gravidade do animal, permitindo

assim, que o sistema reconheça em qual zona do campo aberto ou labirinto em cruz elevado o animal se encontra.

4.4.5.1 Medida da atividade locomotora em Campo Aberto

O Campo Aberto (CA) é um tipo de teste comportamental bastante utilizado para avaliar a atividade locomotora, exploração e comportamento emocional de roedores (BROADHURST, 1960). Consiste em uma arena circular de metal, sob alta luminosidade, pintada em cor preta com 40 cm de diâmetro, protegida em todo o perímetro por uma parede vertical preta (25 cm de altura) (Figura 11). O chão da arena foi desenhado no Ethovision® e subdividido em 3 zonas concêntricas periférica, média e central como mostrado na figura 12. Antes de cada avaliação os animais permaneceram na sala de comportamento por uma hora, para aclimatação. Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena durante 5 minutos, sempre no período da manhã (entre as 8h e 11h). A cada sessão de 5 min foram quantificados os parâmetros distância total percorrida (cm), distância percorrida em cada zona (cm), velocidade total ($cm.seg^{-1}$) e velocidade em cada zona ($cm.seg^{-1}$). A escolha desses parâmetros foi realizada com o intuito de avaliar a atividade locomotora geral dos animais tratados. Após a avaliação de cada animal, a arena foi limpa com uma solução de etanol a 5%.

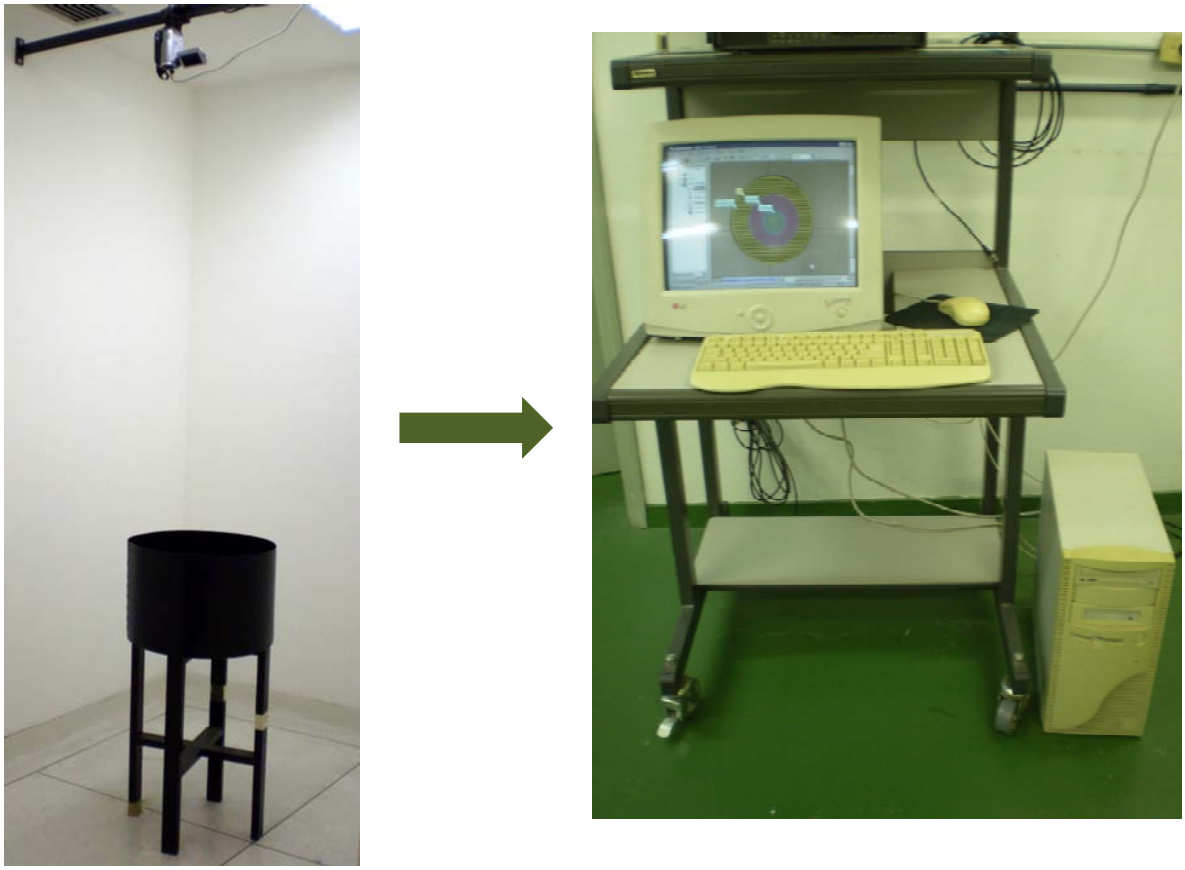


Figura 11. Arena de Campo Aberto utilizada para a observação da atividade locomotora individual de camundongos *Swiss* e equipamento utilizado para análise de dados.

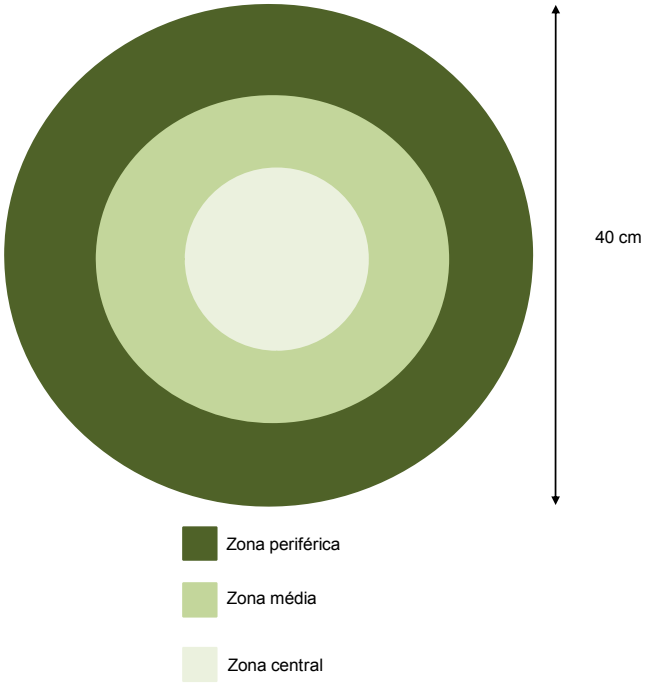


Figura 12. Ilustração esquemática da arena do Campo Aberto (visto de cima) subdividida em zonas central, média e periférica.

4.4.5.2 Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é outro tipo de teste comportamental para avaliação da ansiedade, validado comportamental, farmacológica, fisiológicamente por PELLOW *et al.* (1985). O LCE consiste numa plataforma de madeira elevada (55 cm do chão) no formato de cruz e pintada de cor preta fosco. Ele possui dois braços sem proteção lateral, chamados braços abertos (30 x 5 cm); ortogonais a dois braços com paredes verticais chamados braços fechados (30 x 5 x 15 cm) e uma zona central que comunica os quatro braços (5 x 5 cm) (Figura 13).

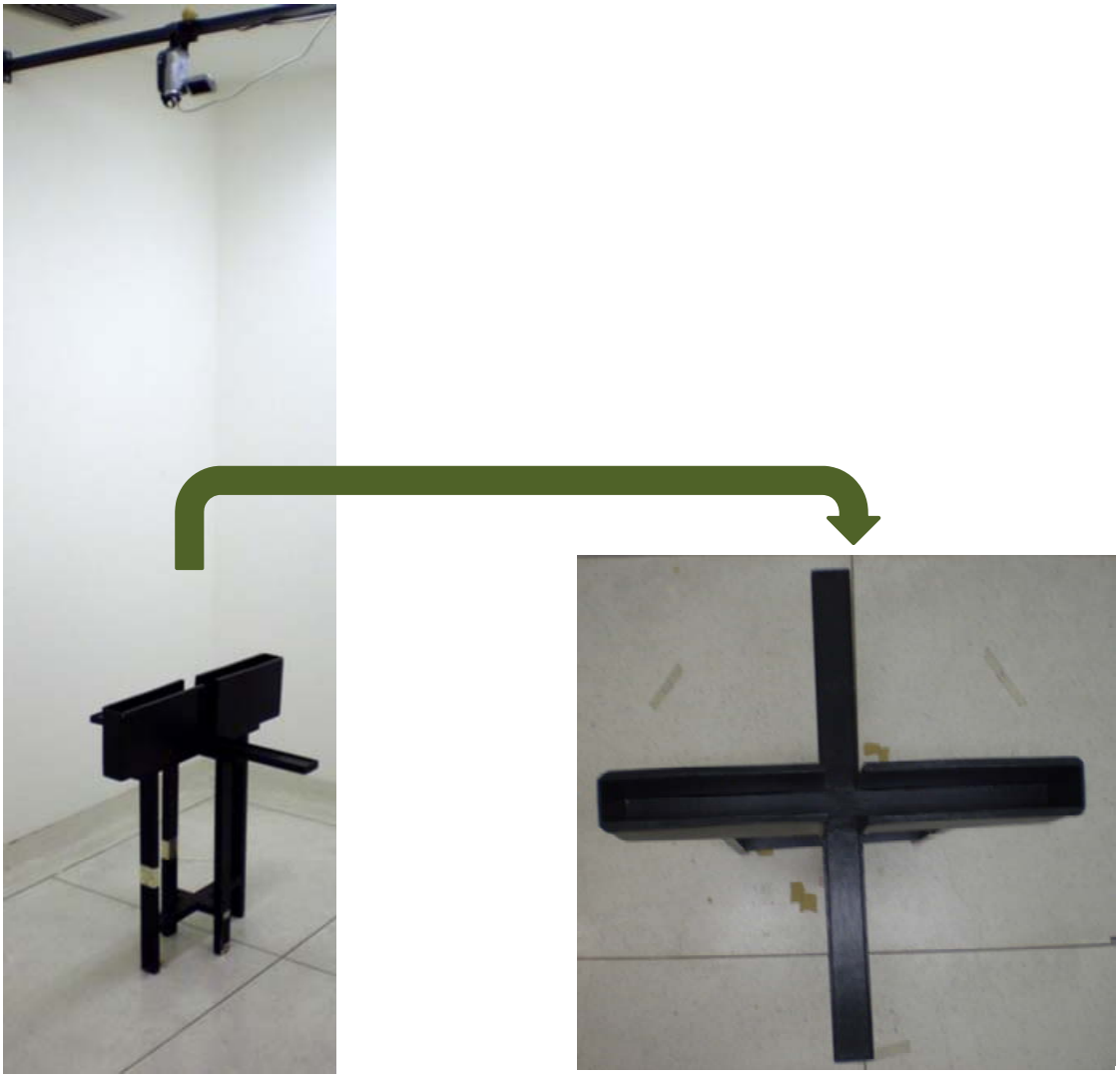


Figura 13. Plataforma do Labirinto em Cruz Elevado

A arena do LCE desenhada no EthoVision® foi subdividida em três zonas braços abertos (BA), braços fechados (BF) e zona central como mostrado na figura 14. Após aclimatação de uma hora, cada animal foi colocado individualmente no centro da arena durante 5 minutos, sempre no período da manhã (entre as 8:00 e 11:00h).

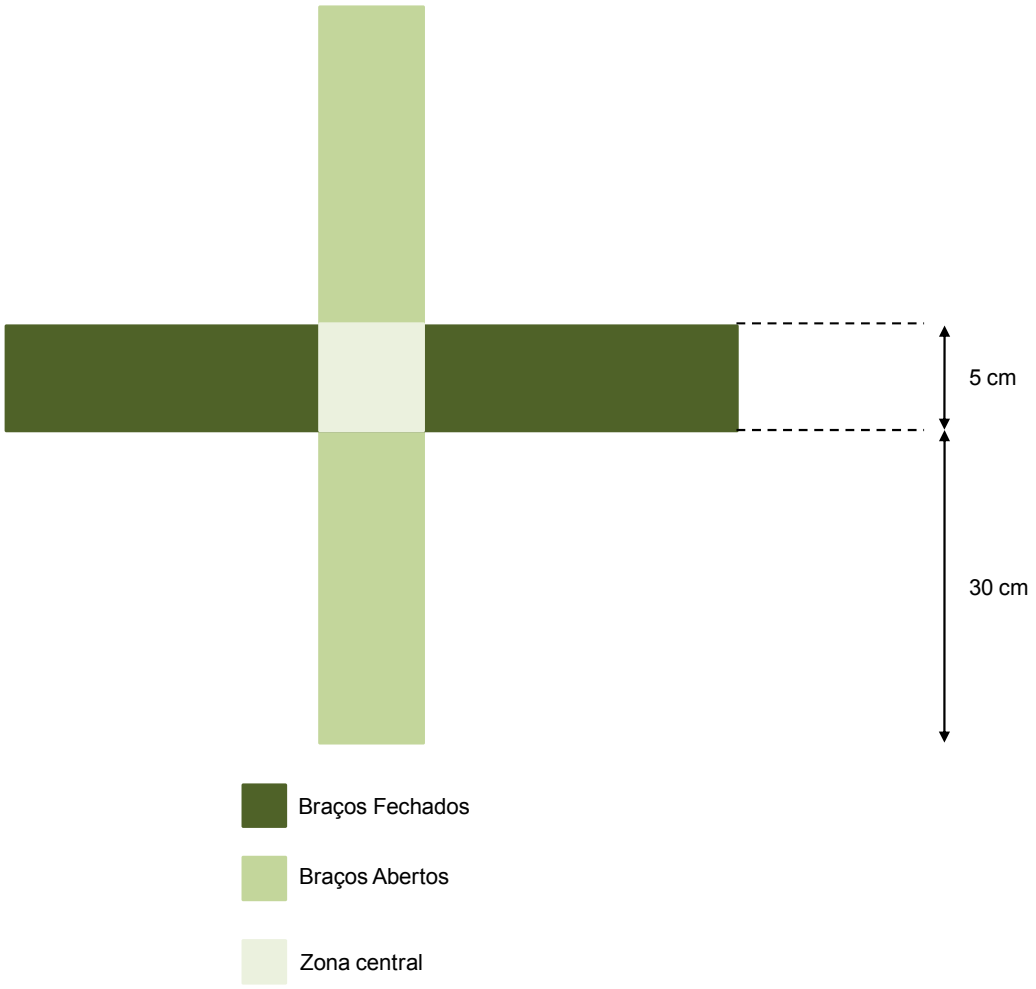


Figura 14. Ilustração esquemática da arena do labirinto em cruz elevado (vista de cima) subdivida em zona central, braços abertos e fechados.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- ✓ número de entradas nos braços abertos (EA), que corresponde ao ato do animal entrar nos braços abertos com as quatro patas;
- ✓ número de entradas nos braços fechados (EF), que corresponde ao ato do animal entrar nos braços fechados com as quatro patas;
- ✓ número de entradas no centro, que corresponde ao ato do animal ficar na zona central;
- ✓ tempo de permanência nos braços abertos (TA), que corresponde ao tempo de permanência nestes braços, em segundos;

- ✓ tempo de permanência nos braços fechados (TF), que corresponde ao tempo de permanência nestes braços, em segundos;
- ✓ tempo de permanência no centro, que corresponde ao tempo de permanência na zona central, em segundos.

Foram calculados, para cada animal, a porcentagem de entradas e de tempo despendido na exploração dos BA e BF, conforme mostrado nas fórmulas a seguir:

$$\% \text{ de EA} = \frac{EA \times 100}{EA + EF} \qquad \% \text{ de EF} = \frac{EF \times 100}{EA + EF}$$

$$\% \text{ de TA} = \frac{TA \times 100}{TA + TF} \qquad \% \text{ de TF} = \frac{TF \times 100}{TA + TF}$$

4.4.6 Coleta de amostras de sangue para bioquímica sanguínea

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados por administração i.p. de ketamina:xilazina (70 mg/kg e 6 mg /kg, respectivamente). Após anestesiados, amostras de sangue foram coletadas com anticoagulante heparina, por punção cardíaca. As amostras de sangue foram centrifugadas (984 *g*, 4 ºC, 15 min) e o plasma separado dos eritrócitos. Uma alíquota (50 µl) do concentrado de eritrócitos foi separada para dosagem de hemoglobina e o restante foi hemolisado com água ultra-pura gelada (4ºC) (1:5, v/v). As amostras de concentrado de eritrócitos e do hemolisado foram congeladas imediatamente, em nitrogênio liquido e armazenadas a -80 ºC até a análise. Antes de cada análise as amostras foram descongeladas e mantidas em banho de gelo.

4.4.7 Determinação da concentração de hemoglobina

A concentração de hemoglobina presente nas amostras de eritrócitos foi determinada utilizando o kit Hemoglobina Doles® (Goiânia-GO, Brasil) que se baseia no método proposto por KAMPEN & ZIJLSTRA (1964), com modificações. O princípio do método consiste na oxidação da hemoglobina a hemiglobina pelo ferrocianeto de potássio. A hemiglobina combinada com o cianeto de potássio forma

o cianeto de hemiglobina, um composto estável monitorado em 540 nm. A relação entre a absorbância deste composto e a concentração de hemoglobina da amostra foi considerada proporcional. Para isso, 10 µl de concentrado de eritrócitos foram misturados com 2,5 ml do reagente de cor do kit. O material foi homogeneizado por agitação vigorosa e mantido por 3 min a temperatura ambiente. Após esse tempo foi determinada a absorbância em 540 nm. A concentração de hemoglobina foi determinada a partir da fórmula a seguir:

$$\text{Hemoglobina } [g.dl^{-1}] = \text{Abs x fator}$$

Onde:

Abs = Absorbância da amostra

Fator= Concentração do padrão/Absorbância do padrão a 540 nm

4.4.8 Determinação da atividade das enzimas colinesterásicas e antioxidantes em sangue de camundongos

4.4.8.1 Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase

O método utilizado foi baseado em ELLMAN *et al.* (1961) e em WOREK *et al.* (1999), com algumas modificações. O princípio do método foi o mesmo descrito no item 4.4.3.

Em tubo de vidro, 650 µl de tampão fosfato 0,1M (pH = 7,4) foram incubados por 10 min a 37 °C. Incubou-se 30 µl de DTNB 10 mM e 300 µl de amostra (hemolisado diluído 100x em tampão) por mais 5 min a 37 °C. Foram adicionados 20 µl de IATC 28,4 mM. O aumento da absorbância foi lido em 436 nm a cada 15 seg, durante 2 min. Da mesma forma, foram avaliadas a hidrólise espontânea do substrato e a degradação de DTNB. Em razão do espectrofotômetro ser do tipo feixe duplo, na cela de referência foi colocada uma cubeta com tampão. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

O cálculo da atividade da enzima AChE eritrocitária foi realizado a partir da fórmula:

$$Atividade = \frac{k}{\varepsilon_{TNB}.b.[Hb]} \times \frac{1000}{300} \times 100$$

Onde:

Atividade = atividade específica da AChE (μmol.min^{-1}.g Hb^{-1})

k = coeficiente angular da reta (ΔAbs.min^{-1})

ε_{TNB} = coeficiente de absortividade molar do TNB^{-1} (10,6 μM^{-1}.cm^{-1})

b= caminho óptico (1 cm)

[Hb] = concentração de hemoglobina (g.l^{-1})

$\frac{1000}{300}$ = diluição da amostra na cubeta

100 = fator de diluição do hemolisado

4.4.8.2 Determinação da atividade da enzima butirilcolinesterase

A atividade da enzima BuChE plasmática foi analisada usando o kit Colinesterasa Wiener® (Rosario, Argentina), com algumas modificações. O princípio do método foi o mesmo descrito no item 4.4.3, diferenciando-se pelo substrato aqui utilizado, butiriltiocolina. O tampão do substrato liofilizado foi reconstituído com tampão fosfato 50 mM (pH = 7,7). Após reconstituição do substrato (1 ml) foram adicionados 7 μl de plasma fresco em cubeta de vidro. O material foi misturado e a absorbância foi determinada em 405 nm, a 25 ºC, a cada 30 seg, durante 3 min. O cálculo da atividade da BuChE foi realizado seguindo as instruções do kit, multiplicando o valor do coeficiente angular da reta das amostras (seg^{-1}) por um fator fornecido pelo fabricante do kit (22710). A atividade de BuChE foi expressa em U.l^{-1}.

4.4.8.3 Determinação da atividade da enzima catalase

A atividade da enzima CAT foi determinada pelo método descrito por AEBI (1984), com algumas modificações. O principio do método consiste no monitoramento do consumo direto de H_2O_2 pela enzima presente na amostra para formação de O_2 e H_2O (reação descrita na Figura 7). Foram colocados 700 μL de

tampão fosfato 50 mM (pH = 7,0) em cubeta de quartzo (Hellma, Müllheim, Alemanha) e adicionados 100 µL de amostra do hemolisado (diluído 500x em tampão). O material foi homogeneizado e usado para zerar o espectrofotômetro. Foram adicionados 200 µL de H_2O_2 55 mM (Merck, Alemanha). O material foi homogeneizado e as absorbâncias em 240 nm foram determinadas (à temperatura ambiente, a cada 3 seg, durante 60 seg). Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Seguindo as recomendações de AEBI (1974) para o cálculo da velocidade de consumo do H_2O_2 por seg (k), usou-se a expressão: k= (2,3/Δt)(logA1/A2); onde Δt = 60 seg; A1= absorbância no tempo 0; A2 = absorbância aos 60 seg. A atividade da CAT foi então determinada a partir da fórmula:

$$\textit{Atividade} = \frac{k}{\varepsilon_{H2O2.}b.[Hb]} \times \frac{1000}{100} \times 500$$

Onde:

Atividade = atividade específica da CAT eritrocitária (µmol.seg^{-1}.g Hb^{-1})

k = velocidade de consumo do H_2O_2 (ΔAbs.seg^{-1})

ε_{H2O2} = coeficiente de absortividade molar do H_2O_2 (3,94x10^{-5} µM^{-}1.cm^{-1})

b= 1 caminho óptico (cm)

[Hb] = concentração de hemoglobina (g.l^{-1})

$\frac{1000}{100}$ = diluição da amostra na cubeta

500 = fator de diluição do hemolisado

4.4.8.4 Determinação da atividade da enzima glutationa peroxidase

A determinação de GPx foi baseada na medida indireta da atividade da GPx, através da reação conjunta com a enzima glutationa redutase (GR) de acordo com FLOHÉ & GÜNZLER (1984). A reação consiste na redução de um hidroperóxido (reação catalisada pela GPx) com a geração instantânea de glutationa oxidada (GSSG). A GSSG gerada é continuamente reduzida a GSH numa reação catalisada pela GR, onde a oxidação de NADPH a NADP+ é monitorada

espectrofotometricamente a 340 nm (Figura 15). A participação da GR neste sistema tem como objetivo manter constante a concentração de GSH. O substrato utilizado neste ensaio é o ter-butil hidroperóxido (Sigma-Aldrich, USA).

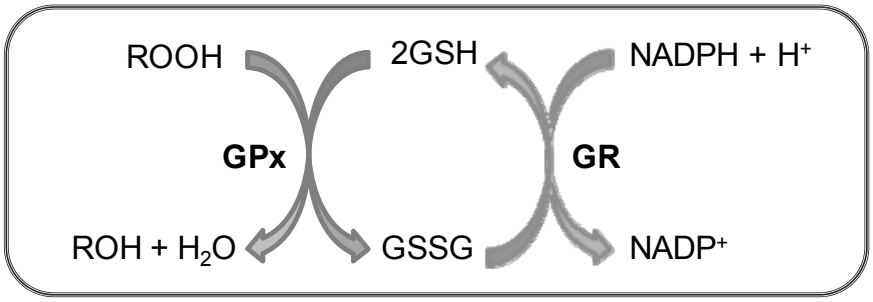


Figura 15. Esquema do acoplamento das reações catalisadas pelas enzimas GPx e GR.

Em tubo de vidro foram incubados 675 µL de tampão fosfato contendo EDTA 1 mM (pH=7,0), 25 µL de GSH (80 mM), 25 µL de GR (0,0096 $U.\mu l^{-1}$) e 100 µL de amostra (hemolisado diluído 200x), durante 5 min, a 37ºC. O material foi transferido para cubetas de quartzo onde foram adicionados 25 µL de ter-butilhidroperóxido (33,5 mM) e 150 µL de NADPH 1,2 mM. O material foi homogeneizado e colocado no espectrofotômetro para zerá-lo. Foram determinadas as absorbâncias a 340 nm, a cada 30 seg durante 4 min, a temperatura de 37 ºC. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade da enzima GPx foi determinada a partir da fórmula:

$$\textit{Atividade} = \frac{k}{\varepsilon_{NADPH}.b.[Hb]} \times \frac{1000}{100} \times 200$$

Onde:

Atividade = atividade específica da GPx ($\mu mol.min^{-1}.g\ Hb^{-1}$)

k = coeficiente angular da reta de decaimento ($\Delta Abs.min^{-1}$)

ε_{NADPH} = coeficiente de absortividade molar NADPH ($6,22 \times 10^{-3}\ \mu M^{-}.cm^{-1}$)

b= caminho óptico (1 cm)

[Hb] = concentração de hemoglobina ($g.l^{-1}$)

$\frac{1000}{100}$ = diluição da amostra na cubeta

200 = fator de diluição do hemolisado

4.4.8.5 Determinação da atividade da enzima glutationa redutase

A atividade da enzima GR foi medida utilizando como co-factor o NADPH na redução da glutationa oxidada (GSSG) a glutationa reduzida GSH (Figura 7). Assim como no ensaio da GPx, a oxidação de NADPH a $NADP^+$ é acompanhada através do monitoramento do decaimento da absorbância em 340 nm o qual é diretamente proporcional a atividade da enzima GR (GOLDBERG DM & SPOONER RJ, 1983).

Foram preparados 6 ml de meio reacional composto por 3,5 ml de tampão fosfato contendo EDTA 1 mM (pH=7,0), 1,5 ml de água ultra-pura, 1 ml de EDTA 0,05 M, 10 mg de GSSG e 1 mg de NADPH. Seguidamente, foram incubados em tubo de vidro 950 µL de meio reacional e 50 µL de amostra (hemolisado diluído 20x) durante 5 min, a 37ºC. Foram determinadas as absorbâncias a 340 nm, a cada 30 seg durante 5 min, a temperatura de 37 ºC. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade da enzima GR foi determinada a partir da fórmula:

$$\textit{Atividade} = \frac{k}{\varepsilon_{NADPH}.b.[Hb]} \times \frac{1000}{50} \times 20$$

Onde:

Atividade = atividade específica da GR ($\mu mol.min^{-1}.g\ Hb^{-1}$)

k = coeficiente angular da reta de decaimento ($\Delta Abs.min^{-1}$)

ε_{NADPH} = coeficiente de absortividade molar NADPH ($6,22 \times 10^{-3}\ \mu M^{-}.cm^{-1}$)

b= caminho óptico (1 cm)

[Hb] = concentração de hemoglobina ($g.l^{-1}$)

$\frac{1000}{50}$ = diluição da amostra na cubeta

20 = fator de diluição do hemolisado

4.4.8.6 Determinação da atividade da superóxido dismutase

A atividade da enzima CuZnSOD eritrocitária foi determinada segundo o protocolo descrito por FLOHÉ & TTING (1984), com algumas modificações. O método se baseia no monitoramento a 550 nm da taxa de inibição da velocidade da reação de redução do cátion férrico (Fe^{+3}) do citocromo C, pela SOD, devido à competição pelo radical superóxido. Este método utiliza o sistema hipoxantina-xantina oxidase como fonte de $O_2^{\bullet -}$ (Figura 16), sendo que uma unidade de CuZnSOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de redução do ferricitocromo C em 50% sob condições específicas (FLOHÉ & OETTING, 1984).

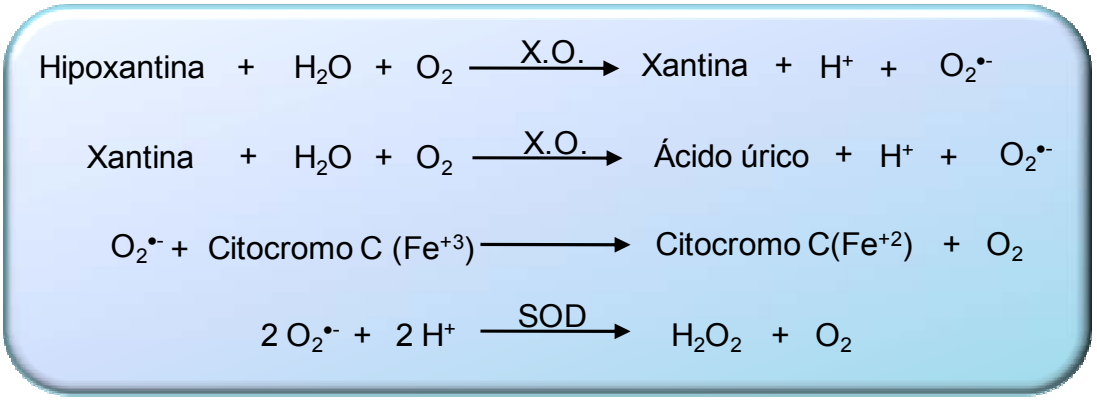


Figura 16. Reações envolvidas na determinação da atividade da enzima superóxido dismutase pelo método de FLOHÉ & TTING (1984). X.O. = Xantina Oxidase, SOD = Superóxido Dismutase.

Visando a eliminação de interferentes, a SOD contida nas amostras foi extraída pela técnica de extração líquido-líquido. Foram homogenizados em vortex durante 30 seg, 125 µl de amostra (hemolisado diluído 5x) e 200 µl da mistura CH_3CH_2OH:$CHCl_3$ (6,25:3,75, v/v). O material foi centrifugado a 300 *g*, por 5 min, a 4°C. A fase aquosa foi coletada e mantida em banho de gelo até realização da análise. O meio reacional foi composto por 37,5 ml de tampão fosfato 50 mM (pH = 7,8) contendo EDTA 0,1 mM; 10 ml de hidróxido de sódio 1 mM; 6,2 mg de ferricitocromo C e 0,68 mg de hipoxantina. Esse meio foi mantido a temperatura ambiente.

A taxa de redução do ferricitocromo C na ausência de CuZnSOD foi determinada adicionando-se em cubetas de quartzo, 950 µl de meio reacional, 25 µl de tampão fosfato 50 mM (pH = 7,8) e 25 µl de uma solução fresca de xantina

oxidase (Sigma-Aldrich, USA). Esta última solução foi capaz de produzir um coeficiente angular da reta ($\Delta Abs.min^{-1}$) de 0,025. Para o nosso ensaio a concentração de enzima necessária foi de 0,6 $U.ml^{-1}$. Foram determinadas as absorbâncias em 550 nm, a 25 ºC, a cada 30 seg, durante 3 min. Por outro lado, a inibição da taxa de redução do ferricitocromo C pela presença de CuZnSOD foi determinada substituindo os 25 µl de tampão pelo mesmo volume de amostra extraída. A redução espontânea do ferricitocromo C foi avaliada pela determinação da absorbância em 550 nm, em soluções contendo 950 µl de meio reacional e 50 µl de tampão (branco de análise). Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

A atividade da CuZnSOD foi calculada a partir das fórmulas descritas a seguir:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\Delta abs_C - \Delta abs_A}{\Delta abs_C} \times 100 \; ; \; \text{Unidades de SOD} = \frac{\% \text{ Inibição}}{100 - \% \text{ Inibição}}$$

$$\textit{Atividade} = \frac{\text{Unidades SOD}}{\text{g Hb}} \times \frac{1000}{25} \times 5$$

Onde:

ΔAbs_C = variação de absorbância na ausência de CuZnSOD (min^{-1})

ΔAbs_A = variação de absorbância na presença de CuZnSOD (min^{-1})

Atividade = Atividade específica da CuZnSOD ($U.g\ Hb^{-1}$)

$\frac{1000}{25}$ = diluição da amostra na cubeta

5 = fator de diluição do hemolisado

4.4.9 Exposição de sementes de alfafa ao extrato contendo anatoxina-a(s)

A exposição de sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.) ao extrato de *A. spiroides* contendo antx-a(s) foi realizada seguindo o protocolo descrito por PFLUGMACHER *et al.* (2006). Sementes de alfafa foram lavadas com água, germinadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido (Whatman no. 1; Roth, Karlsruhe, Alemanha) e mantidas a 20 ºC sob luz constante. As sementes

foram regadas com 1 ml de extrato contendo antx-a(s), a cada dois dias, durante sete dias. Após o tratamento, as sementes foram congeladas por imersão em nitrogênio líquido. Como controle negativo foi utlizado extrato bruto da linhagem de cianobactéria *Synechocystis sp* (PCC 6803), pois a mesma não é produtora de microcistinas, anatoxinas e saxitoxinas.

4.4.9.1 Preparo de amostra para determinação de enzimas antioxidantes em semente de alfafa

Previamente às análises das enzimas antioxidantes, as sementes de alfafa foram submetidas ao processo de purificação descrito por PFLUGMACHER & STEINBERG (1997). As sementes congeladas foram pulverizadas em nitrogênio líquido e transferidas para *beakers*. Foram adicionados 10 ml de tampão fosfato (0,1M pH= 7,0, 20% glicerol, 1,4 mM DTE, 1 mM EDTA) e mantidos sob agitação magnética por 20 min, em banho de gelo. Após centrifugação (72000 *g*, 10 min, 4 ºC) o precipitado foi descartado e o sobrenadante novamente submetido a centrifugação (288000 *g*, 60 min, 4 ºC). O sobrenadante resultante foi recolhido e transferido para *beakers*. Lentamente e sob agitação magnética constante, foram adicionados 2,09 g de NH_4SO_4 (em aproximadamente 20 min). Após nova centrifugação (144000 *g*, 20 min, 4 ºC), ao longo de 30 min adicionou-se 3,19 g de NH_4SO_4 ao sobrenadante. Esse último material foi centrifugado a 216000 *g*, 30 min, 4 ºC.

O precipitado foi reconstituído com 0,5 ml de tampão fosfato (20 mM, pH = 7,0) e aplicado em colunas NAP5 (Sephadex X25, GE Healthcare, Piscataway, Nova Iorque) previamente condicionadas 5 ml de tampão fosfato (20 mM, pH = 7,0). A amostra foi eluída em 1 ml de tampão e congelada em nitrogênio líquido, sendo mantida a -80 ºC até a análise.

4.4.9.2 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes em sementes de alfafa

A atividade das enzimas CAT, glutationa transferase (GST), glutationa redutase (GR) e GPx foi determinada usando os protocolos descritos por AEBI

(1974), HABIG *et al.* (1974), COSSU *et al*. (1997) e PETERS & LIVINGSTONE (1996) , respectivamente. Todos os protocolos foram previamente padronizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr.Stephan Pflugmacher (Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Berlim, Alemanha).

Para determinação da CAT, foram adicionados em cubeta de quartzo 1,25 ml de tampão fosfato 50 mM (pH = 7,0), 100 µl de H_2O_2 e 25 µl de amostra de semente preparada. A absorbância foi determinada em 240 nm por 5 min.

A enzima GST foi analisada adicionando-se em cubeta de quarzto 1100 µl de tampão fosfato 0,1 M (pH = 6,5), 40 µl de GSH (60 mM), 40 µl de CDNB (30 mM) e 40 µl de amostra de semente preparada.

Para determinação da enzima GR foram adicionados em cubeta de quartzo 850 µl de tampão fosfato (pH = 7,5), 50 µl de GSSG (20 mM), 50 µl de NADPH (2 mM) e 50 µl de amostra de semente preparada.

Para determinação da enzima GPx 800 µl de tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,5), 10 µl de GR (0,2 $U.\mu l^{-1}$), 40 µl de GSH (60 mM), 40 µl de NADPH (9,6mM), 10 µl de H_2O_2 (9 mM) e 100 µl de amostra de semente preparada foram adicionados em cubeta de quartzo.

Após homogeinização das amostras a leitura da absorbância das enzimas GST, GR e GPx, foi realizada a cada 30 seg, durante 5 min em 340 nm. A atividade de todas as enzimas foi expressa em $nkat.mg^{-1}$ proteína.

4.4.10 Preparação do coração semi-isolado de barata *Leurolestes circunvagans*

A preparação do coração semi-isolado de barata (CSIB) foi montada baseada em BAUMAN & GERSCH (1982), com modificações. As baratas foram tratadas com éter e imobilizadas por meio de alfinetes entomológicos com a face dorsal voltada para cima. Com a ajuda de material cirúrgico, tesoura e pinças cirúrgicas, a cutícula abdominal foi removida para expor melhor os órgãos internos (Figura 17). O trato digestivo e outras vísceras foram afastados com a ajuda de uma pinça expondo o coração que foi banhado em solução salina 0,9%, a temperatura ambiente. Após os 5 min iniciais, tempo necessário para estabilização da frequência cardíaca, 200 µl do

extrato contendo antx-a(s) foi adicionado sobre o coração. A frequência cardíaca.min^{-1} foi monitorada durante 30 min sob microscópio estereoscópico.

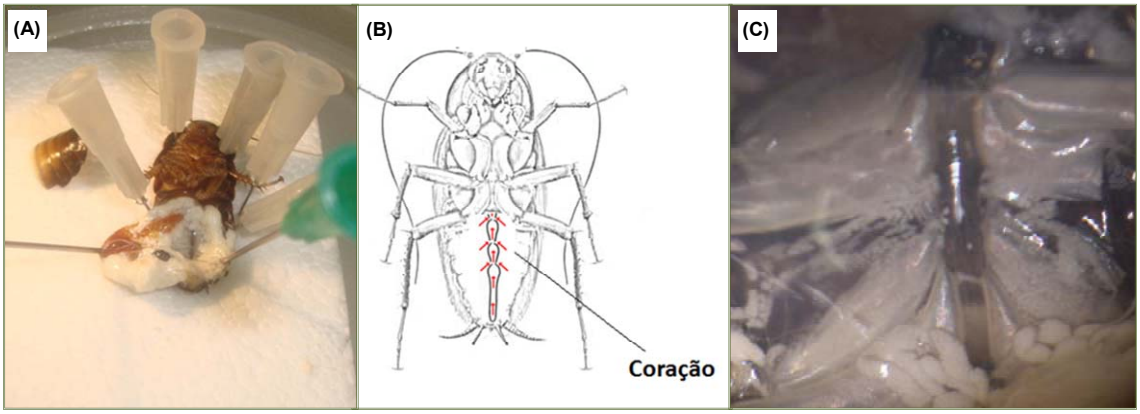


Figura 17. (A) Fotografia da preparação de CSIB. (B) Esquema do coração de barata (C) Vista da preparação de CSIB no microscópio estereoscópico (4x).

4.5 Delineamento experimental

4.5.1 Experimento 1 – Avaliação do crescimento da linhagem *Anabaena spiroides* (ITEP26)

O crescimento celular da cepa ITEP26 foi acompanhado através da contagem de filamentos durante 42 dias, com o auxílio de microscópio óptico e câmara de Neubauer. A contagem do número de filamentos.ml^{-1} de meio foi realizada conforme descrito no item 4.4.1.2.

4.5.2 Experimento 2 – Obtenção de biomassa das linhagens de cianobactéria produtoras de anatoxina-a(s)

As linhagens de *A. spiroides* ITEP24, ITEP25 e ITEP26 foram cultivadas ao longo de todo o trabalho conforme descrito no item 4.4.1. A cada 20 dias, toda a vidraria das culturas e meio ASM-1 foram trocados e autoclavados. Para obtenção de biomassa, o conteúdo dos frascos (Erlenmeyer de 2l) foi concentrado por centrifugação (6300 *g*, 7 min, 15ºC). O material precipitado foi liofilizado e mantido em freezer -80 ºC até extração da toxina.

4.5.3 Experimento 3 - Identificação da antx-a(s) nos extratos de *Anabaena spiroides* por LC-MS

Utilizando os protocolos descritos no item 4.4.2.1, a antx-a(s) foi identificada em extratos de *A. spiroides*. A cada teste foi avaliado o tempo de retenção na coluna cromatográfica e o sinal apresentado pelo pico de m/z 253 (PM de [antx-a(s) + H^+]) no espectrômetro de massas. Também, foi realizada uma análise da fragmentação da molécula de antx-a(s).

4.5.4 Experimento 4 – Pré-avaliação da toxicidade aguda do extrato bruto contendo anatoxina-a(s) e, da anatoxina-a(s) purificada por LC-MS

Dois camundongos foram tratados via i.p. com 1000 $mg.kg^{-1}$ de extrato contendo antx-a(s) e 200 µl do pico correspondente à antx-a(s) coletado durante a análise por LC-MS (preparado conforme ao protocolo 4.4.2.1.1), respectivamente. Imediatamente foi acionado um cronômetro para determinação do tempo em que os sinais clínicos e/ou ocorrência de morte foram evidentes.

4.5.5 Experimento 5 – Escolha do controle de inseticida organofosforado

Com o intuito de termos um parâmetro de comparação dos sinais clínicos presentes numa síndrome colinérgica e pouparmos o uso de quantidades muito grandes de extrato contendo antx-a(s), optou-se por escolher um inseticida organofosforado comercial cujo efeito anticolinesterásico e pró-oxidante já tivesse sido reportado. Assim sendo, camundongos foram tratados via i.p. com malation nas doses de 190 e 380 $mg.kg^{-1}$ (veículo solução salina 0,9%) (n=5 para a dose 190 $mg.kg^{-1}$, e n=2 para a dose 380 $mg.kg^{-1}$) e 1000 e 2000 $mg.kg^{-1}$ (veículo solução salina 0,9% + 10% de CH_3CH_2OH) (n=2 para ambas as doses). Outros grupos de dois camundongos receberam por *gavage* as seguintes doses de triclorfon 2000, 1000, 600, 300, 150, 75, 50 e 25 $mg.kg^{-1}$. Posteriormente à administração, a toxicidade aguda dos IOF foi avaliada seguindo o protocolo descrito no item 4.4.4. Animais controle foram tratados com solução salina 0,9% (n=15).

4.5.6 Experimento 6 – Escolha da via de administração para anatoxina-a(s)

Duas vias de administração foram avaliadas, via intraperitoneal e via oral (com cânula metálica para *gavage*). Um camundongo por dose foi tratado com extrato contendo antx-a(s) (1000 $mg.kg^{-1}$) por ambas as vias. Paralelamente, um camundongo por dose foi tratado com extrato contendo antx-a(s) por via i.p. nas doses 500, 333 e 100 $mg.kg^{-1}$. Logo em seguida, foi aplicado o ensaio de toxicidade aguda (item 4.4.4) em todos os animais.

4.5.7 Experimento 7 – Escolha da dose sub-letal de anatoxina-a(s) e triclorfon

Para melhor entendimento dos resultados, este experimento foi dividido em duas etapas.

(i) Grupos de dois camundongos foram tratados com doses decrescentes (1000, 100, 40, 20, 10 e 1 $mg.kg^{-1}$) de extrato contendo antx-a(s) e triclorfon (150, 100 e 75 $mg.kg^{-1}$), via i.p. Um cronômetro foi acionado para monitoramento dos sinais clínicos apresentados e/ou morte durante o período de uma hora. Neste experimento foram utilizados quatro animais como controle.

(ii) Grupos de três camundongos foram tratados via i.p. com extrato contendo antx-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$) e triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e mantidos em observação por até 14 dias. Três camundongos foram usados como controle.

Depois do tempo de observação designado para cada grupo (1h e 14 dias) todos os animais foram anestesiados. O sangue heparizinado foi colhido por punção cardíaca e a atividade das enzimas AChE e BuChE foi determinada pelos métodos descrito nos itens 4.4.8.1 e 4.4.8.2, respectivamente.

Os critérios adotados para escolha da dose sub-letal de extrato contendo antx-a(s) e triclorfon a ser adotada nos experimentos comportamentais e bioquímicos foram pré-determinados de acordo com uma dose onde não fossem observados sinais clínicos e morte, porém que provocasse uma inibição na atividade das enzimas colinesterásicas avaliadas até 14 dias.

4.5.8 Experimento 8 – Padronização do método para determinação da atividade residual da enzima acetilcolinesterase

Para a padronização do método descrito por INGKANINAN *et al.* (2003) foram analisadas duas concentrações de DTNB (3 e 30 mM) e quatro tempos de incubação (0, 3, 5 e 10 min) da AChE de *Electrophorus electricus*. Após determinação do melhor tempo de incubação da enzima AChE com o agente inibidor a mesma foi incubada a 37 ºC com três concentrações de triclorfon 0,01; 0,1 e 1 $mg.ml^{-1}$. Todos os outros parâmetros foram mantidos conforme descrito no item 4.4.3. Esse procedimento foi utilizado na caracterização bioquímica de antx-a(s) em todos os extratos utilizados nos experimentos com camundongos.

4.5.9 Experimento 9 – Avaliação comportamental no campo aberto e labirinto em cruz elevado em camundongos após exposição ao extrato contendo anatoxina-a(s)

Conforme as doses estabelecidas no experimento 7, item (ii), grupos de camundongos foram tratados pela via i.p. com extrato contendo antx-a(s), triclorfon e solução salina 0,9% (n=9 por grupo). Após 24h do tratamento esses animais foram submetidos aos testes comportamentais descritos no item 4.4.5. As avaliações comportamentais também foram realizadas em grupos de camundongos após 48h e 7 e 14 dias do tratamento. Ao término de cada experimento, todos os animais foram anestesiados e o sangue colhido conforme o item 4.4.6.

4.5.10 Experimento 10 – Avaliação da atividade das enzimas AChE e BuChE em camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon

Após execução dos testes comportamentais em 24 h, 48 h, 7 e 14 dias, a atividade das enzimas AChE e BuChE dos animais expostos ao extrato contendo antx-a(s) e ao triclorfon foi determinada seguindo os procedimentos apresentados nos itens 4.4.8.1 e 4.4.8.2.

4.5.11 Experimento 11 – Efeito do extrato contendo anatoxina-a(s) na atividade das enzimas CAT, GPx, GR e SOD em camundongos

A atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx, GR e SOD em todos os animais referentes ao experimento 9 foi determinada conforme aos protocolos relatados nos itens 4.4.8.3, 4.4.8.4, 4.4.8.5 e 4.4.8.6, respectivamente.

4.5.12 Experimento 12 – Efeito do extrato contendo anatoxina-a(s) na atividade das enzimas CAT, GPx, GST e GR em sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.)

Grupos de 50 sementes de alfafa, dispostas em placas de Petri (n=5 por grupo) foram regadas a cada 2 dias durante 7 dias com extrato contendo antx-a(s) e extrato de *Synechocystis spp.* conforme descrito no item 4.4.9. O conteúdo protéico do extrato antx-a(s) e do extrato de *Synechocystis spp.* foi ajustado de maneira que ambos os extratos contenham a mesma concentração de proteínas quantificada pelo método BRADFORD (1976). As concentrações de extrato de antx-a(s) avaliadas foram 1,8; 0,18; 0,018 e 0,0018 $\mu g.\mu l^{-1}$. Cada concentração foi nomeada como EA1, EA2, EA3 e EA4, respectivamente. O extrato da cepa *Synechocystis spp.* foi nomeado como ELC (extrato livre de cianotoxina). Para análise enzimática, as amostras foram preparadas conforme apresentado no item 4.4.9.1. A atividade das enzimas CAT, GPx, GST e GR foi determinada seguindo os procedimentos descritos no item 4.4.9.2. Grupos de sementes (n=50) dispostos em dez placas de Petri foram regados com água destilada foram utilizadas como controle.

4.5.13 Experimento 13 – Avaliação do efeito do extrato contendo antx-a(s) em coração de barata *Leurolestes circunvagans*

Um extrato contendo antx-a(s) foi preparado e caracterizado pelo ensaio de atividade residual de AChE (item 4.4.3) e por LC-MS (item 4.4.2.1.5). Posteriormente, corações de barata *Leurolestes circunvagans* (n=9) preparados conforme mencionado no protocolo apresentado no item 4.4.10, foram banhados com extrato de antx-a(s) nas doses de $2,5x10^2$; $1,25x10^3$, $2,5x10^3$, $5x10^3$ e $8x10^3$ µg de extrato por grama de animal. O grupo controle foi tratado com solução salina.

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism 5. Os dados paramétricos foram comparados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Dunnes. Para os dados não paramétricos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. O nível de significância considerado para todas as análises realizadas foi de 95% ($p<0,05$). Todos os

resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (epm), inclusive os referentes aos dados não paramétricos, a fim de se padronizar a apresentação dos resultados.

5. RESULTADOS

5.1 Experimento 1 – Avaliação do crescimento da linhagem *Anabaena spiroides* (ITEP26)

A figura 18 apresenta os resultados obtidos da contagem de filamentos da linhagem *A. spiroides* (ITEP26) ao longo do experimento. A fase exponencial de crescimento foi 21 dias. O valor calculado da taxa de crescimento específico para linhagem estudada foi 0,10 $\mu.dia^{-1}$.

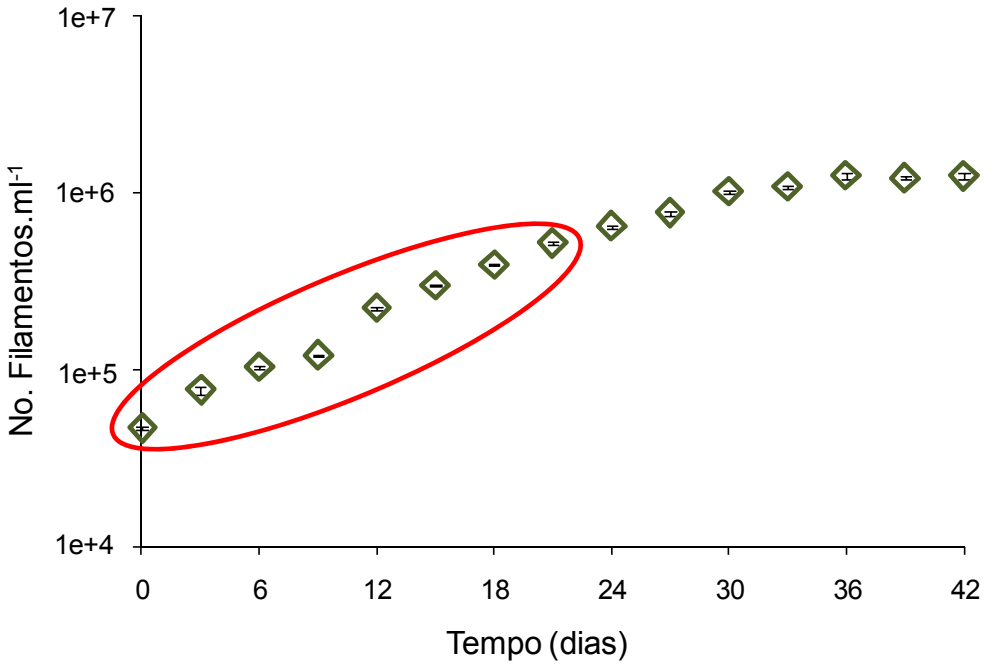


Figura 18. Curva de crescimento da linhagem *Anabaena spiroides* (ITEP 26). Fase exponencial do crescimento destacada em circulo vermelho. Resultados expressos em No. de filamentos.ml^{-1}±epm (n=2)

5.2 Experimento 2 – Obtenção de biomassa das linhagens de cianobactéria produtoras de anatoxina-a(s)

A biomassa de células obtida após concentração das linhagens cultivadas foi liofilizada e armazenada a -80ºC para preservação da toxina. A quantidade de material liofilizado obtido em cada processo de concentração (a cada 20 dias) foi em média 50 a 70 mg por linhagem cultivada, sendo obtido ao longo de todo o trabalho um total de aproximadamente 3 g por linhagem, ou seja, 9 g ao todo.

5.3 Experimento 3 - Identificação da anatoxina-a(s) nos extratos de *Anabaena spiroides* por LC-MS

Na análise por infusão direta no espectrômetro de massas (MS) dos extratos de *A. spiroides* (preparados de acordo com o protocolo 1 do item 4.4.2.1.1, solução extratora acidificada com CH_3COOH), foi detectado o íon correspondente a antx-a(s) $[M+H^+]$ = 253. Esse íon foi isolado no analisador do equipamento e fragmentado, gerando os íons de *m/z* 235, 159, 141, 98 e 58, como observado no espectro MS^2 (Figura 19).

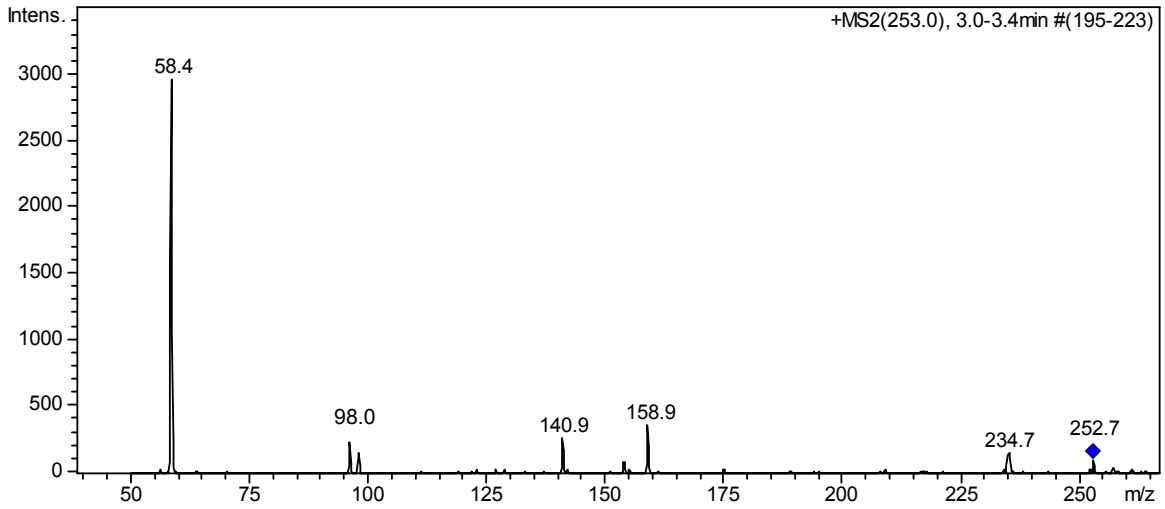


Figura 19. Espectro de massas MS^2 do íon *m/z* 253, obtido por infusão direta do extrato acidificado com CH_3COOH da linhagem *Anabaena spiroides* ITEP 25.

Nas análises realizadas por LC-MS utilizando a coluna Synergy Polar® RP, quando a fase móvel 1 e o gradiente I foram avaliados, observou-se que o íon correspondente a antx-a(s) foi detectado no pico com tempo de retenção (t_{ret}) 2,9 min. Não foi observada mudança significativa no tempo de retenção (t_{ret} ~3,2 min) para a mesma toxina, quando o gradiente II deste mesmo protocolo foi testado. Já, no ensaio com a fase móvel 2, o tempo de retenção da antx-a(s) na coluna passou para ~6 min. A acidificação dos extratos com HCOOH foi descartada, devido à presença de muitos interferentes nos cromatogramas. A figura 20 ilustra os cromatogramas obtidos na análise de extratos contendo antx-a(s) acidificados com CH_3COOH utilizando a coluna Synergy Polar® RP nos três gradientes testados.

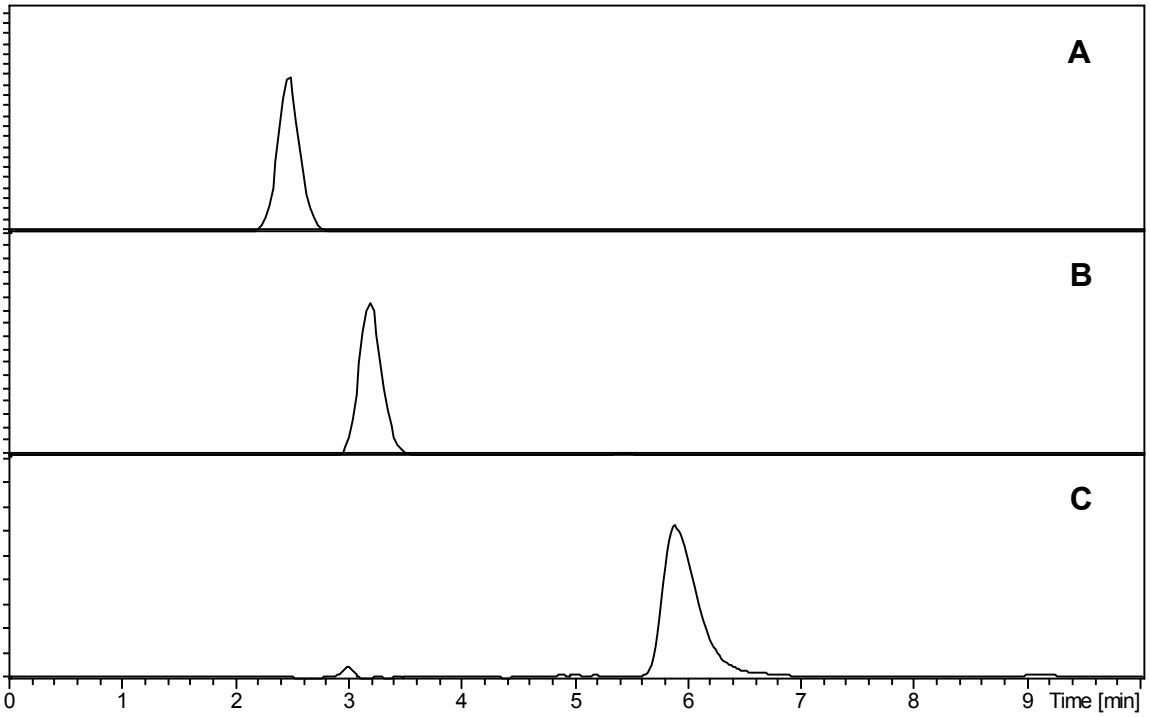


Figura 20. Cromatogramas obtidos da análise por LC-MS de anatoxina-a(s) segundo o protocolo descrito no item 4.4.2.1.1 utilizando a coluna cromatográfica Synergy Polar® RP. (A) Pico correspondente a antx-a(s) (t_{ret}=2,9 min), fase móvel A: $HCOONH_4$ 10 mM + 0,01% HCOOH, fase móvel B: ACN 100% e gradiente I (% fase móvel A: 90% até 12 min, 20% até 14,5 min e 90% até os 15 min. (B) Pico de antx-a(s) (t_{ret}= 3,2 min), fase móvel A:$HCOONH_4$ 10 mM + 0,01% HCOOH, fase móvel B: MeOH 100% e gradiente II (% fase móvel A: 100% por 5 min, 90% até min 7, 20% até 14 min e 100% até 17 min. (C) Pico de antx-a(s) (t_{ret}= 6 min) obtido utilizando a mesma fase móvel do item anterior e gradiente III (% fase móvel A: 95% por 5 min, 80% até 7 min, 20% do min até 10 min e 95% até 15 min).

Os espectros de massas das frações coletadas após lavagem do cartucho de SPE Sep Pack C18 praticamente não apresentaram nenhum sinal do íon *m/z* 253. Todas as frações coletadas e analisadas por LC-MS segundo os protocolos 3 e 4 (Sep Pack C18 e sílica) apresentaram o pico referente à antx-a(s). A figura 21 apresenta um esquema comparativo dos cromatogramas obtidos na análise de antx-a(s) nas três colunas cromatográficas avaliadas.

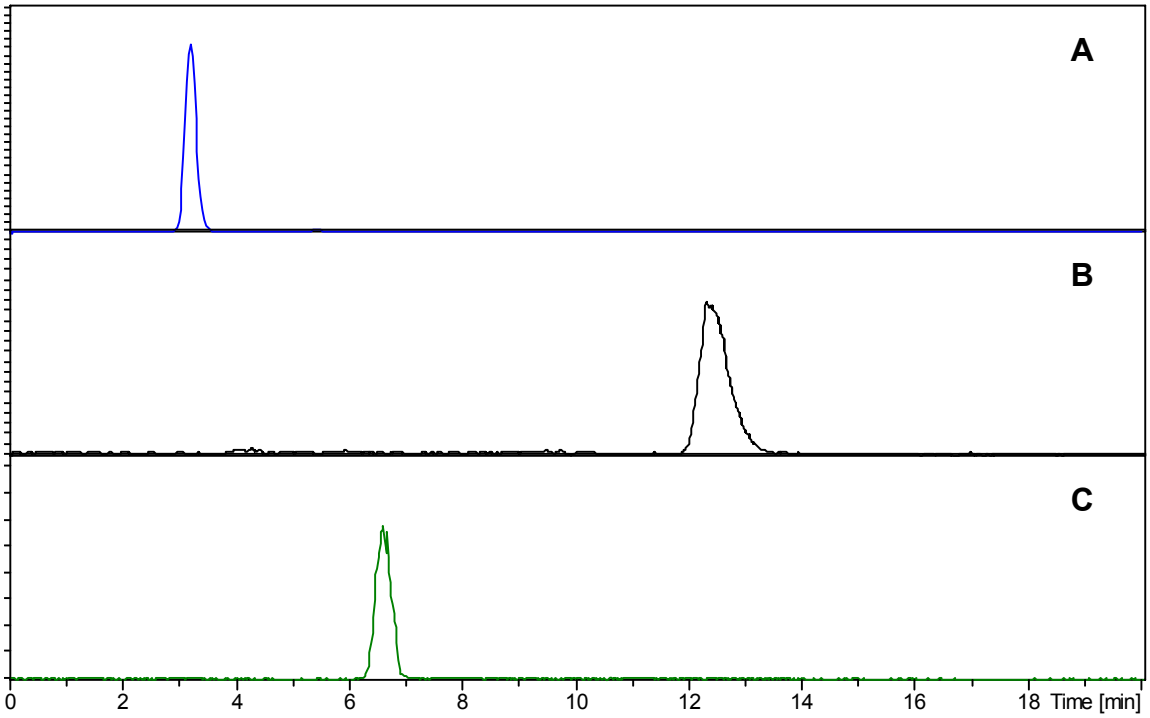


Figura 21. Cromatogramas obtidos através da análise por LC-MS do extrato contendo anatoxina-a(s) utilizando as colunas cromatográficas (A) Synergy Polar® RP, (B) Luna Sílica® e (C) ZIC®-HILIC.

A partir destes resultados, a coluna ZIC®-HILIC foi escolhida para posteriores experimentos. A figura 22 mostra um cromatograma representativo do método escolhido utilizando a coluna cromatográfica ZIC®-HILIC e o espectro de massas MS^2 do pico da antx-a(s) obtido em t_{ret}= 9,2 min.

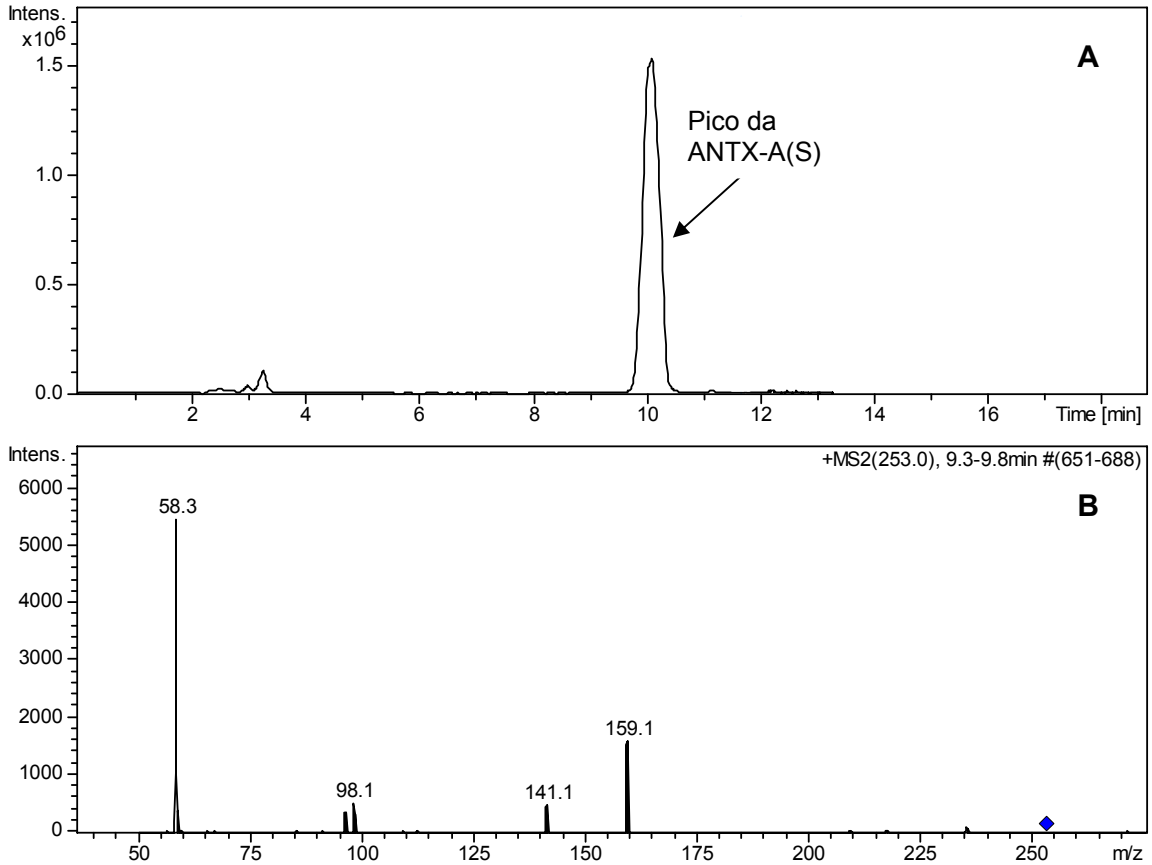


Figura 22. (A) Cromatograma obtido a partir da análise por LC-MS do extrato de *Anabaena spiroides* contendo anatoxina-a(s) (pico com t_{ret} 9,2 min) utilizando a coluna ZIC®-HILIC. (B) Espectro de massas MS^2 do pico correspondente à anatoxina-a(s).

A figura 23 mostra o perfil cromatográfico do pico caracterizado como antx-a(s) por MS^2 nos extratos utilizados nos tratamentos de camundongos em 24h, 48h e 7 dias.

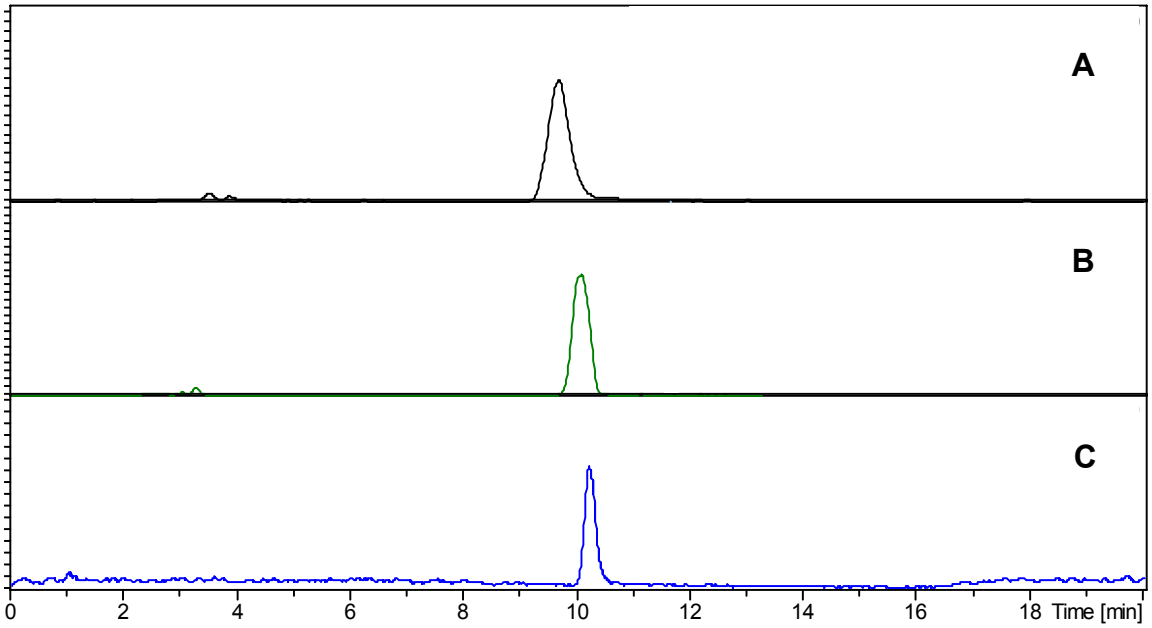


Figura 23. Perfil cromatográfico da antx-a(s) obtido a partir da análise por LC-MS dos extratos utilizados nos tratamentos de camundongos sacrificados após (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 7dias.

5.4 Experimento 4 – Pré-avaliação da toxicidade aguda do extrato contendo anatoxina-a(s) e anatoxina-a(s) purificada por LC-MS

Os sinais clínicos apresentados pelo animal tratado via i.p. com extrato contendo antx-a(s) foram muito intensos ocasionando a morte do animal em menos de 15 min após a administração. Dentre os sinais clínicos, destaca-se a tetania devida à hiperestimulação periférica. Por outro lado o animal tratado com antx-a(s) purificada por LC-MS não apresentou nenhum sinal clínico até 60 min após o tratamento (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação clínica de camundongos tratados via i.p. com extrato contendo anatoxina-a(s) (antx-a(s)[1]) e anatoxina-a(s) purificada por LC-MS (antx-a(s)[2]).

Parâmetros	Tempo (min)									
	5		10		15		30		60	
	antx-a(s)[1]	antx-a(s)[2]	antx-a(s)[1]	antx-a(s)[2]	antx-a(s)[1]	antx-a(s)[2]	antx-a(s)[1]	antx-a(s)[2]	antx-a(s)[1]	antx-a(s)[2]
Contorção	A	A	A	A	A	A	-	A	-	A
Ataxia	A	A	A	A	P (4)	A	-	A	-	A
Tremores	A	A	P (4)	A	A	A	-	A	-	A
Tetania	A	A	A	A	P (4)	A	-	A	-	A
Lacrime-jamento	A	A	A	A	P (4)	A	-	A	-	A
Micção e/ou diarréia	A	A	P (4)	A	P (4)	A	-	A	-	A
Sialorréia	A	A	A	A	P (4)	A	-	A	-	A
Morte	A	A	A	A	P (4)	A	-	A	-	A

A = Ausência; P = Presença; () Escore da intensidade do sinal clínico. Escala crescente, onde 1=leve, 2=moderado, 3=intenso e 4=muito intenso.

5.5 Experimento 5 – Escolha do controle do inseticida organofosforado

Nenhum dos animais tratados com diferentes doses de malation (2000, 1000, 380 e 190 $mg.kg^{-1}$) via i.p. apresentou sinais clínicos durante o período de observação. Os camundongos tratados por *gavage* com triclorfon nas doses na faixa de 2000 – 150 $mg.kg^{-1}$ apresentaram sinais clínicos colinérgicos de intensidade dose-dependente após 5 min de tratamento (Tabela 5), porém nenhum foi a óbito. Os animais que receberam triclorfon nas doses 75, 50 e 25 $mg.kg^{-1}$ não apresentaram sinais clínicos durante o período de observação. A partir dos resultados deste experimento o triclorfon foi escolhido como controle.

Tabela 5. Avaliação clínica dos camundongos (n=2 por grupo) tratados por *gavage* com doses decrescentes de triclorfon.

Parâmetro	Tempo (min)	Controle	Doses triclorfon ($mg.kg^{-1}$)				
			2000	1000	600	300	150
Contorção	5 - 60	A	A	A	A	A	A
Ataxia	5 - 15	A	A	A	A	A	A
	30	A	P (3)	A	P (2)	P (2)	A
	60	A	P (3)	P (3)	P (3)	P (2)	A
Tremores	5	A	A	A	A	A	A
	10	A	P (4)	A	A	A	A
	15	A	P (4)	A	P (2)	P (2)	A
	30	A	P (4)	P (3)	P (3)	P (2)	P (2)
	60	A	P (4)	P (3)	P (3)	P (2)	A
Tetania	5 - 10	A	A	A	A	A	A
	30	A	P (3)	A	A	A	A
	60	A	P (3)	P (3)	P (2)	A	A
Lacrimejamento	5 - 60	A	A	A	A	A	A
Micção e/ou diarréia	5	A	A	A	A	A	A
	10	A	A	A	A	P (3)	A
	15	A	A	A	A	A	A
	30	A	A	P (3)	A	A	A
	60	A	P (3)	P (3)	P (3)	A	A
Sialorréia	5-60	A	A	A	A	A	A
Morte	5 - 60	A	A	A	A	A	A

A = Ausência; P = Presença () Escore da intensidade do sinal clínico. Escala crescente, onde 1=leve, 2=moderado, 3=intenso e 4=muito intenso.

5.6 Experimento 6 – Escolha da via de administração para anatoxina-a(s)

Todos os animais tratados via i.p. com diferentes doses de extrato contendo antx-a(s) (1000-100 $mg.kg^{-1}$) foram ao óbito após apresentarem sinais colinérgicos muito intensos e um tempo de sobrevida entre 5 a 10 min após administração (Tabela 6). A sialorréia somente pode ser observada no animal tratado com 100 $mg.kg^{-1}$ de extrato. Já o animal tratado com a dose de 1000 $mg.kg^{-1}$ por *gavage* não apresentou sinal clínico no período de observação.

A via i.p. foi a via de escolha para os ensaios posteriores, em decorrência da limitação do material de partida que seria necessária para os testes via oral.

Tabela 6. Avaliação clínica de camundongos (n=1 por grupo) tratados pelas vias oral e intraperitoneal com doses decrescentes de extrato contendo anatoxina-a(s).

Parâmetro	Tempo (min)	Controle (via oral)	Doses extrato contendo antx-a(s) ($mg.kg^{-1}$)				
			1000	1000	500	333	100
			oral	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.
Contorção	5	A	A	P (4)	P (4)	P (4)	A
	10 - 60	A	A	-	-	-	-
Ataxia	5	A	A	P (4)	A	A	A
	10	A	A	-	-	-	A
	15 - 60	A	A	-	-	-	-
Tremores	5	A	A	P (4)	P (4)	P (4)	A
	10	A	A	-	-	-	P (4)
	15 - 60	A	A	-	-	-	-
Tetania	5	A	A	P (4)	P (4)	P (4)	A
	10	A	A	-	-	-	P (4)
	15 - 60	A	A	-	-	-	-
Lacrimejamento	5	A	A	A	A	A	A
	10	A	A	-	-	-	A
	60	A	A	-	-	-	-
Micção e/ou diarréia	5	A	A	A	P (4)	A	A
	10	A	A	-	-	-	A
	15 - 60	A	A	-	-	-	-
Sialorréia	5	A	A	-	-	-	-
	10	A	A	-	-	-	P (4)
	15 - 60	A	A	-	-	-	-
Morte	5	A	A	P	P	P	A
	10	A	A	-	-	-	P

A = Ausência; P = Presença; () Escore da intensidade do sinal clínico. Escala crescente, onde 1=leve, 2=moderado, 3=intenso e 4=muito intenso.

5.7 Experimento 7 – Escolha da dose sub-letal de anatoxina-a(s) e triclorfon

(i) Uma vez que a via i.p. foi escolhida como a via de administração, seis grupos de dois camundongos foram tratados com triclorfon e com extrato contendo antx-a(s) em doses decrescentes. Os critérios utilizados para escolha da dose sub-letal a ser adotada nos experimentos comportamentais e bioquímicos foram a ausência de sinais clínicos colinérgicos e morte e, a inibição da atividade das colinesterases sanguíneas, AChE e BuChE. As doses de 20 $mg.kg^{-1}$ de extrato contendo antx-a(s) e 100 $mg.kg^{-1}$ de triclorfon estavam de acordo com o critério pré-estabelecido no item 4.5.7 (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação clínica e atividade das enzimas AChE e BuChE em camundongos tratados via intraperitoneal com extrato contendo anatoxina-a(s) e triclorfon (n=2 por grupo; grupo controle, n=4)

Agente	Dose ($mg.kg^{-1}$)	Sinais clínicos ()*	AChE ($\mu mol.min^{-1}.g\ Hb^{-1}$ ± epm)	BuChE ($U.l^{-1}$± epm)	Morte
Extrato contendo antx-a(s) (n=2 por dose)	1000	Ataxia, tetania	1,24 ± 0,14	106,93 ± 24,01	Sim (2 min)
	100	Ataxia (9 min), sialorréia (7-9 min), dificuldade respiratória (10 min), tetania (10 min)	1,83 ± 0,31	200,61 ± 6,37	Sim (10 min)
	40	Micção (3 min), sialorréia (5 min), ataxia (4-5 min), tetania (5-6 min), dificuldades respiratórias (6 min)	1,53 ± 0,35	169,38 ± 17,37	Sim (6 min)
	20	Sem sinais clínicos observáveis	5,30 ± 0,45	193,04 ± 17,28	Não
	10	Sem sinais clínicos observáveis	7,28 ± 1,59	444,74 ± 53,18	Não
	1**	Sem sinais clínicos observáveis	9,16 ± 2,64	1139,2 ± 123,3	Não
Triclorfon (n=2 por dose)	150	Diarréia e tremores leves (13 min), tremores moderados (16 min), ataxia (25 min)	1,82 ± 0,16	92,73 ± 19,21	Não
	100	Sem sinais clínicos observáveis	2,96 ± 0,19	182,63 ± 15,79	Não
	75	Sem sinais clínicos observáveis	5,35 ± 0,21	399,32 ± 82,43	Não
Controle (n=4)	-------	------	7,32 ± 0,5	1008,7 ± 216,7	Não

* Entre parêntesis está o tempo de surgimento do sinal clínico; ** A amostra de sangue de um dos camundongos foi descartada para análise. Atividade enzimática expressa como média ± epm.

(ii) Nenhum sinal clínico foi observado no período de 14 dias nos animais tratados via i.p. com extrato contendo antx-a(s) e triclorfon nas doses de 20 e 100 $mg.kg^{-1}$, respectivamente. A atividade das colinesterases sanguíneas (AChE e BuChE) não apresentou diferença significante com relação ao controle após 14 dias do tratamento (Figura 24).

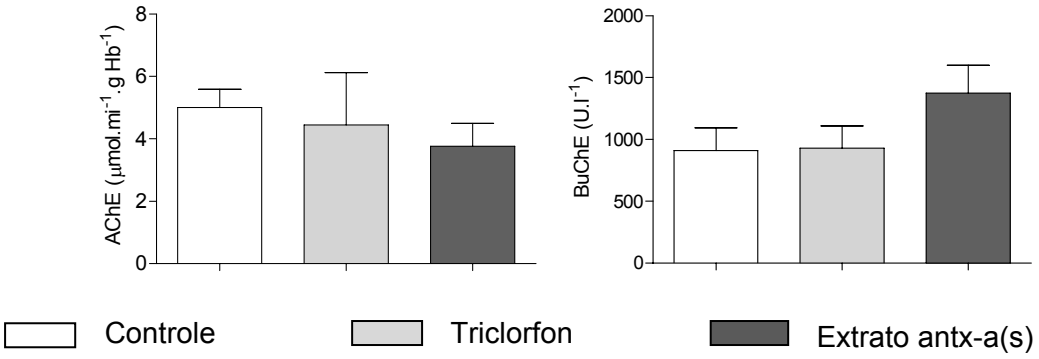


Figura 24. Atividade das enzimas AChE ($\mu mol.min^{-1}.g\ Hb^{-1}$) e BuChE ($U.l^{-1}$) em camundongos após 14 dias de tratamento com extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$) e triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$). As barras de erro indicam o erro padrão das médias (n=2). ($p>0,05$, Teste ANOVA-Dunnet).

5.8 Experimento 8 - Padronização do método para determinação da atividade residual da enzima acetilcolinesterase

Algumas adaptações foram necessárias para reproduzir a técnica descrita por INGKANINAN *et al.* (2003). Com o intuito de manter a temperatura ideal do meio reacional, optou-se por utilizar uma solução dez vezes mais concentrada de DTNB (30 mM). Para obter um ensaio rápido e linear, o tempo de incubação da AChE sem inibidor foi avaliado. A tabela 8 mostra os resultados obtidos a partir da otimização do tempo de incubação da AChE de *Electrophorus electricus* sem inibidor e antes da adição do substrato (IATC) (100% de atividade enzimática). O tempo de incubação escolhido foi 5 min.

Para avaliação da eficiência do método padronizado, diferentes concentrações de triclorfon foram testadas. A figura 25 mostra os resultados obtidos

referentes à atividade da enzima AChE após 5 min de incubação. A atividade da AChE foi diminuindo linearmente a medida que a concentração de triclorfon foi aumentando (*p<0,05, Teste ANOVA-Dunnet).

Tabela 8. Avaliação do tempo de incubação da enzima AChE isolada de *Electrophorus electricus*, em µmol.min^{-1}, após diferentes tempos de incubação (0, 3, 5 e 10 min), antes da adição do substrato IATC. Dados expressos como média do ΔAbs.min^{-1}. (**p<0,01, ***p<0,001, Teste ANOVA-Dunnet).

Tempo incubação (min)	AChE (µmol.min^{-1})
0	0,06767 ± 1,19x10^{-3}
3	0,05272 ± 3,83x10^{-3}**
5	0,04444 ± 4,45x10^{-4}***
10	0,03222 ± 4,03x10^{-3}***

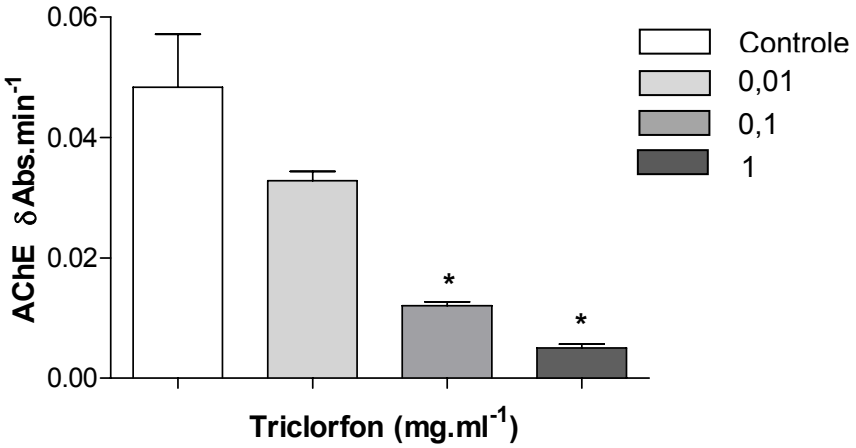


Figura 25. Atividade da enzima AChE (ΔAbs.min^{-1}) após 5 min de incubação com diferentes concentrações de triclorfon (0,01; 0,1 e 1 mg.ml^{-1}). Dados expressos como média do ΔAbs.min^{-1} (*p<0,05, Teste ANOVA-Dunnet).

Baseado no método descrito acima, as soluções de extrato contendo antx-a(s) e triclorfon utilizadas nos tratamentos de camundongos, mostraram um percentual da atividade residual da AChE semelhante no teste *in vitro*. Todas as soluções de triclorfon utilizadas nos tratamentos provocaram um porcentual de

inibição da AChE *in vitro* acima de 64% e os extratos contendo antx-a(s) acima de 83% (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação da atividade residual e porcentagem de inibição da AChE após incubação com as soluções de triclorfon e extrato contendo anatoxina-a(s) utilizadas nos tratamentos em camundongos.

Inibidor	Conc. ($mg.ml^{-1}$)	Ativ. residual AChE (%)	% Inibição da AChE	Tempo de exposição dos animais
Triclorfon	10	24,5 ± 0,0	75,5 ± 0,0	24 h
		20,38 ± 0,15	79,62 ± 0,15	48 h
		35,69 ± 0,3	64,3 ± 0,3	7 dias
		25,99 ± 0,12	74,01 ± 0,12	14 dias
Extrato de antx-a(s)	2	10,23 ± 0,05	89,77 ± 0,05	24 h
		9,24 ± 0,1	90,76 ± 0,1	48 h
		16,18 ± 0,1	83,81 ± 0,1	7 dias
		15,69 ± 0,016	84,30 ± 0,016	14 dias

Dados expressos como média ±epm

5.9 Experimento 9 – Avaliação comportamental no campo aberto e labirinto em cruz elevado em camundongos após exposição aguda ao extrato contendo anatoxina-a(s)

A atividade locomotora geral de camundongos tratados com extrato contendo antx-a(s) e triclorfon (20 e 100 $mg.kg^{-1}$, respectivamente) avaliada após 24 h, 48 h, 7 e 14 dias do tratamento não apresentou diferença estatistica significante para a maioria dos parâmetros avaliados no CA. Somente os parâmetros distância percorrida e velocidade média na zona periférica apresentaram aumento significante nos animais tratados com extrato contendo antx-a(s), após 24h de tratamento (n=9, Teste ANOVA, pós-teste Dunnet, $p<0,05$). As tabelas 10 a 13 e as figuras 26 a 29 apresentam os resultados comportamentais obtidos no CA em todos os tratamentos.

Tabela 10. Avaliação da atividade locomotora no campo aberto de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon após 24 h do tratamento.

Parâmetro	Zona da arena	Controle (n=7)	Triclorfon (n=7)	Extrato antx-a(s) (n=7)
Distância percorrida (cm)	Central	369,0 ± 62,9	364,3 ± 53,4	346,6 ± 41,7
	Média	742,5 ± 82,8	773,4 ± 87,1	714,7 ± 110,3
	Periférica	1473 ± 231,7	1830 ± 128,8	1951 ± 70,1*
	Total	2669 ± 223,0	2772 ± 118,8	3263 ± 212,6
Velocidade ($cm.seg^{-1}$)	Central	12,8 ± 1,6	13,6 ± 0,9	13,6 ± 0,7
	Média	12,3 ± 1,0	13,7 ± 0,8	13,6 ± 0,7
	Periférica	7,5 ± 0,6	7,7 ± 0,4	9,9 ± 0,7*
	Total	8,9 ± 0,7	9,2 ± 0,4	10,9 ± 0,7

Dados expressos como média ±epm, n= número de animais por grupo (*p<0,05, Teste ANOVA, pós-teste Dunnet).

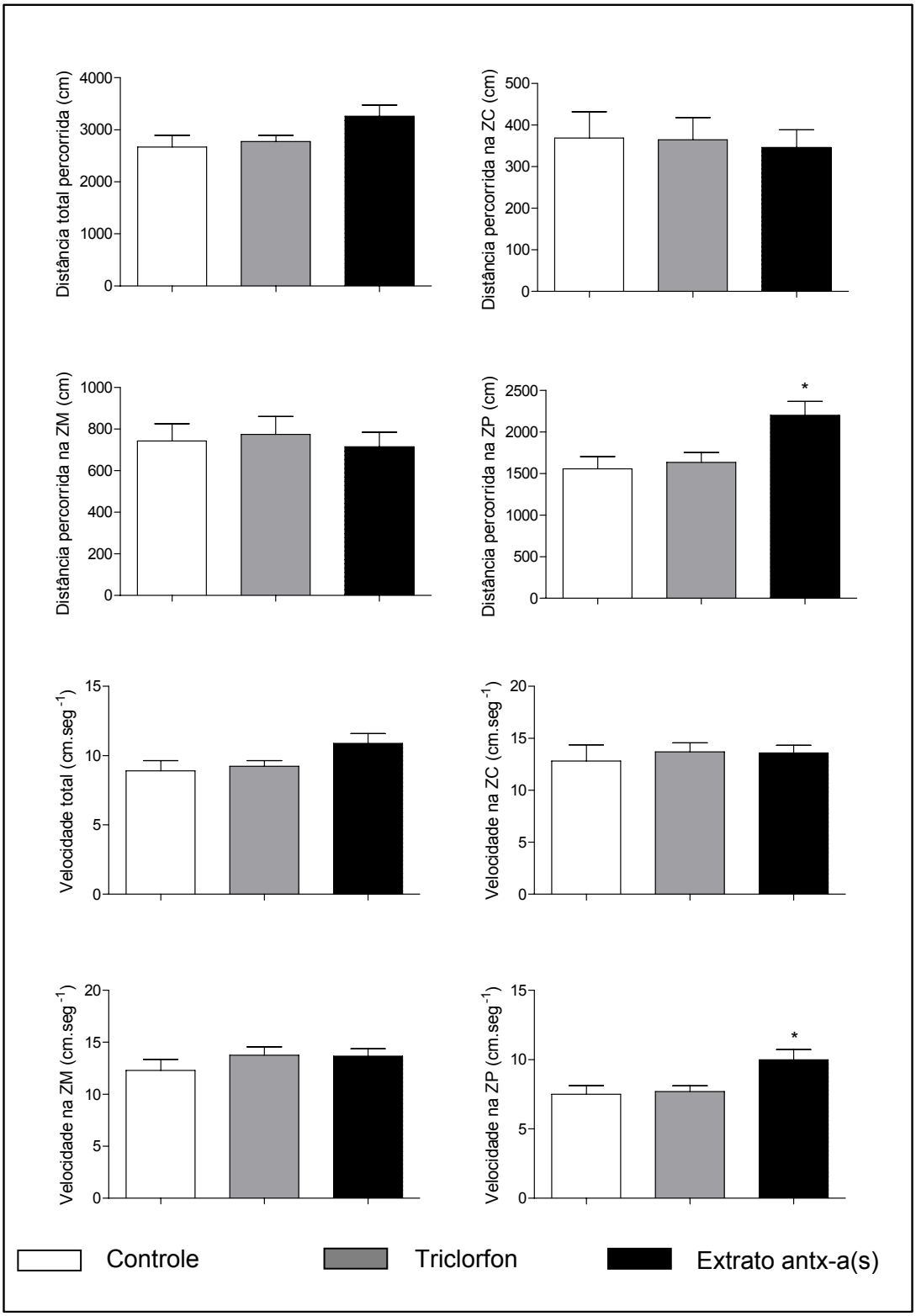


Figura 26. Atividade locomotora de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 mg.kg^{-1}, respectivamente), avaliada no campo aberto após 24 h do tratamento (n=7 por grupo, $p<0,05$, Teste ANOVA-Dunnett). ZC = Zona central, ZM = Zona Média, ZP = Zona Periférica.

Tabela 11. Avaliação da atividade locomotora no campo aberto de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon após 48 h do tratamento.

Parâmetro	Zona da arena	Controle (n=7)	Triclorfon (n=7)	Extrato antx-a(s) (n=7)
Distância percorrida (cm)	Central	322,8 ± 27,5	322,2 ± 25,4	354,3 ± 26,5
	Média	718,2 ± 45,8	747,2 ± 76,5	747,3 ± 23,4
	Periférica	1982 ± 359,2	1389 ± 152,4	1571 ± 154,0
	Total	3023 ± 335,2	2319 ± 196,8	2673 ± 161,1
Velocidade ($cm.seg^{-1}$)	Central	12,31 ± 0,8	12,45 ± 1,3	13,3 ± 1,2
	Média	12,62 ± 0,7	11,26 ± 0,9	11,32 ± 1,0
	Periférica	9,159 ± 1,5	6,736 ± 0,7	7,660 ± 0,5
	Total	10,09 ± 1,1	8,201 ± 0,7	8,913 ± 0,5

Dados expressos como média ±epm, ($p>0,05$, ANOVA, pós-teste Dunnett).

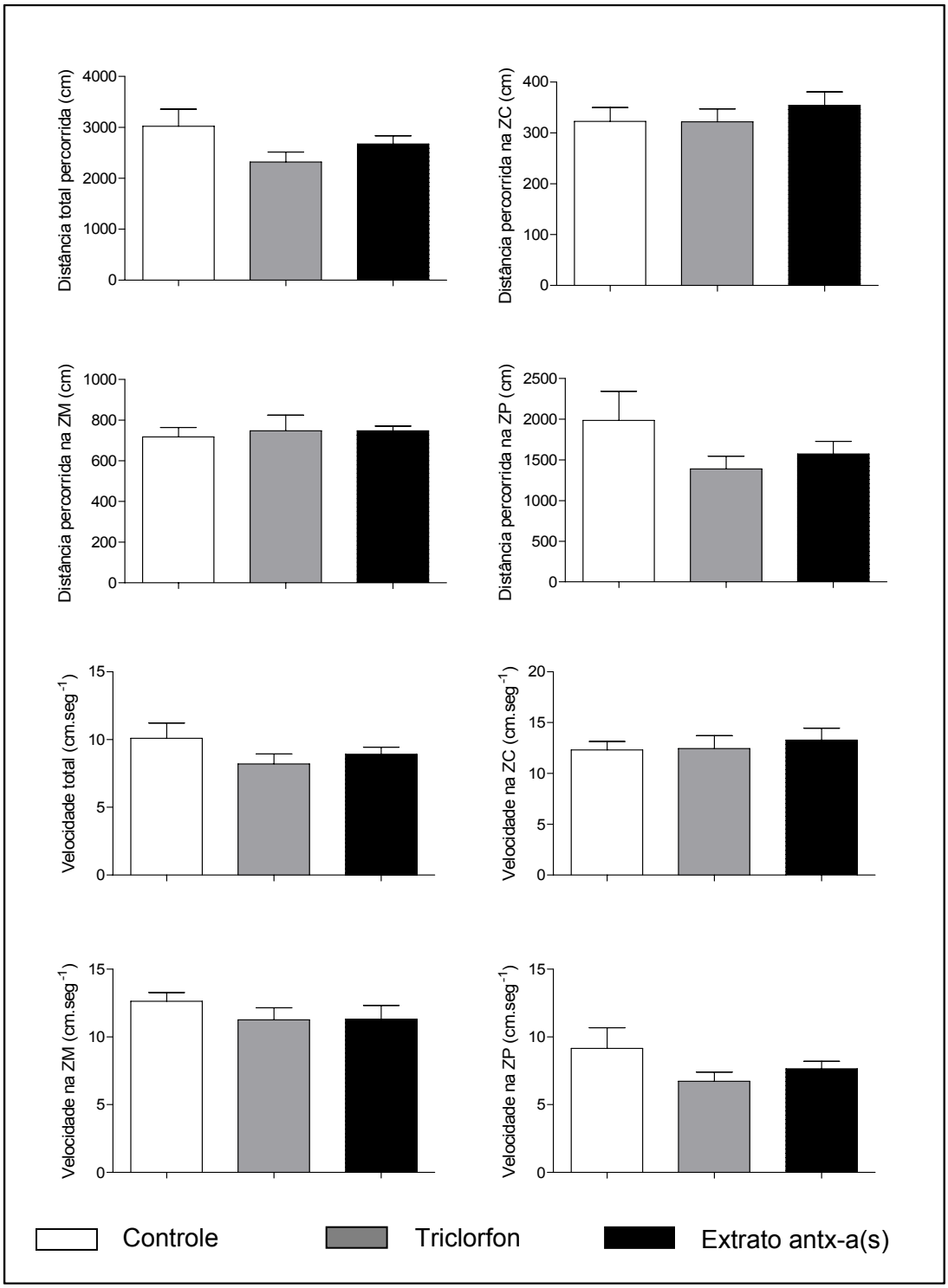


Figura 27. Atividade locomotora de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 mg.kg^{-1}, respectivamente) avaliada no campo aberto após 48 h do tratamento (n=7 por grupo, p>0,05, Teste ANOVA, pós-teste Dunnett). ZC = Zona central, ZM = Zona Média, ZP = Zona Periférica.

Tabela 12. Avaliação da atividade locomotora no campo aberto de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon após 7 dias do tratamento.

Parâmetro	Zona da arena	Controle (n=6)	Triclorfon (n=6)	Extrato antx-a(s) (n=6)
Distância percorrida (cm)	Central	759,7 ± 68,3	689,6 ± 113,7	810,4 ± 90,6
	Média	1854 ± 171,9	1899 ± 207,0	1922 ± 200,8
	Periférica	892,3 ± 250,9	897,2 ± 357,1	959,8 ± 407,2
	Total	3506 ± 408,5	3486 ± 594,0	3692 ± 661,9
Velocidade ($cm.seg^{-1}$)	Central	13,4 ± 1,5	13,4 ± 1,6	14,8 ± 2,6
	Média	8,9 ± 0,9	9,8 ± 1,7	10,03 ± 1,7
	Periférica	27,6 ± 5,4	21,1 ± 4,6	24,40 ± 6,0
	Total	11,7 ± 1,4	11,6 ± 2,0	12,32 ± 2,2

Dados expressos como média ±epm, n= número de animais por grupo ($p>0,05$, ANOVA, pós-teste Dunnett's).

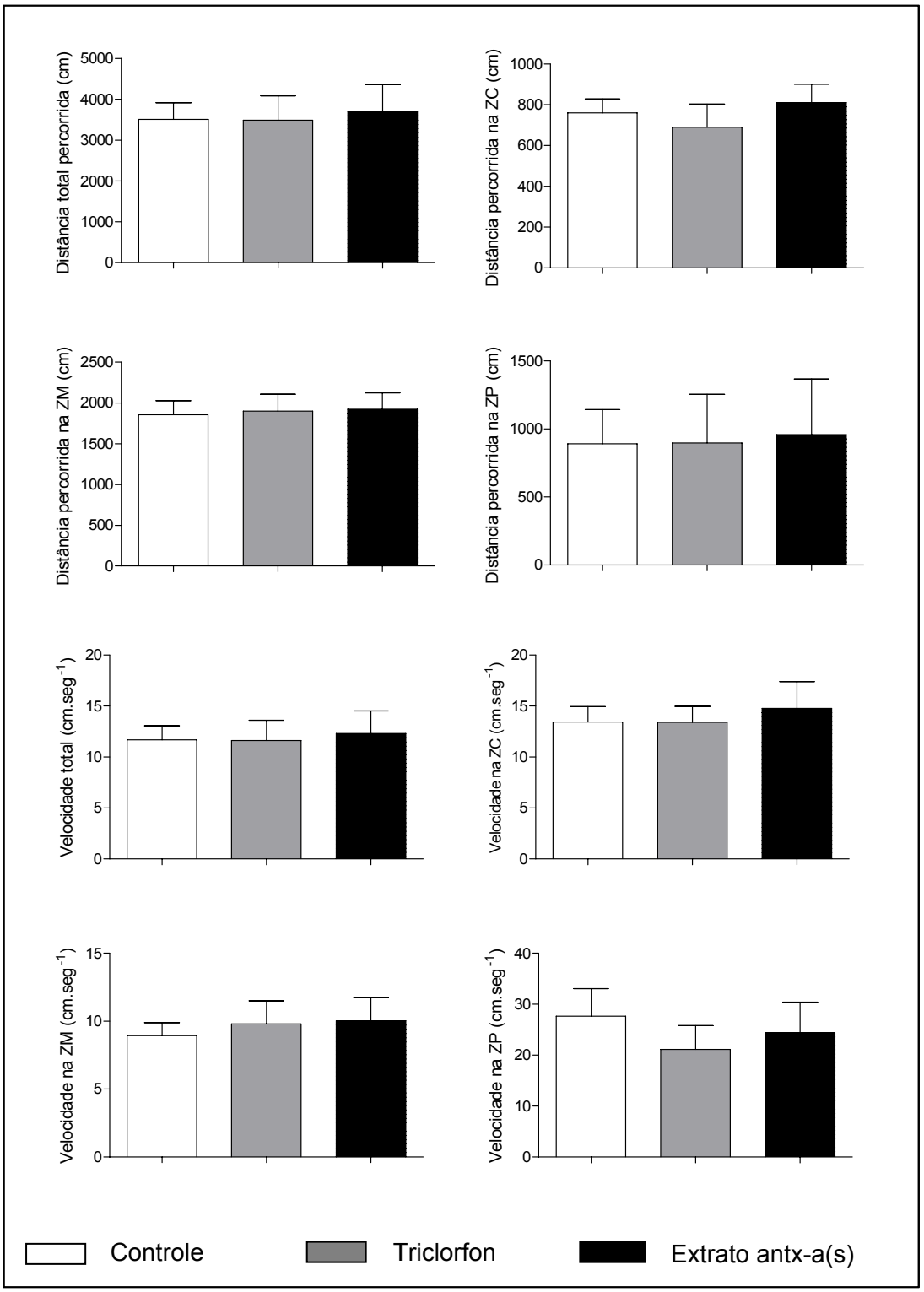


Figura 28. Atividade locomotora de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 mg.kg^{-1}, respectivamente) avaliada no campo aberto após 7 dias do tratamento (n=6 por grupo, p>0,05, Teste ANOVA, pós-teste Dunnett). ZC = Zona central, ZM = Zona Média, ZP = Zona Periférica.

Tabela 13. Avaliação da atividade locomotora no campo aberto de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon após 14 dias do tratamento.

Parâmetro	Zona da arena	Controle (n=7)	Triclorfon (n=7)	Extrato antx-a(s) (n=7)
Distância percorrida (cm)	Central	346,6 ± 71,14	328,6 ± 31,15	282,8 ± 22,65
	Média	898,9 ± 154,8	913,2 ± 52,47	753,3 ± 39,74
	Periférica	1908 ± 515,4	1166 ± 127,5	1223 ± 90,11
	Total	3153 ± 628,3	2274 ± 198,8	2259 ± 111,3
Velocidade ($cm.seg^{-1}$)	Central	11,2 ± 1,68	10,28 ± 1,27	10,08 ± 0,47
	Média	9,92 ± 1,05	9,92 ± 0,78	9,17 ± 0,35
	Periférica	10,68 ± 2,9	6,73 ± 0,47	6,48 ± 0,44
	Total	10,52 ± 2,09	8,036 ± 0,49	7,54 ± 0,37

Dados expressos como média ±epm, n= número de animais por grupo ($p>0,05$, ANOVA, pós-teste Dunnett's).

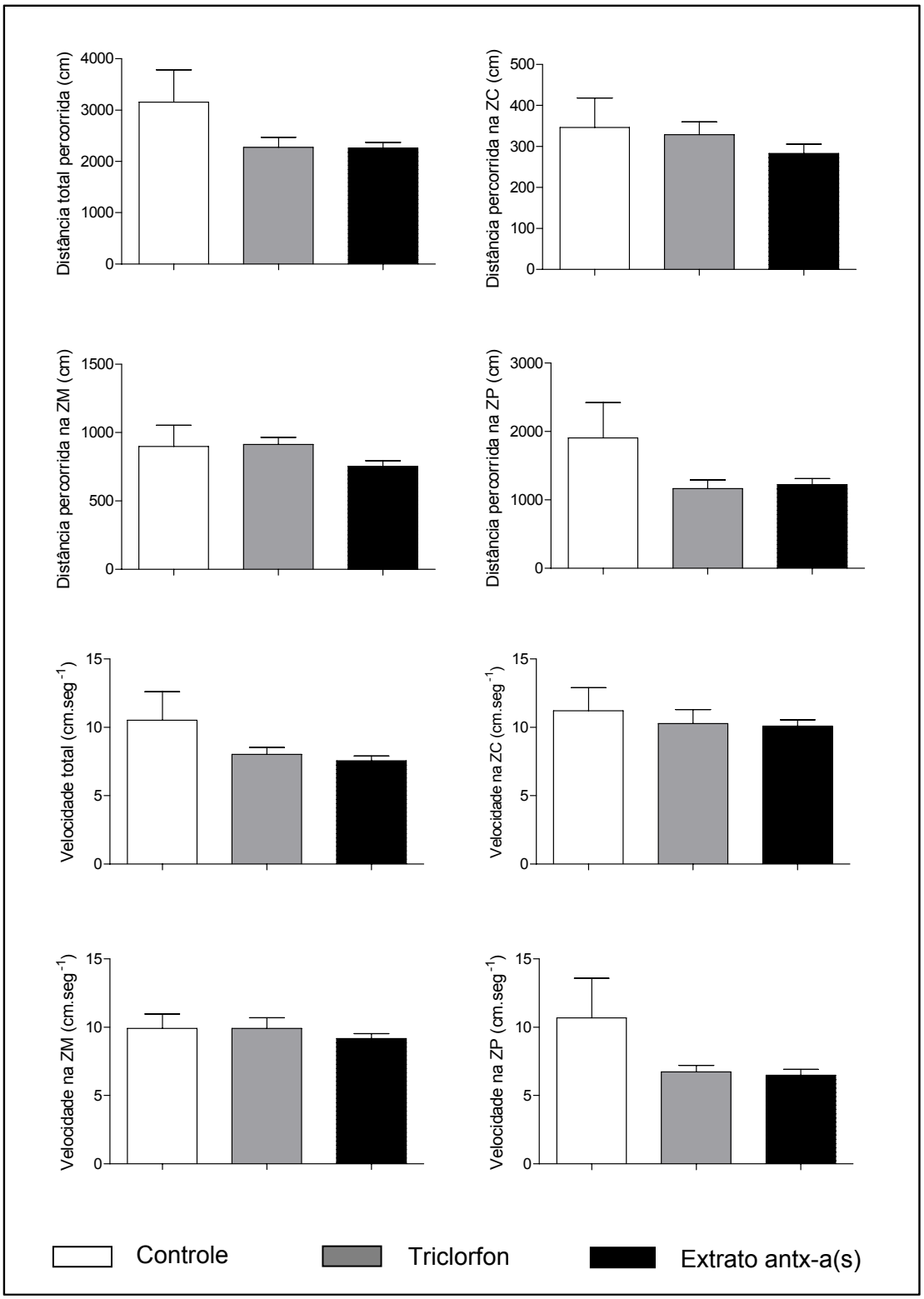


Figura 29. Atividade locomotora de camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 mg.kg^{-1}, respectivamente) avaliada no campo aberto após 14 dias do tratamento (n=7 por grupo, p>0,05, Teste ANOVA, pós-teste Dunnett). ZC = Zona central, ZM = Zona Média, ZP = Zona Periférica.

Com relação a avaliação comportamental no LCE não houve diferença estatística entre os grupos tratados para nenhum dos parâmetros considerados, como apresentado nas tabelas 14 a 17 e nas figuras 30 a 33.

Tabela 14. Avaliação do comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado após 24 h de exposição ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$).

Parâmetro	Zona da arena	Controle (n=7)	Triclorfon (n=7)	Extrato antx-a(s) (n=7)
No de entradas	BA	44,5 ± 10,5	49,3 ± 6,2	42,1 ± 11,5
	BF	71,6 ± 16,3	67,3 ± 19,1	67,7 ± 8,6
	Centro	43,1 ±7,8	32,9 ± 7,6	53,7 ± 6,0
	Total	1	1	1
Tempo de permanência (seg)	BA	101,1 ± 6,0	96,9 ±16,4	97,8 ± 18,9
	BF	160,9 ± 21,8	168,1±25,6	151,2 ± 20,5
	Centro	56,4 ± 6,5	40,53 ± 10,0	51,00 ± 9,5
	Total	300	300	300
% de entradas*	BA	40,0 ± 7,0	46,3 ± 7,0	36,9 ± 7,7
	BF	59,9 ± 7,0	53,7 ± 7,0	63,0 ± 7,7
% Tempo de permanência*	BA	41,4 ± 2,4	37,5 ± 6,6	39,4 ± 7,5
	BF	65,4 ± 8,2	62,5 ± 6,6	60,57± 7,5

Dados expressos como média ±epm, n= número de animais por grupo ($p>0,05$, teste ANOVA-Dunnett para dados paramétricos e teste Kruskall Wallis-Dunn para dados não paramétricos). *Dados não paramétricos.

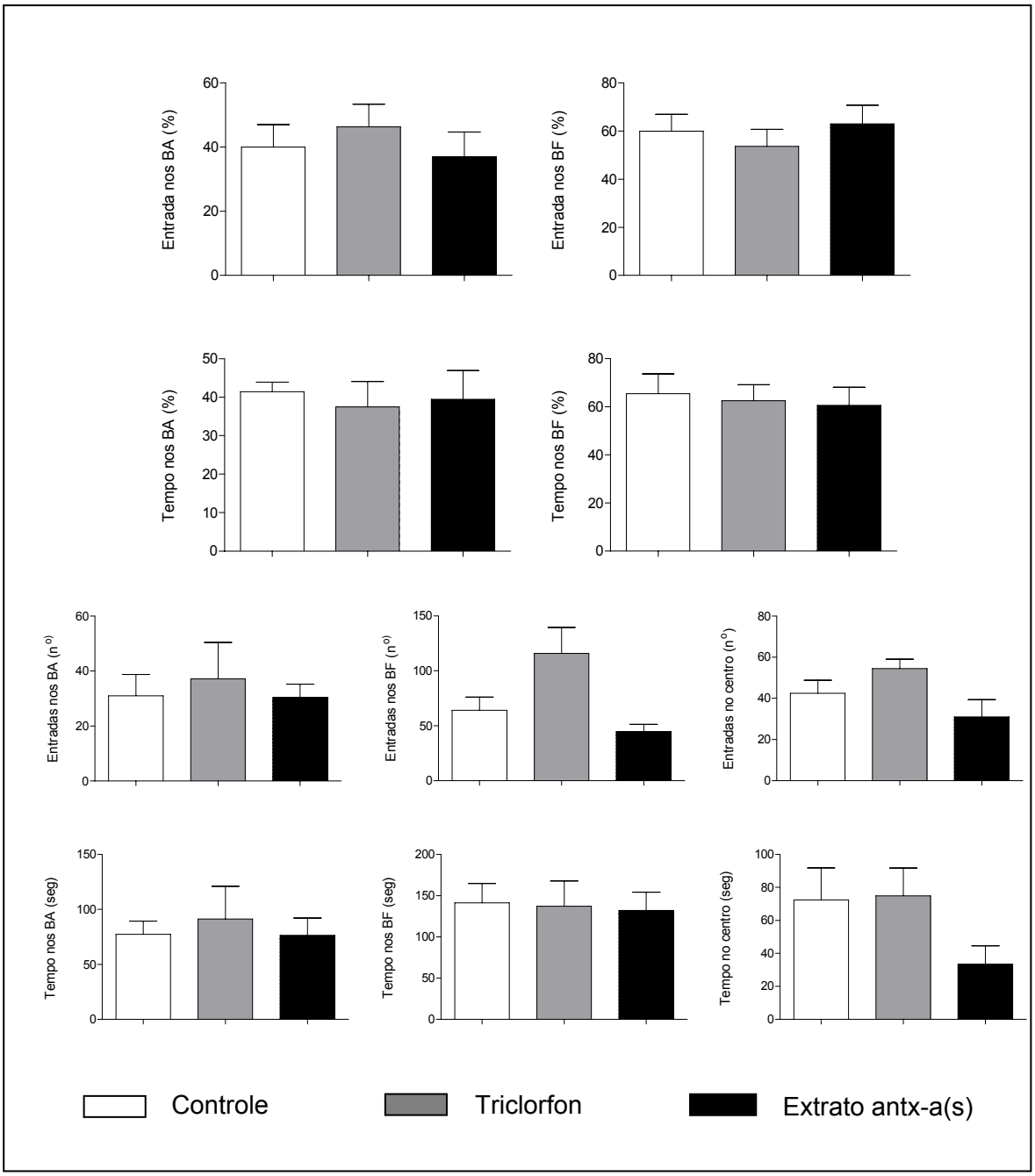


Figura 30. Comportamento apresentado por camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 mg.kg^{-1}, respectivamente) avaliado no labirinto em cruz elevado após 24 h da administração ($p>0,05$, teste ANOVA-Dunnett para dados paramétricos e teste Kruskall Wallis- Dunn para dados não paramétricos).

Tabela 15. Avaliação do comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado após 48 h de exposição ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$), respectivamente.

Parâmetro	Zona da arena	Controle (n=7)	Triclorfon (n=7)	Extrato antx-a(s) (n=7)
No de entradas	BA	24,7 ± 4,1	24,4 ± 1,8	40,7 ± 9,8
	BF	30,3 ± 2,9	22,0 ± 3,3	35,7 ± 5,1
	Centro	44,1 ± 4,9	39,3 ± 3,3	46,86 ± 3,0
	Total	1	1	1
Tempo de permanência (seg)	BA	62,4 ± 10,9	81,9 ± 12,6	78,9 ± 8,7
	BF	134,7 ± 11,8	108,5 ±10,3	130,7± 10,1
	Centro	103,0 ± 9,7	109,6 ± 7,6	90,4 ± 6,9
	Total	300	300	300
% de entradas*	BA	43,5 ± 4,4	53,7 ± 3,6	51,5 ± 4,4
	BF	56,5 ± 4,4	46,3 ± 3,6	48,5 ± 4,4
% tempo de permanência*	BA	31,4 ± 5,3	42,5 ± 6,2	37,8 ± 4,2
	BF	68,6 ± 5,3	57,5 ± 6,2	62,2 ± 4,2

Dados expressos como média ±epm, n= número de animais por grupo ($p>0,05$, teste ANOVA-Dunnett para dados paramétricos e teste Kruskall Wallis-Dunn para dados não paramétricos). *Dados não paramétricos.

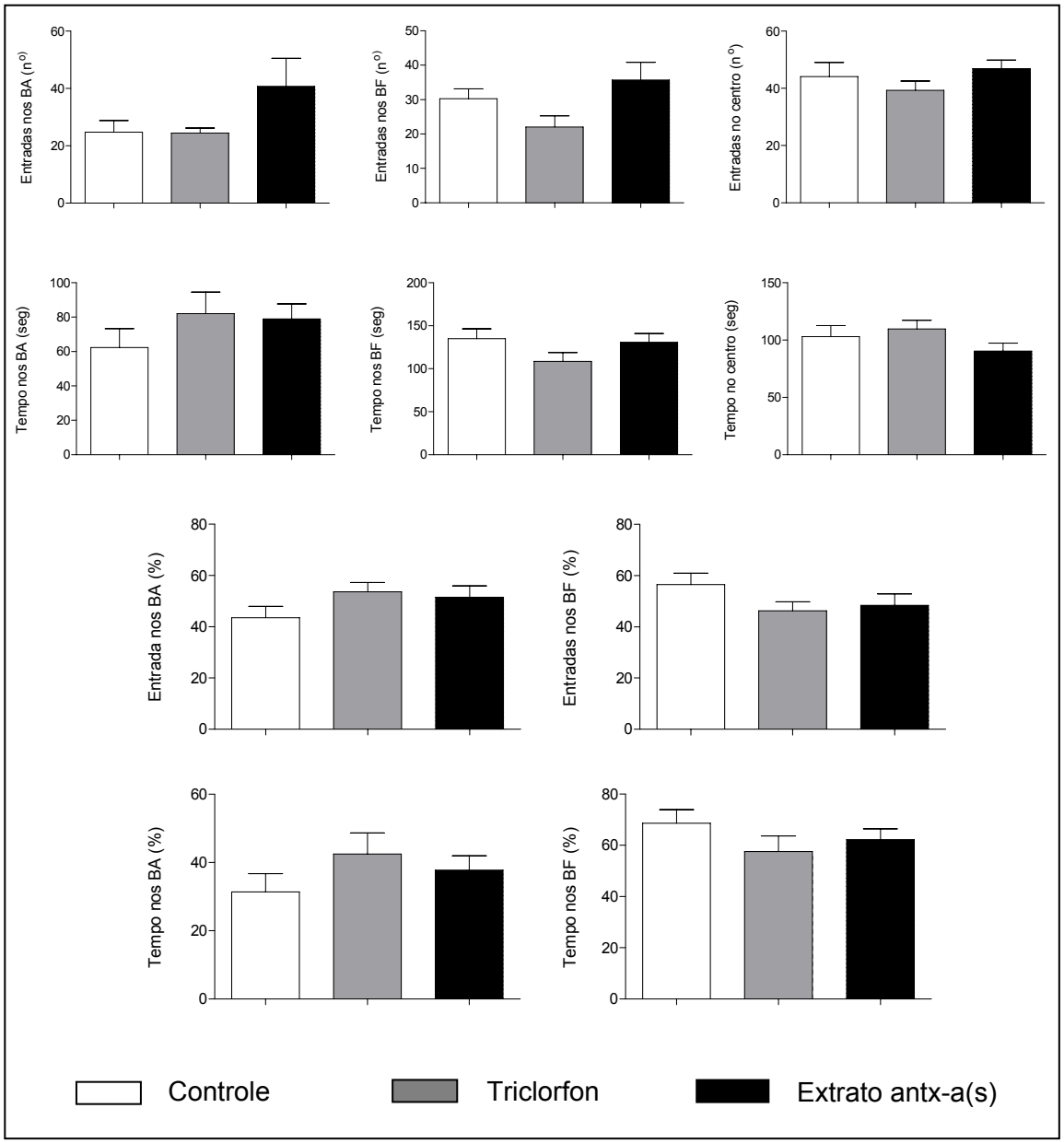


Figura 31. Comportamento apresentado por camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 mg.kg^{-1}, respectivamente) avaliado no labirinto em cruz elevado após 48h da administração ($p>0,05$, teste ANOVA-Dunnett para dados paramétricos e teste Kruskall Wallis- Dunn para dados não paramétricos).

Tabela 16. Avaliação do comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado após 7 dias de exposição ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$), respectivamente.

Parâmetro	Zona da arena	Controle (n=6)	Triclorfon (n=6)	Extrato antx-a(s)) (n=6)
No de entradas	BA	31,0 ± 7,7	37,8 ± 13,2	30,3 ± 4,9
	BF	64,0 ± 12,0	115,8 ± 23,5	44,7 ± 6,6
	Centro	42,5 ± 6,3	54,5 ± 4,5	31,0 ± 8,4
	Total	1	1	1
Tempo de permanência (seg)	BA	77,4 ± 11,9	91,2 ± 29,8	76,4 ± 15,8
	BF	141,2 ± 23,6	137,2 ± 30,4	132,0 ± 22,3
	Centro	72,5 ± 19,3	74,9 ± 16,8	33,6 ± 11,1
	Total	300	300	300
% de entradas*	BA	33,61 ± 6,8	26,05 ± 8,9	40,08 ± 4,1
	BF	66,4 ± 6,8	73,9 ± 8,9	59,9 ± 4,1
% tempo de permanência*	BA	36,8 ± 6,5	39,5 ± 10,6	37,2 ± 8,2
	BF	63,1 ± 6,5	60,5 ± 10,6	62,8 ± 8,2

Dados expressos como média ±epm, n= número de animais por grupo ($p>0,05$, teste ANOVA-Dunnett para dados paramétricos e teste Kruskall Wallis-Dunn para dados não paramétricos). *Dados não paramétricos.

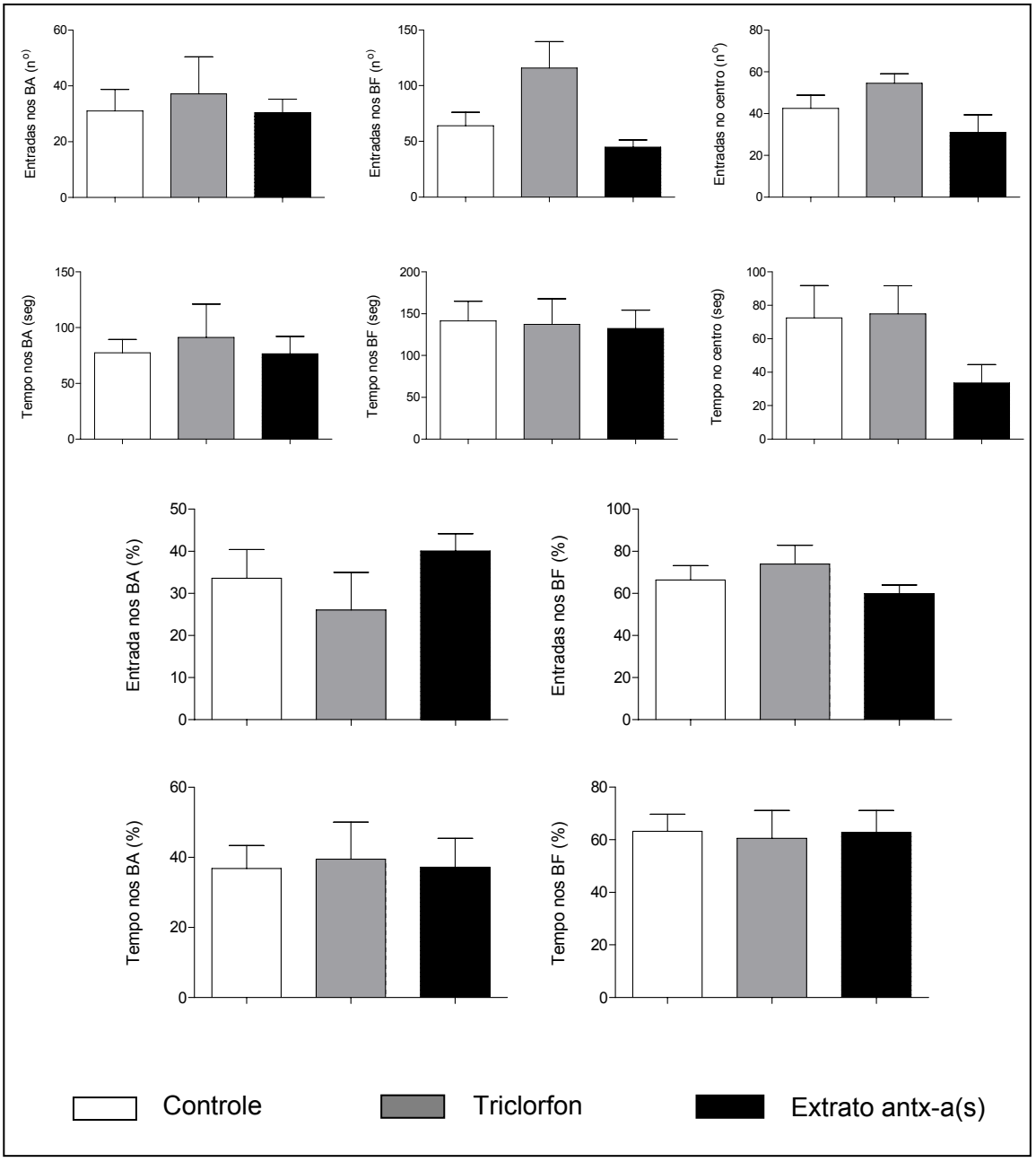


Figura 32. Comportamento apresentado por camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 mg.kg^{-1}, respectivamente) avaliado no labirinto em cruz elevado após 7 dias da administração ($p>0,05$, teste ANOVA-Dunnett para dados paramétricos e teste Kruskall Wallis- Dunn para dados não paramétricos).

Tabela 17. Avaliação do comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado após 14 dias de exposição ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo antx-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$), respectivamente.

Parâmetro	Zona da arena	Controle (n=7)	Triclorfon (n=7)	Extrato antx-a(s) (n=7)
No de entradas	BA	14,29 ± 2,05	17,43 ± 1,46	15,43 ± 1,91
	BF	35,14 ± 12,51	27,43 ± 3,96	26,86 ± 1,78
	Centro	42,43 ± 5,69	38,71 ± 2,21	38,71 ± 1,90
	Total	1	1	1
Tempo de permanência (seg)	BA	55,09 ± 4,85	61,48 ± 3,99	61,98 ± 13,5
	BF	121,7 ± 8,05	112,7 ± 8,62	140,6 ± 15,13
	Centro	123,1 ± 5,67	125,9 ± 8,73	97,33 ± 8,61
	Total	300	300	300
% de entradas*	BA	34,56 ± 6,09	39,95 ± 2,85	37,06 ± 3,99
	BF	65,44 ± 6,09	60,05 ± 2,85	62,94 ± 3,99
% tempo de permanência*	BA	31,40 ± 3,02	35,63 ± 2,61	30,80 ± 6,38
	BF	68,60 ± 3,02	64,37 ± 2,61	69,2 ± 6,38

Dados expressos como média ±epm, n= número de animais por grupo ($p>0,05$, teste ANOVA-Dunnett para dados paramétricos e teste Kruskall Wallis-Dunn para dados não paramétricos). *Dados não paramétricos.

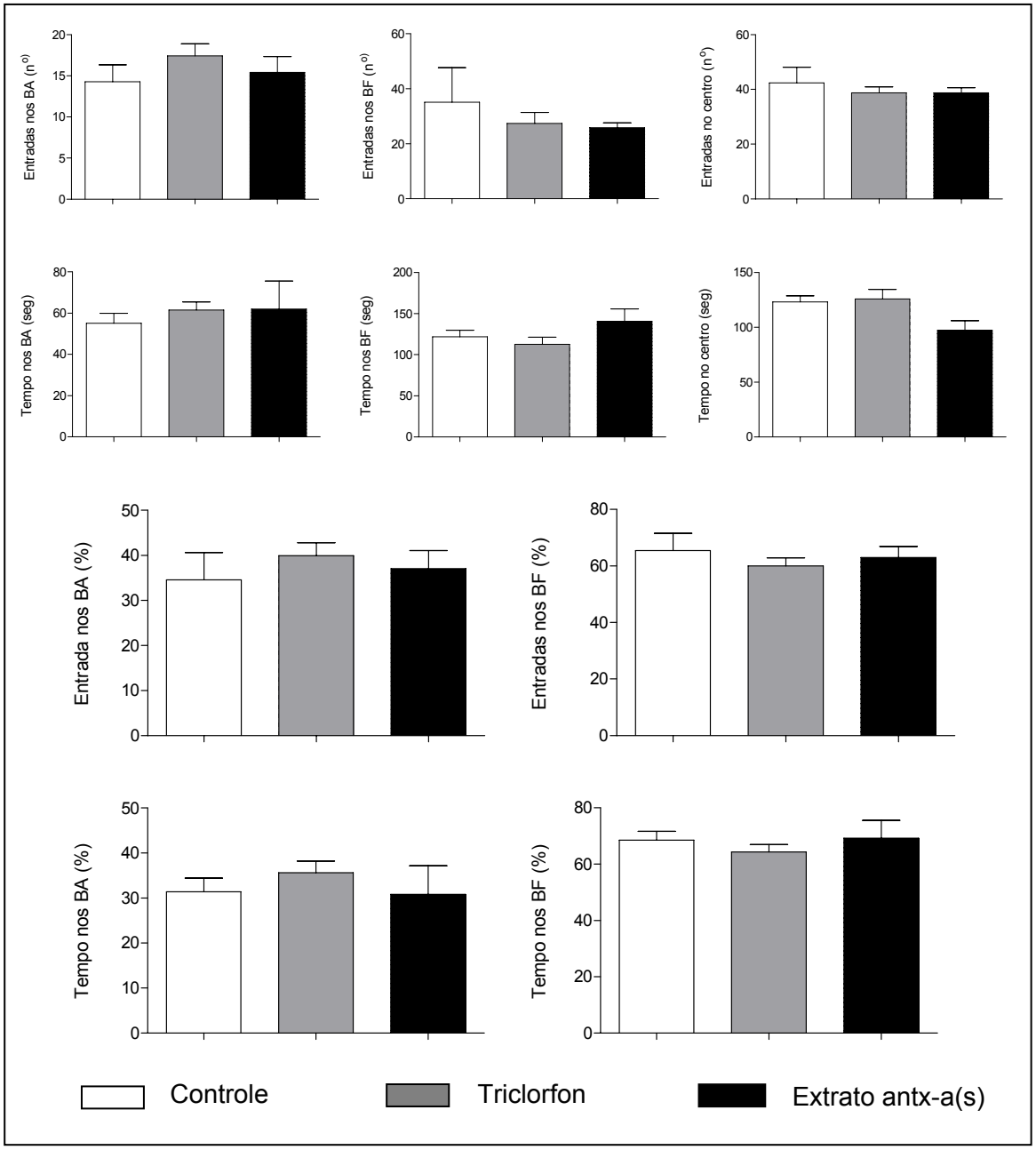


Figura 33. Comportamento apresentado por camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon (20 e 100 mg.kg^{-1}, respectivamente) avaliado no labirinto em cruz elevado após 14 dias da administração ($p>0,05$, teste ANOVA-Dunnett para dados paramétricos e teste Kruskall Wallis- Dunn para dados não paramétricos).

5.10 Experimento 10 – Avaliação da atividade das enzimas AChE e BuChE em camundongos expostos ao extrato contendo anatoxina-a(s) e ao triclorfon

Como pode ser observado na figura 34, a atividade da enzima AChE eritrocitária mostrou-se intensamente inibida em ambos os grupos de animais tratados com triclorfon e extrato contendo antx-a(s) (n=9, ANOVA-Dunnett $p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente) após 24 h de tratamento. A atividade da AChE permaneceu inibida até 48 h somente no grupo de animais tratados com extrato contendo antx-a(s) (n=9, ANOVA-Dunnett $p<0,05$), voltando à normalidade até o sétimo dia. Os resultados obtidos através das análises da atividade da enzima BuChE plasmática não apresentaram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos tratados (teste ANOVA, pós-teste Dunnett, $p>0,05$). As tabelas 18 e 19 e as figuras 34 e 35 mostram os resultados referentes a este experimento.

Tabela 18. Atividade da enzima AChE eritrocitária em camundongos após 24 h, 48 h, 7 e 14 dias de exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$)

Agente	Animais por grupo	Duração do tratamento	AChE ($\mu mol.min^{-1}.g\ Hb^{-1}$)
Controle			6,98 ± 0,70
Triclorfon	9	24 h	4,62 ± 0,11**
Extrato antx-a(s)			4,32 ± 0,33***
Controle			7,62 ± 1,03
Triclorfon[a]	9	48 h	6,87 ± 1,29
Extrato antx-a(s)			4,41 ± 0,45*
Controle			5,22 ± 0,62
Triclorfon	10	7 dias	5,82 ± 0,48
Extrato antx-a(s)			5,47 ± 0,56
Controle			5,34 ± 0,45
Triclorfon	10	14 dias	4,93 ± 0,41
Extrato antx-a(s)			5,04 ± 0,40

Dados expressos como média ±epm (*$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$, teste ANOVA, pós-teste Dunnett).[a]Uma das amostras foi descartada.

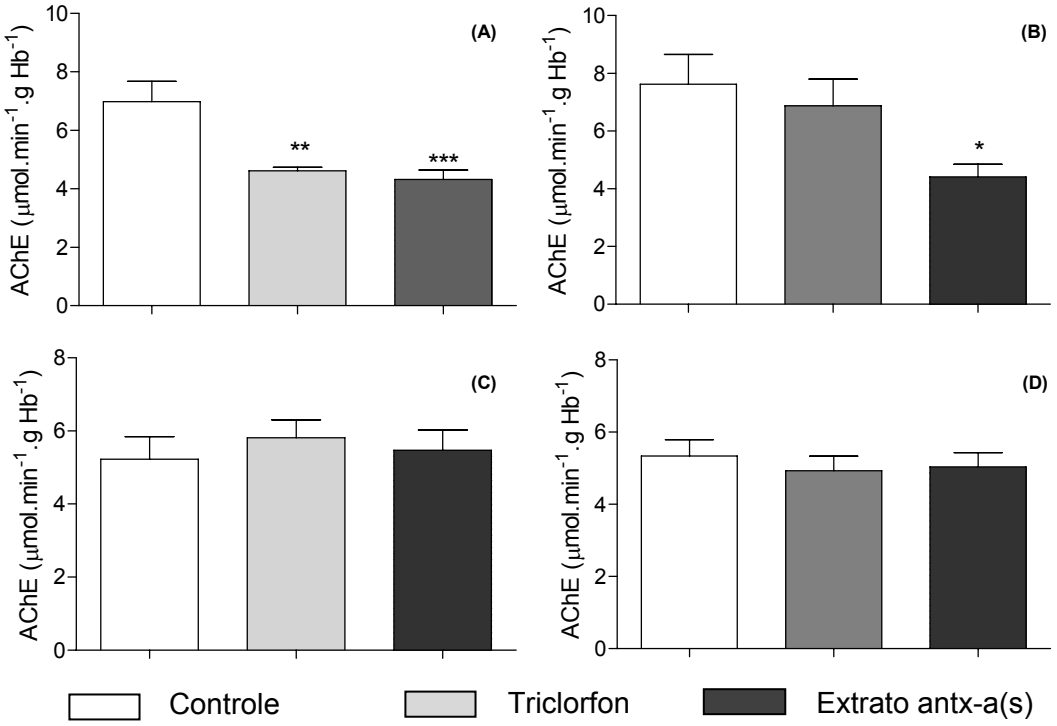


Figura 34. Atividade da enzima AChE eritrocitária em camundongos tratados via intraperitoneal com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 dias (C) e 14 dias (D) de exposição.

Tabela 19. Atividade da enzima BuChE plasmática em camundongos após 24 h, 48 h, 7 e 14 dias de exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}).

Agente	Animais por grupo	Duração do tratamento	BuChE (U.l^{-1})
Controle			1022 ± 102,2
Triclorfon	9	24 h	884,2 ± 112,1
Extrato antx-a(s)			704,4 ± 80,19
Controle			871,2 ± 103,3
Triclorfon	9	48 h	902,7 ± 114,3
Extrato antx-a(s)			624,8 ± 79,77
Controle			1198 ± 110,6
Triclorfon	10	7 dias	1095 ± 100,1
Extrato antx-a(s)			1080 ± 56,39
Controle			1158 ± 93,69
Triclorfon	10	14 dias	1023 ± 92,99
Extrato antx-a(s)			875,5 ± 103,6

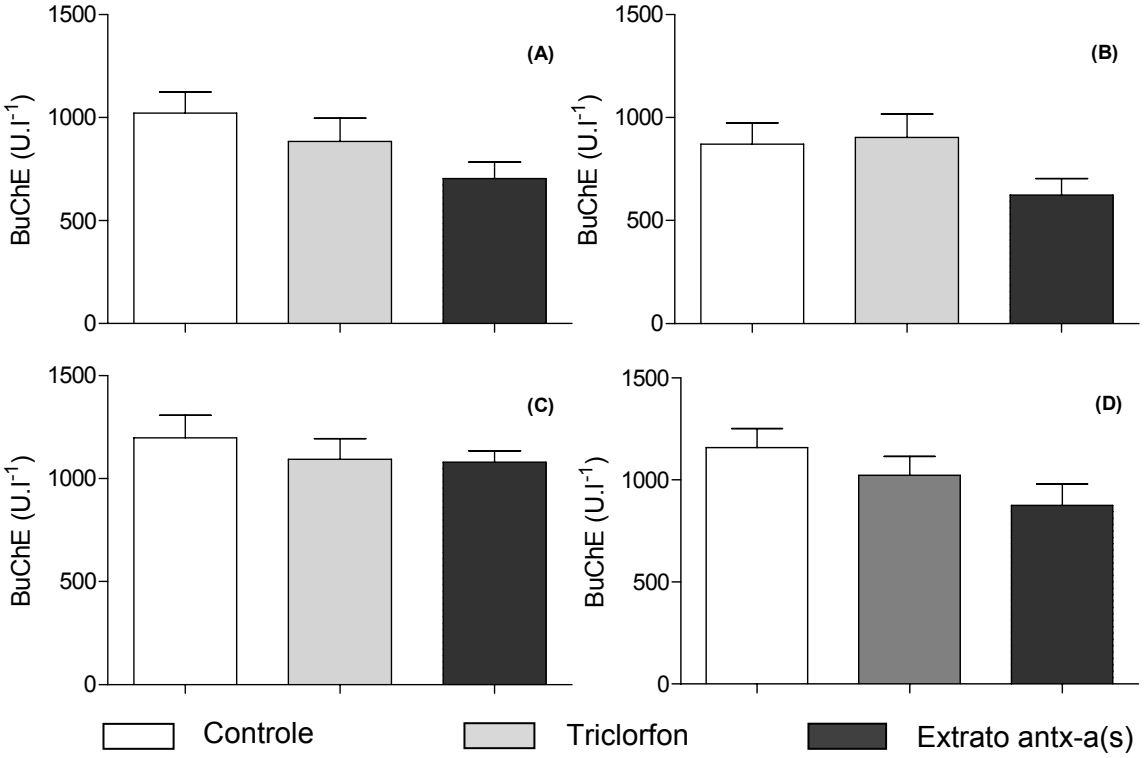


Figura 35. Atividade da enzima BuChE plasmática em camundongos tratados via intraperitoneal com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 dias (C) e 14 dias (D) de exposição.

5.11 Experimento 11 – Efeito do extrato contendo anatoxina-a(s) na atividade das enzimas CAT, GPx, GR e SOD em camundongos

Com relação a atividade enzimática antioxidante avaliada em eritrócitos de camundongos tratados com extrato contendo antx-a(s) e triclorfon, observou-se que após 48h de tratamento, a atividade das enzimas CAT e GPx apresentou diminuição estatística significante (n=9, $p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente, teste ANOVA, pós-teste Dunnett). Após 7 dias de tratamento, o grupo de animais tratado com extrato contendo antx-a(s) apresentou várias alterações, entre elas, a atividade da enzima GPx apresentou-se fortemente inibida, enquanto que a atividade da GR e CAT apresentou-se aumentada (n=10, $p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente, teste ANOVA, pós-teste Dunnett). Por outro lado, os resultados da atividade da enzima CuZnSOD não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos tratamentos realizados.

As tabelas 20 a 23 e as figuras 36 a 39 apresentam os dados de atividade das enzimas avaliadas.

Tabela 20. Atividade da enzima CAT eritrocitária em camundongos após exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 $mg.kg^{-1}$) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 $mg.kg^{-1}$) durante 24h, 48h e 7 dias.

Agente	Animais por grupo	Duração do tratamento	CAT ($\mu mol.seg^{-1}.g\ Hb^{-1}$)
Controle			3088 ± 170,3
Triclorfon	9	24 h	2727 ± 125,8
Extrato antx-a(s)			3181 ± 155,3
Controle			3457 ± 190,8
Triclorfon	9	48 h	2846 ± 205,7
Extrato antx-a(s)			2755 ± 185,5*
Controle			2583 ± 88,28
Triclorfon	10	7 dias	3435 ± 202,0***
Extrato antx-a(s)			3403 ± 139,3**
Controle			2958 ± 207,8
Triclorfon	10	14 dias	3396 ± 292,4
Extrato antx-a(s)			3103 ± 131,1

Dados expressos como média ±epm (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, teste ANOVA, pós-teste Dunnett)

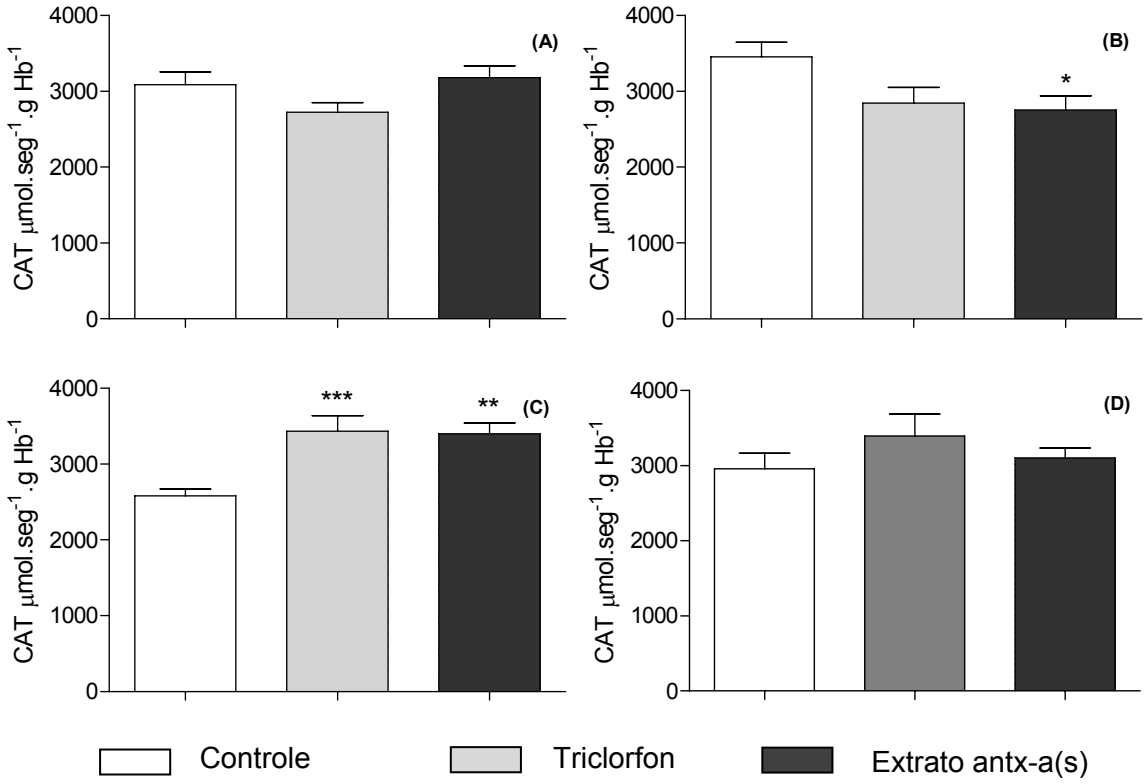


Figura 36. Atividade da enzima CAT eritrocitária em camundongos tratados via intraperitoneal com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 dias (C) e 14 dias (D) de exposição.

Tabela 21. Atividade da enzima GPx eritrocitária em camundongos após exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) durante 24 h, 48 h, 7 e 14 dias.

Agente	Animais por grupo	Duração do tratamento	GPx (µmol.min^{-1}.g Hb^{-1})
Controle			227,2 ± 14,90
Triclorfon	9	24 h	201,1 ± 14,19
Extrato antx-a(s)			234,9 ± 14,75
Controle			304,3 ± 16,15
Triclorfon	9	48 h	168,1 ± 27,94***
Extrato antx-a(s)			112,4 ± 4,979***
Controle			296,8 ± 11,23
Triclorfon	10	7 dias	152,4 ± 7,14***
Extrato antx-a(s)			167,1 ± 5,041***
Controle			163,2 ± 2,9
Triclorfon	10	14 dias	152,8 ± 5,94
Extrato antx-a(s)			158,3 ± 13,64

Dados expressos como média ±epm (***p<0,001, teste ANOVA, pós-teste Dunnett)

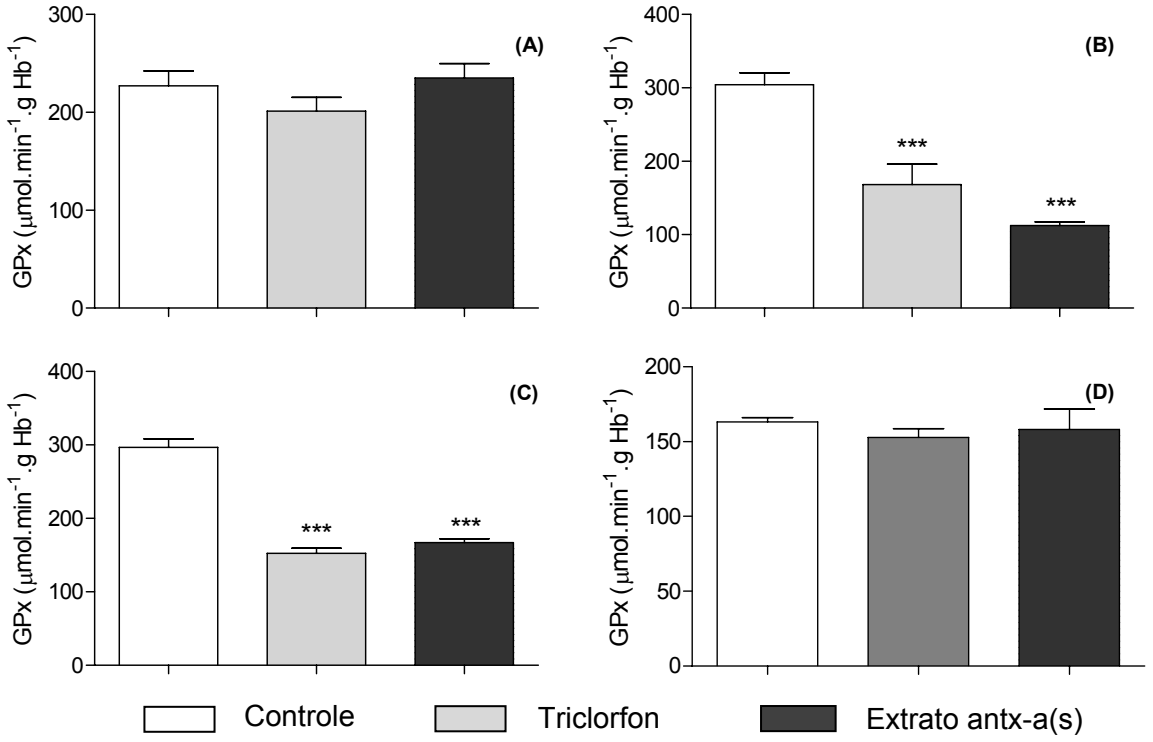


Figura 37. Atividade da enzima GPx eritrocitária em camundongos tratados via i.p. com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 (C) e 14 dias (D) de exposição.

Tabela 22. Atividade da enzima GR eritrocitária em camundongos após exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e ao extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) durante 24 h, 48 h, 7 e 14 dias.

Agente	Animais por grupo	Duração do tratamento	GR (µmol.min^{-1}.g Hb^{-1})
Controle			5,57 ± 0,36
Triclorfon	9	24 h	5,9 ± 0,28
Extrato antx-a(s)			5,28 ± 0,22
Controle			10,95 ± 0,77
Triclorfon	9	48 h	11,66 ± 1,35
Extrato antx-a(s)			9,39 ± 0,54
Controle			6,11 ± 0,22
Triclorfon	10	7 dias	6,74 ± 0,25
Extrato antx-a(s)			7,31 ± 0,30**
Controle			6,94 ± 0,58
Triclorfon	10	14 dias	7,50 ± 0,59
Extrato antx-a(s)			6,46 ± 0,26

Dados expressos como média ±epm (***p<0,001, teste ANOVA, pós-teste Dunnett)

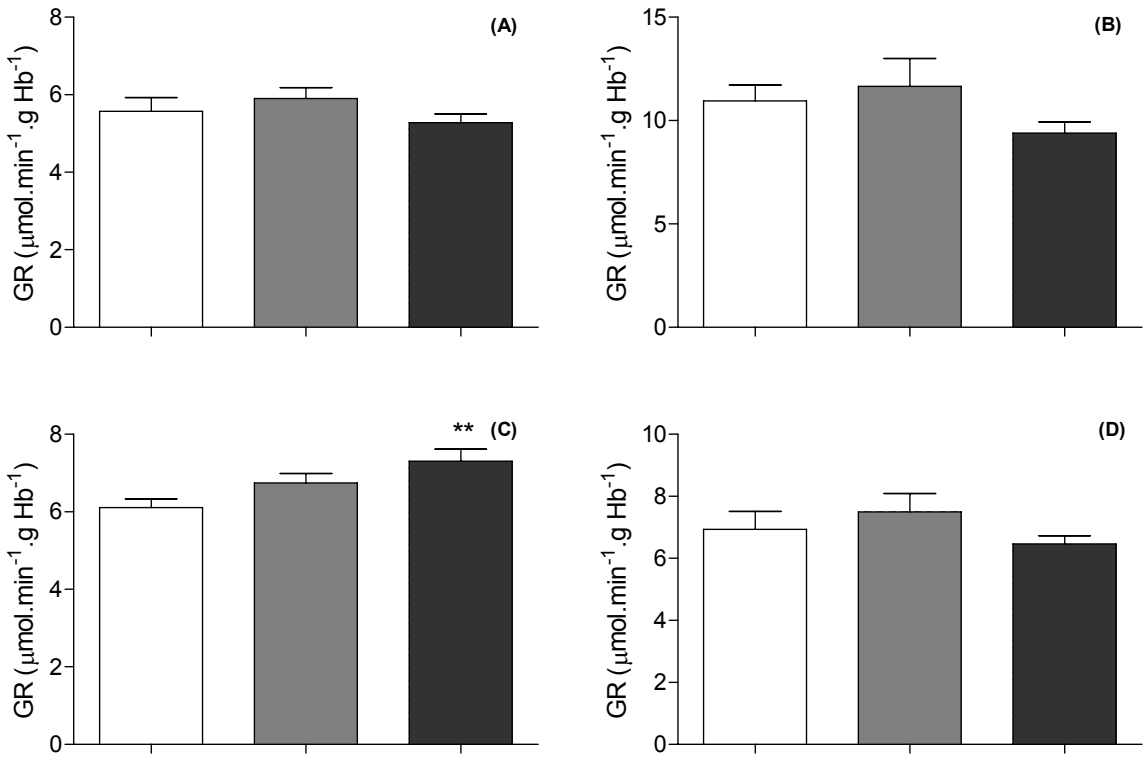


Figura 38. Atividade da enzima GR eritrocitária em camundongos tratados via i.p. com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 (C) e 14 dias (D) de exposição.

Tabela 23. Atividade da enzima CuZnSOD eritrocitária em camundongos após exposição via intraperitoneal ao triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e ao extrato contendo antx-a(s) (20 mg.kg^{-1}) durante 24 h, 48 h, 7 e 14 dias.

Agente	Animais por grupo	Duração do tratamento	SOD (U.g Hb^{-1})
Controle	9	24 h	6256 ± 1251
Triclorfon			7507 ± 973
Extrato antx-a(s)			8515 ± 1240
Controle	9	48 h	7367 ± 1308
Triclorfon			9190 ± 2241
Extrato antx-a(s)			5180 ± 657,7
Controle	10	7 dias	11560 ± 2720
Triclorfon			10810 ± 1083
Extrato antx-a(s)			9718 ± 1609
Controle	10	14 dias	7907 ± 966,4
Triclorfon			7162 ± 1131
Extrato antx-a(s)			5952 ± 975,9

Dados expressos como média ±epm (p>0,05, teste ANOVA, pós-teste Dunnett)

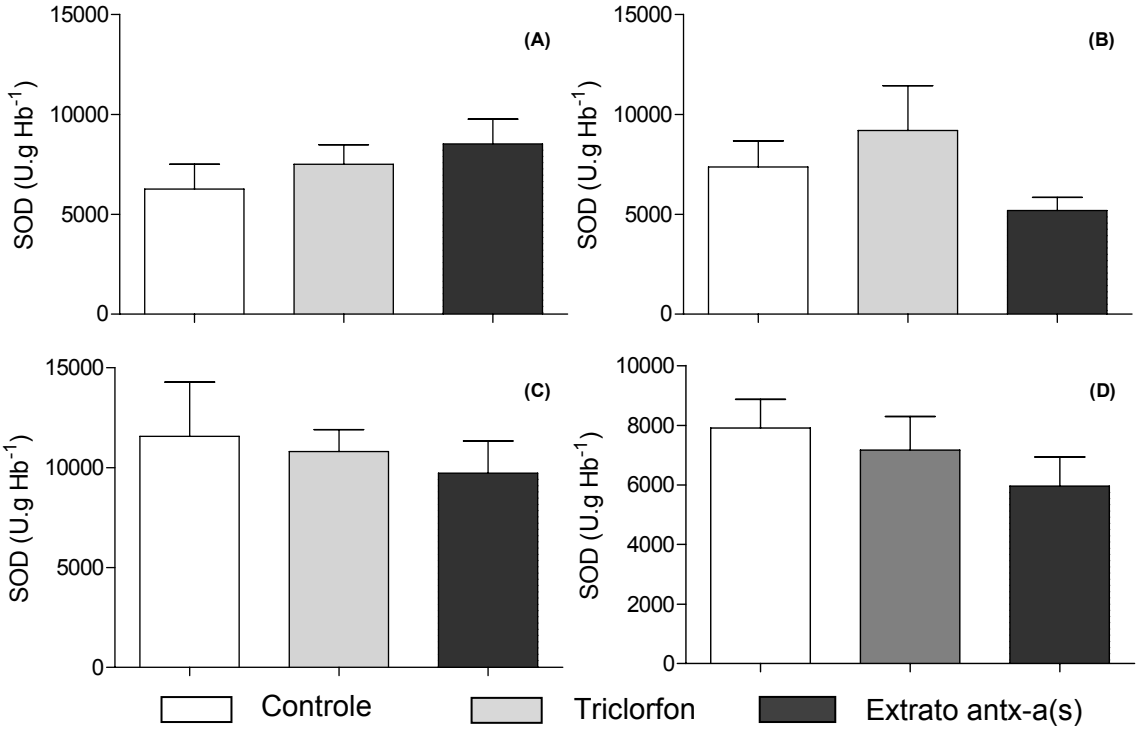


Figura 39. Atividade da enzima CuZnSOD em camundongos tratados via intraperitoneal com triclorfon (100 mg.kg^{-1}) e extrato contendo anatoxina-a(s) (20 mg.kg^{-1}) após 24 h (A), 48 h (B), 7 dias (C) e 14 dias (D) de exposição.

5.12 Experimento 12 – Efeito do extrato contendo anatoxina-a(s) na atividade das enzimas CAT, GPx, GST e GR em sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.)

Na avaliação da atividade das enzimas antioxidantes em sementes tratadas com diferentes doses de extrato contendo antx-a(s), a GPx foi a que se mostrou significantemente diminuída em relação ao controle (grupos EA2, EA3 e EA5, n=5, teste ANOVA, pós-teste Dunnett, $p<0,01$, $p<0,01$ e $p<0,001$ para cada grupo, respectivamente). Da mesma forma, a atividade da enzima GST somente apresentou diferença significativa no grupo de sementes tratadas com a dose mais baixa do extrato, ou seja, 0,018 $\mu g.\mu l^{-1}$ (n=5, teste ANOVA, pós-teste Dunnett, $p<0,01$). A tabela 24 e a figura 40 exibem os resultados obtidos neste experimento.

Tabela 24. Atividade das enzimas GR, CAT, GPx e GST em $nkat.mg^{-1}$ em sementes de alfafa (*Medicago sativa L.*) expostas durante 7 dias a diferentes doses de extrato contendo antx-a(s).

Enzima ($nkat.mg^{-1}$ proteína)	Grupos de tratamento (n)					
	C (8)	ELC (5)	EA-1 (5)	EA-2 (5)	EA-3 (5)	EA-4 (5)
GR	0,067 ± 0,041	0,025 ± 0,008	0,019 ± 0,005	0,067 ± 0,053	0,051 ± 0,011	0,075 ± 0,029
CAT	164,4 ± 29,55	120,0 ± 27,60	155,7 ± 25,51	114,5 ± 32,25	100,8 ± 38,38	195,1 ± 70,37
GPx	0,083 ± 0,018	0,037 ± 0,008	0,043 ± 0,001	0,0340 ± 0,011*	0,027 ± 0,009*	0,021 ± 0,005**
GST	0,491 ± 0,098	0,383 ± 0,032	0,358 ± 0,064	0,386 ± 0,071	0,178 ± 0,045*	0,243 ± 0,037

Dados expressos como média ±epm (*$p<0,05$; **$p<0,01$, teste ANOVA, pós-teste Dunnett) C= controle; ELC = extrato livre de cianotoxina; EA-1 = Extrato contendo antx-a(s) 1,8 $\mu g.\mu l^{-1}$; EA - 2 = Extrato contendo antx-a(s) 0,18 $\mu g.\mu l^{-1}$; EA - 3 = Extrato contendo antx-a(s) 0,018 $\mu g.\mu l^{-1}$; EA - 4 = Extrato contendo antx-a(s) 0,0018 $\mu g.\mu l^{-1}$.

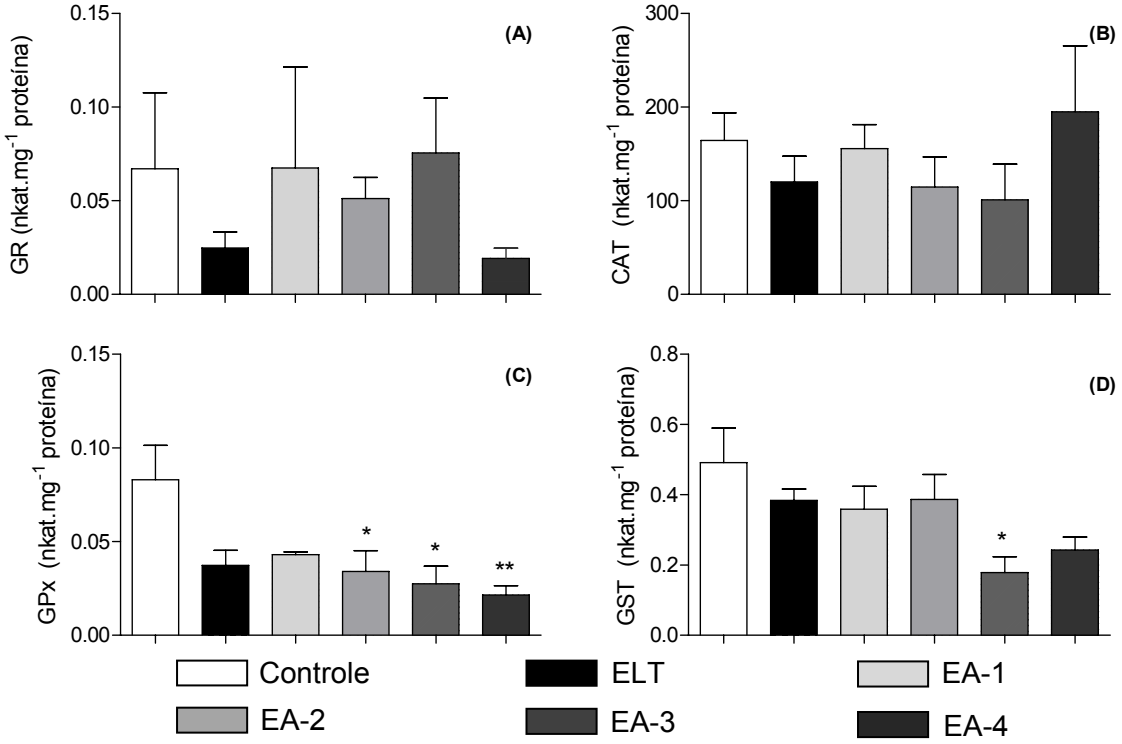


Figura 40. Atividade das enzimas (A) GR, (B) CAT, (C) GPx, (D) GST em sementes de alfafa após sete dias de exposição a diferentes concentrações do extrato contendo anatoxina-a(s) (EA-1=1,8; EA-2= 0,18; EA-3= 0,018 e EA-4=0,0018 µg.µl^{-1}), extrato livre de cianotoxinas (ELT) e água destilada (Controle).

5.13 Experimento 13 – Avaliação do efeito do extrato contendo anatoxina-a(s) em coração de barata *Leurolestes circunvagans*

Conforme descrito no item 4.5.13, a presença de antx-a(s) no extrato preparado para este experimento foi previamente caracterizada por LC-MS. Na figura 41 é apresentado o cromatograma e os espectros *full scan* e MS^2 obtidos na análise do extrato utilizado na preparação de CSIB.

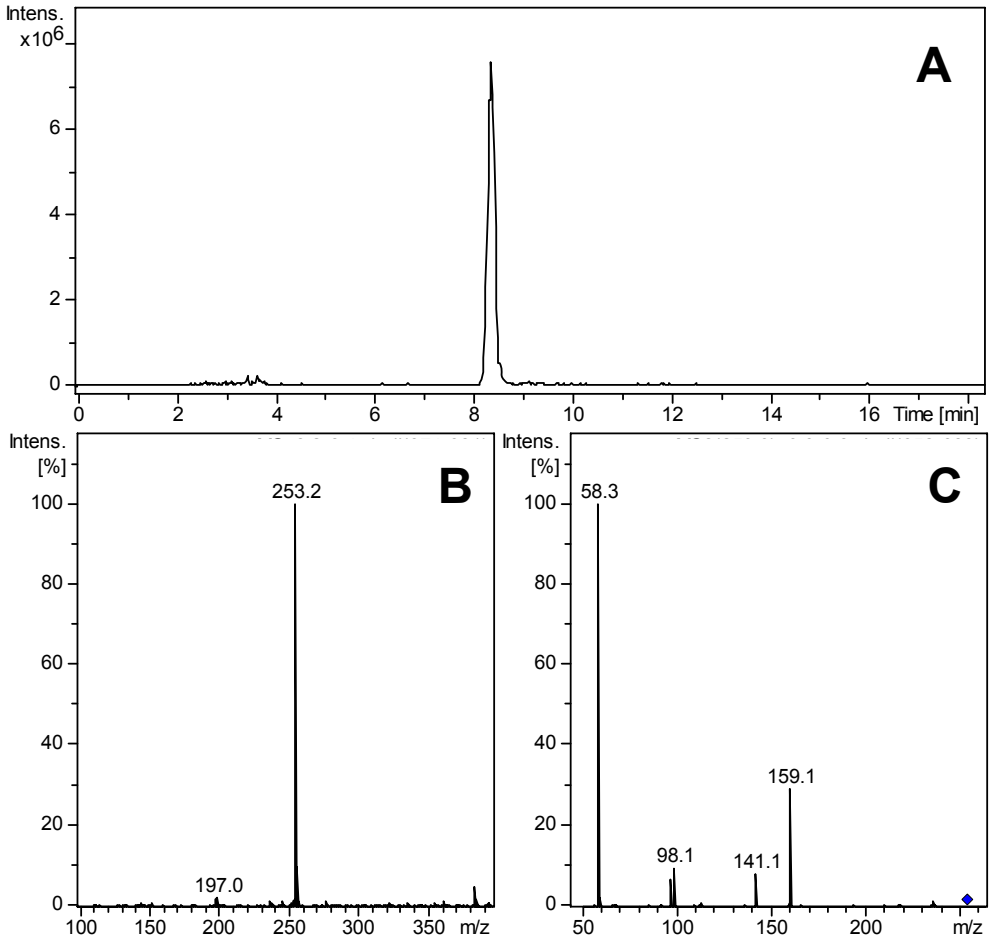


Figura 41. Identificação de anatoxina-a(s) no extrato de *Anabaena spiroides* por LC-MS. (A) Cromatograma do íon *m/z* 253 proveniente da $[M+H^+]$ de anatoxina-a(s); (B) Espectro de massas *full scan*; (C) Espectro de massas MS^2 do íon *m/z* 253 mostrando os íons caraterísticos de anatoxina-a(s).

Após incubação com as soluções utilizadas no coração de barata observou-se que a atividade enzimática da AChE foi inibida pelo extrato contendo antx-a(s) de forma dose-dependente na faixa de 79 a 96% (Figura 42). A dose de $2{,}5x10^3$ µg de extrato contendo antx-a(s).g^{-1} de animal provocou um efeito taquicárdico estatísticamente significante em baratas tratadas com esse extrato (Figura 43). Em contraposição, as doses de $1{,}25x10^3$ e $5x10^3$µg.g^{-1} não apresentaram diferenças estatísticas significantes (Figura 43). As doses de extrato contendo antx-a(s) de $2{,}5x10^2$ e $8x10^3$ µg.g^{-1} provocaram uma leve diminuição da freqüência cardíaca com relação ao controle, porém também não foi significante.

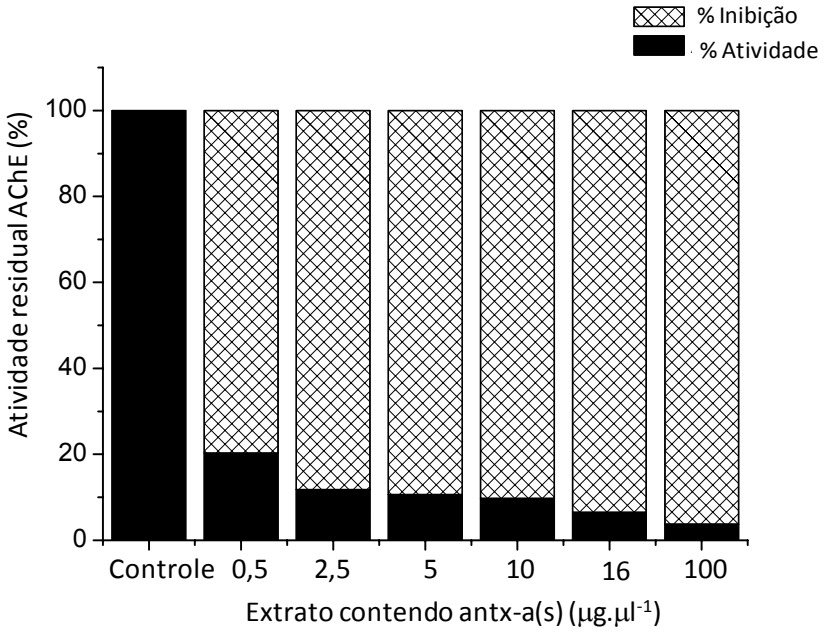


Figura 42. Avaliação da atividade residual e porcentagem de inibição da AChE após incubação com as soluções de extrato contendo anatoxina-a(s) utilizadas na preparação do CSIB.

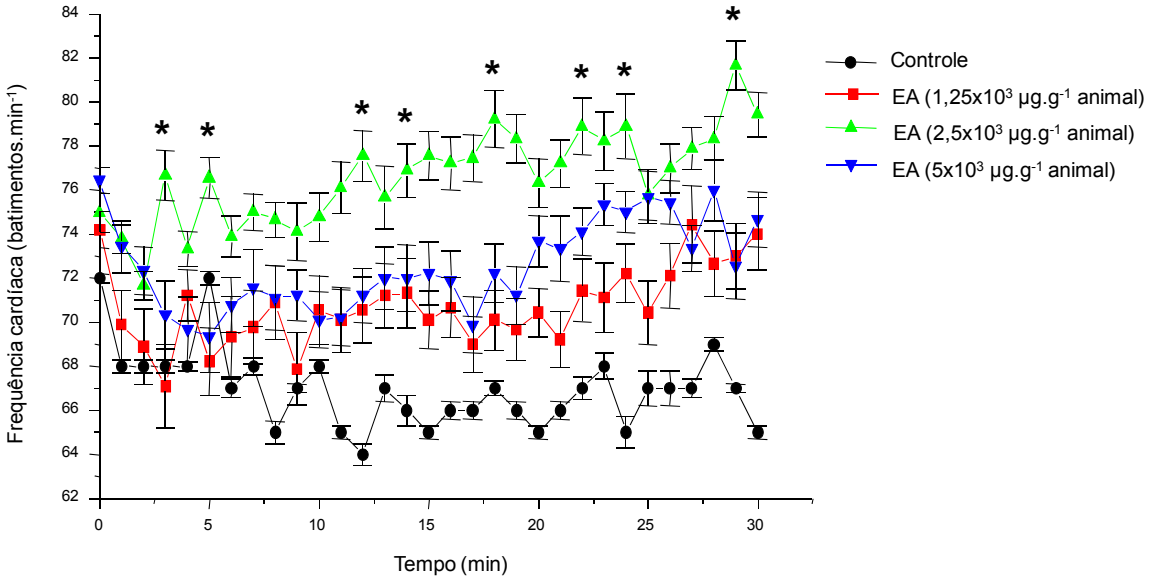


Figura 43. Efeito de diferentes doses de extrato contendo anatoxina-a(s) (EA) na frequência cardíaca de baratas *Leurolestes circunvagans* ao longo de 30 min. Cada ponto representa a média ± epm (n=9). *p<0,05; ANOVA/MANOVA.

6. DISCUSSÃO

A antx-a(s) é uma das cianotoxinas de prioridade média a alta a ser listada no programa de monitoramento de contaminantes não regulamentados em água para consumo humano (*Monitoring Unregulated Contaminants in Drinking Water,* UCMR) da EPA (HUDNELL, 2010). A inexistência de padrão analítico comercial de antx-a(s), bem como, a sua instabilidade em meio alcalino tem provocado escassez de informações toxicológicas sobre outros efeitos deletéreos causados por essa toxina, além do efeito anticolinesterásico já descrito em mamíferos. Nesse sentido, este trabalho pretende elucidar duas questões. A primeira delas foi o de avaliar se extratos contendo antx-a(s) seriam capazes de promover alterações no equilíbrio do sistema enzimático antioxidante e, em segundo lugar avaliar se esses extratos podem exercer efeito cardiotóxico em baratas.

Para o desenvolvimento desta tese, a primeira etapa foi relacionada ao cultivo de três linhagens produtoras de antx-a(s) em condições de laboratório. A taxa de crescimento das cianobactérias pode ser avaliada pela da contagem direta das células/filamentos ou por monitoramento da produção de clorofila, proteínas, fluorescência e absorção de luz (REYNOLDS, 2006). Apesar das técnicas espectroscópicas serem consideradas convenientes, elas são mais susceptíveis a perdas de informação relacionadas à espécie em estudo e, não substituem a contagem direta de células (REYNOLDS, 2006).

As fases de crescimento de cianobactérias são lag ou latente, exponencial ou logarítmica, estacionária e de declínio ou morte. A fase lag representa o período de adaptação das células inoculadas no meio de cultura, após terem sofrido uma mudança de ambiente. A fase exponencial é o período de divisão máxima e, a fase estacionária se caracteriza pela escassez de nutrientes com diminuição considerável de divisão celular (REYNOLDS, 2006).

Neste trabalho a fase lag de crescimento da linhagem estudada (ITEP26) não foi observada. Isto foi provavelmente em função das células terem sido cultivadas para avaliação do crescimento nas mesmas condições em que eram mantidas anteriormente estando, portanto, adaptadas a essas condições. Como apresentado

no item 5.1 dos resultados (Figura 18), a fase exponencial de crescimento da linhagem *A. spiroides* ITEP26 foi de 21 dias. Baseado neste resultado, o vigésimo dia de cultura foi estabelecido para troca de meio e concentração celular das três linhagens (ITEP 24, 25 e 26) utilizadas neste trabalho.

Com relação à taxa de crescimento, as cianobactérias apresentam uma taxa muito menor quando comparada ao de muitas espécies de bactérias (CHORUS & BARTRAM, 1999). Dentre as cianobactérias, as de morfologia filamentosa crescem a uma velocidade menor, quando comparadas com as cocóides que não possuem mucilagem (taxa de crescimento de 0,78-0,98 e 1,11-1,72 $\mu.dia^{-1}$, para as filamentosas e as cocóides, respectivamente) (REYNOLDS, 2006). A taxa de crescimento específico da cepa *A. spiroides* ITEP26 obtida (0,10 $\mu.dia^{-1}$) apresentou-se reduzida quando comparada à taxa descrita na literatura, para o gênero *Anabaena* (0,78 $\mu.dia^{-1}$) (REYNOLDS, 2006). Isto pode estar relacionado às diferenças nas condições de cultivo e pelo fato de se ter contado filamentos ao invés de estimar o número de células por mililitro de cultura. Vale salientar que foram adotadas as condições de crescimento do laboratório do Prof. Molica.

Uma vez determinado o período de coleta das células (20 dias), iniciou-se a obtenção da biomassa necessária para os posteriores experimentos. A massa de material liofilizado obtido das culturas em erlenmyer de 2 l ao longo destes quatro anos foi 3 g por linhagem. Trabalhos como o de MAHMOOD & CARMICHAEL (1986 e 1987) e HENRIKSEN *et al.* (1997) relatam ter partido de 200 l de meio de cultura e 10 g de cultura liofilizada, respectivamente, para os testes toxicológicos com antx-a(s). Sendo assim, a primeira limitação ao longo deste trabalho foi a obtenção de biomassa suficiente para os experimentos toxicológicos. Nesse sentido, duas tentativas de cultivo numa escala maior foram realizadas, uma em aquário e outra em garrafas de 10 e 20 l (Pirex®), supridas de ar filtrado. Porém, nenhuma foi bem sucedida devido à contaminação da cultura e à dificuldade de concentração do material. Portanto, as linhagens foram mantidas em erlenmeyer de 2 l e repicadas a cada 20 dias.

Seguidamente, foram realizados testes para o desenvolvimento de um método analítico por LC-MS para identificação de antx-a(s) nos extratos das

linhagens cultivadas. Como descrito no item 5.3 dos resultados, inicialmente realizou-se a infusão direta dos extratos de *A. spiroides* no espectrômetro de massas. Uma vez identificado o íon *m/z*=253, que corresponderia à molécula de antx-a(s) protonada $[M+H]^+$, este foi isolado no analisador do tipo *ion trap* do equipamento. Posteriormente, foram avaliados os íons mais representativos do espectro MS^2 referente ao íon *m/z*=253. Essa análise foi realizada em parceria com o doutorando Felipe Dörr com o intuito de verificar quais íons eram provenientes da molécula de antx-a(s). Com os dados obtidos dos experimentos de extração e a análise do padrão de fragmentação, um artigo científico foi publicado pelo grupo sugerindo as transições de íons 253>159, 253>141, 253>98 e 253>58 para a correta identificação de antx-a(s) (DÖRR, F. *et al.*, 2010, ANEXO III). Cabe salientar que, dentre os íons considerados para caracterização da molécula de antx-a(s) o íon *m/z* 159 é o único que já havia sido descrito na literatura. MATSUNAGA *et al*. (1989) mencionam o íon *m/z* 159 como produto de degradação de antx-a(s), após perda do grupamento fosfato. Dessa maneira, as transições descritas acima foram adotadas para caracterização da antx-a(s) nas análises posteriores. O próximo passo deste trabalho foi então padronizar uma metodologia para purificação da antx-a(s).

O protocolo de purificação da antx-a(s), proposto por MAHMOOD & CARMICHAEL (1986), além de usar uma grande quantidade de material de partida, envolve muitas etapas. Em outro artigo, estes autores apresentaram os cromatogramas obtidos a partir da análise por HPLC-UV da toxina purificada detectada em 230 nm (MAHMOOD *et al.*, 1988). Destaca-se a pouca interação da toxina com a coluna cromatográfica cianopropil utilizada por esses autores (t_{ret} de antx-a(s) < 5 min), além de terem usado um comprimento de onda inespecífico (230 nm). O uso do detector UV na determinação de neurotoxinas da mesma família da antx-a(s) tem sido criticado. JAMES *et al.* (1998) contestam o fato de muitos interferentes absorverem na mesma região do UV que o grupo das anatoxinas (λ=220-230 nm), além da baixa sensibilidade em função da ausência de grupos cromóforos. Mesmo assim, o método descrito por MAHMOOD & CARMICHAEL (1986) é um dos mais citados na literatura para identificação e quantificação de antx-a(s).

Nesse sentido, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma ferramenta analítica conceituada, por ser considerada confiável, confirmatória e muito indicada para detecção de compostos polares sem grupos cromóforos. Após confirmação da presença de antx-a(s) nos extratos por infusão direta no MS, foram iniciados os testes de identificação dessa toxina no sistema LC-MS integrado para obtenção de cromatogramas de melhor resolução. Em função de suas características, a primeira coluna cromatográfica avaliada foi a Synergy Polar RP. De acordo com as informações do fabricante, a fase éter-fenílica desta coluna está especialmente desenhada para maximizar a retenção e seletividade de analitos polares. Agregando-se a isto, esta coluna apresenta a vantagem de ser muito resistente à hidrólise em meio ácido (suporta pH até 1,5). Porém, como mostrado na figura 20, a antx-a(s) foi pouco retida na primeira condição testada (t_{ret}=2,9 min). Após a mudança do solvente da fase móvel B para acetonitrila, a interação do analito com a coluna aumentou (t_{ret}=6 min), mas o pico de antx-a(s) não apresentou um perfil cromatográfico satisfatório. Das duas condições estudadas para acidificação dos extratos (ácido acético e ácido fórmico) não houve diferença na detecção da antx-a(s) por LC-MS. Dessa maneira, visto que MATSUNAGA *et al.* (1989) utilizaram ácido acético para extração de antx-a(s), a acidificação do extrato contendo antx-a(s) com esse ácido 0,1M (pH = 3-5) foi mantida nas posteriores análises.

O passo seguinte foi o de melhorar o perfil cromatográfico da antx-a(s), bem como, obter uma fração enriquecida da cianotoxina com o mínimo de interferentes possíveis. Dessa maneira foram realizados testes de "*clean up*" da amostra utilizando dois diferentes cartuchos de SPE (individual e sequencialmente) e dois tipos de colunas cromatográficas. O cartucho de SPE Sep Pack C18 foi testado com o intuito de eliminar os interferentes menos polares do que antx-a(s) presentes no extrato bruto. Já era esperado que a antx-a(s) interagisse pouco com a fase C18 do cartucho, pois o LogP calculado (via software ChemOffice) para esse toxina, em meio ácido, foi de -1,09. O uso deste cartucho com o mesmo fim já foi descrito por MAHMOOD & CARMICHAEL (1986). Durante o preparo do extrato, foi possível visualizar que, efetivamente o cartucho Sep Pack C18 foi capaz de reter pigmentos,

permitindo obter um extrato com menos interferentes. A intensidade no espectro de massas do pico referente à antx-a(s) foi superior na fração correspondente à passagem do extrato pelo cartucho pré-condicionado. Por outro lado, na análise das frações de lavagem do cartucho Sep Pack® C18, sinais praticamente desprezíveis correspondendo a antx-a(s), foram fracamente detectadas no MS. Essas análises confirmaram que, de acordo com o esperado, praticamente não existiu interação da toxina com a cadeia alquílica do sorvente do cartucho Sep Pack® C18, evitando perdas significativas de antx-a(s) durante o "*clean up"* da amostra.

Paralelamente, para enriquecer o extrato após "*clean up"* da amostra o cartucho de SPE Sep Pack® sílica também foi avaliado. Teoricamente, a alta polaridade do sorvente deste cartucho favoreceria a sua interação com antx-a(s), principalmente pela formação de ligações de hidrogênio, o que permitiria obter um extrato rico em toxina. Contudo, nenhum resultado com esse cartucho foi satisfatório. A toxina foi encontrada em todas as frações preparadas usando o cartucho Sep Pack® sílica, indicando que a antx-a(s) também não ficou retida, neste tipo de cartucho. A partir dos resultados obtidos, definiu-se a utilização somente do cartucho Sep Pack® C18 para purificação de antx-a(s).

Com relação aos testes com a coluna cromatográfica Luna Silica®, como mostrado na figura 21 (B), apesar da melhor retenção da antx-a(s) nesta coluna (t_{ret}~12 min) do que na coluna Synergy polar (t_{ret}~6min) , o pico referente à toxina ainda mostrou-se alongado (com cauda). A presença de cauda num pico cromatográfico não é aconselhável, pois é um indicativo de co-eluição de outros componentes podendo acarretar superestimação da concentração do analito de interesse. De fato, no espectro de massas um interferente de *m/z* 244 co-eluiu com antx-a(s), provocando supressão de sinal do íon *m/z* 253. Por esses motivos, esta coluna foi descartada.

O comportamento cromatográfico da antx-a(s) na coluna ZIC®-HILIC também foi testado. Esta coluna além de amenizar empecilhos como baixa sensibilidade e incompatibilidade com MS é capaz de reter compostos hidrofílicos neutros ou com carga. Ela também permite utilizar uma quantidade maior de solvente orgânico, o que pode facilitar a ionização via *electrospray* (ESI). A sua fase estacionária possui

grupos funcionais dipolares (do tipo "*zwittreonic*") os quais são mantidos sem carga, independente da fase móvel e do pH utilizado. A versatilidade desta coluna cromatográfica permite a separação de cátions, ânions ou zwitterions (do alemão *zwitter*= híbrido, composto químico eletricamente neutro que possui cargas opostas). Neste caso, a interação coluna-analito é resultado de uma mistura de mecanismos que combina a interação eletrostática e hidrofílica entre o analito e a fase estacionária dipolar. As vantagens do uso desta coluna na detecção de antx-a(s) somada à boa interação com essa toxina foram consideradas satisfatórias. Após pequenos ajustes no gradiente das fases móveis, obteve-se um pico de antx-a(s) de boa resolução com um bom tempo de retenção (t_{ret}~9 min) (Figura 22). Dentre os parâmetros considerados para escolha da coluna cromatográfica está o fator de alargamento (T_f="*tailing factor*") que diz respeito a simetria do pico de interesse. O fator de alargamento 5% calculado do pico correspondente à massa da antx-a(s) para cada uma das três colunas testadas neste trabalho (Synergy Polar RP, Luna Silica® e ZIC®-HILIC) foi 1,16; 1,0 e 1,04, respectivamente. Embora a coluna Luna Silica® tenha apresentado um valor mais próximo do ideal (T_f=1,0), a coluna ZIC®-HILIC apresentou uma melhor resolução dos picos adjacentes e retenção adequada. Desta maneira, o protocolo de preparo de amostra, assim como as condições cromatográficas descritas no item 4.4.2.1.5, foram mantidas em todos os ensaios posteriores.

Em paralelo aos testes analíticos, foi avaliada a atividade biológica do extrato preparado a partir das linhagens cultivadas e da antx-a(s) purificada por LC-MS. Em contraposição ao esperado, o animal tratado com a toxina purificada por LC-MS não apresentou sinal clínico (ver a tabela 4), enquanto que o animal tratado com extrato pré-purificado apresentou sinais clínicos intensos, indo a óbito em menos de 15 min. Este fenômeno pode estar relacionado à degradação de antx-a(s) durante o armazenamento, mesmo quando mantida a -80 ºC. Apesar do pico coletado da antx-a(s) ter permanecido no freezer menos de três meses, a molécula foi hidrolisada e perdeu sua atividade. Alguns trabalhos relatam a perda de atividade biológica da toxina após 6 meses de armazenamento a -20 ºC seguido de duas semanas sem refrigeração e, após quatro meses a -20 ºC (HENRIKSEN *et al.*, 1997; BARROS *et*

al., 2004). Da mesma forma, não se pode decartar a hipótese de que, a presença de outros componentes no extrato possa exercer atividade biológica, facilitando ou até aumentando o efeito da antx-a(s). COOK *et al*. (1988) relataram que alguns dos sinais clínicos observados em camundongos tratados com extrato purificado de antx-a(s) poderiam ser provindos de impurezas presentes no extrato. Posteriormente, esses mesmos autores asseguraram ter comprovado a inocuidade dessas impurezas, porém esses resultados não foram apresentados (COOK, W.O. *et al.*, 1989b). Por outro lado, é importante destacar que em termos de saúde pública num cenário real, a exposição da população em geral às cianotoxinas purificadas é muito difícil, sendo muito mais relevantes estudos com extratos e/ou frações de toxinas. Vale ressaltar que até momento não foi reportado na literatura nenhuma variante de antx-a(s) ou outros compostos com ação anticolinesterásica em cianobactérias.

Considerando a instabilidade da antx-a(s), alguns cuidados foram adotados para garantir a mínima degradação da molécula. Foram utilizados extratos frescos em todos os bioensaios e evitou-se o armazenamento das soluções por períodos prolongados (mais de uma semana). Além disso, houve monitoramento constante por LC-MS para verificar possível degradação.

A pouca biomassa somada a impossibilidade de quantificar o conteúdo de antx-a(s) no extrato e, a instabilidade da molécula, levou à procura de um organofosforado comercial que pudesse ser usado como parâmetro de controle positivo do efeito anticolinesterásico e pró-oxidante nos testes toxicológicos e bioquímicos. Para isso, iniciaram-se testes de toxicidade aguda via i.p. com dois organofosforados, malation e triclorfon, com o intuito de observar os sinais clínicos próprios da síndrome colinérgica. Devido à ampla diversidade dos organofosforados existentes no mercado com relação às características físico-químicas, principalmente em termos de solubilidade e estabilidade, adotou-se as informações toxicológicas relacionadas à indução de EO para escolha do organofosforado controle.

O malation é um inseticida organofosforado de amplo espectro de ação muito utilizado na agricultura em cultivos de alimentos, plantas ornamentais, pasto e pastagens (EPA, 2010a). Este inseticida requer conversão metabólica, ou seja,

substituição do enxofre da molécula por um átomo de oxigênio para exercer atividade anticolinesterásica. A EPA considera que este inseticida apresenta toxicidade aguda baixa a moderada pelas vias oral, dérmica e inalatória (EPA, 2010a). Embora o malation seja um inseticida muito estudado, chama atenção a ampla faixa da DL_{50} via oral em roedores descrita na literatura (190-6000 $mg.kg^{-1}$). Essa variação pode ser justificada tanto pela diferença de suscetibilidade entre roedores, quanto pelo solvente utilizado para solubilizar o malation. Por suas caraterísticas físico-químicas, o malation é altamente lipofílico ($ClogP_{malation}$ = 2,47), com baixa solubilidade em água (145 $mg.l^{-1}$ a 20 ºC) e altamente solúvel em solventes orgânicos (HSDB, 2010a). A literatura é confusa com relação à dose de malation capaz de provocar sinais clínicos em roedores. Trabalhos como os de AKHGARI *et al*. (2003) e ABDOLLAHI *et al.* (2004) relataram ausência de sinais clínicos em ratos *Wistar*, tratados com malation nas doses de 100-1500 $mg.kg^{-1}$. Já, POSSAMAI *et al.* (2007) relataram sinais colinérgicos também em ratos, após administração de 700 $mg.kg^{-1}$. As diferenças de resposta provavelmente estariam relacionadas à linhagem de rato, susceptibilidade individual, idade dos roedores e/ou ao diluente do malation, visto que, enquanto alguns pesquisadores utilizam solução salina, outros utilizam óleo vegetal.

Segundo (KARALLIEDDE *et al.*, 2003) são muitas as variáveis a serem consideradas na exposição aos organofosforados, entre elas estão as características físico-químicas, o tipo de solvente utilizado e as impurezas presentes. De fato, se for considerada somente a característica de solubilidade dos principais inseticidas organofosforados utilizados no Brasil, segundo MÍDIO & SOARES (1995), a diversidade de solventes vai desde água até hidrocarbonetos aromáticos.

Nos resultados obtidos no experimento 5 deste trabalho (item 5.5) nenhum sinal clínico foi observado em camundongos tratados com malation dissolvido em salina e nem em salina contendo 10% de etanol (porcentagem máxima de etanol aceita pela CEEA-FCF-USP, em roedores). Considerando a alta hidrofilicidade da antx-a(s), o veículo de escolha para o tratamento de camundongos com extrato contendo a toxina certamente seria solução salina. Dessa maneira, devido à baixa solubilidade do malation neste solvente este IOF foi descartado como controle.

O segundo organofosforado testado foi o triclorfon (Neguvon®), que é um inseticida de uso não agrícola na maioria dos países (exeto EEUU), utilizado em residências, jardins, plantas e peixes ornamentais e, gramados para a prática de golf (EPA, 2010b). O triclorfon também é utilizado no controle de endo e ectoparasitas em bovinos, ovinos, suínos, cachorros e gatos (INCHEM, 2010). Esse organofosforado possui características físico-químicas mais semelhantes à antx-a(s) do que o malation, como a polaridade ($ClogP_{triclorfon}$= 0,67 e $ClogP_{antx\text{-}a(s)}$=-1,09 em meio ácido), solubilidade em água ($1{,}2x10^5$ $mg.l^{-1}$ a 25 ºC) e instabilidade em pH alcalino. A DL_{50} do triclorfon em camundongos via oral é 300 $mg.kg^{-1}$. Com relação à toxicocinética, a absorção, distribuição e excreção do triclorfon em mamíferos são rápidas, com meia-vida plasmática de 80 min em camundongos e aproximadamente 2 h em humanos (HSDB, 2010b). O triclorfon é rapidamente absorvido pelas vias oral, dérmica e inalatória e, a principal via de excreção é a urinária. Um dos seus metabólitos ativos formado em condições fisiológicas é o diclorvos (HSDB, 2010b).

A sintomatologia específica após exposição a IOF pode variar dependendo da espécie animal, dose, via de exposição e o inseticida testado (CHAMBERS, 1992). A inibição das colinesterases causada pelos IOF provoca o acúmulo do neurotransmisor acetilcolina nas sinapses colinérgicas e junções neuromusculares. O resultado desse acúmulo é a hiper-excitabilidade dessas junções, levando a múltiplos impulsos pós-sinápticos. A hiper-estimulação do sistema que controla a musculatura esquelética se manifesta na musculatura com contrações, tremores, convulsões tônicas e/ou tônico-clônicas e paralisia. Dependendo dos efeitos relativos ao sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, os IOF podem produzir taquicardia, bradicardia, fibrilação ou parada cardíaca. A soma de todas essas ações ocasiona os sinais clínicos de intoxicação com organofosforados. Dentre esses sinais clínicos estão diarréia, sialorréia, rinorréia, visão turva, contrações musculares, dificuldade respiratória, convulsões, paralisia respiratória e morte (CHAMBERS, 1992).

A toxicidade aguda do triclorfon foi avaliada pela observação de alguns sinais clínicos em camundongos tratados via oral com doses decrescentes deste organofosforado. Como apresentado na tabela 5, os sinais colinérgicos observados

em camundongos tratados com triclorfon foram dose-dependentes até a dose de 150 $mg.kg^{-1}$. Apesar da intensidade dos sinais clínicos apresentados pelos animais tratados com a dose mais alta de triclorfon (2000 $mg.kg^{-1}$), não foi observada morte. Considerando as propriedades físico-químicas, toxicológicas e a existência de um relato sobre a sua capacidade de induzir EO *in vitro* (KARADEMIR *et al.*, 2007), o triclorfon foi escolhido como organofosforado controle de indução de EO.

Seguidamente foram realizados testes com triclorfon e com extrato de antx-a(s) para definição da via de administração. Também foi necessária a escolha de uma dose que permitisse manter os animais vivos por no mínimo 14 dias após o tratamento. Para isso, extratos contendo antx-a(s) foram administrados em camundongos via i.p. e por *gavage*. Como apresentado na tabela 6, os animais tratados com extrato contendo antx-a(s) via i.p., apresentaram sinais colinérgicos muito mais intensos do que os animais tratados com triclorfon (ver tabela 5), além de terem ido a óbito em um tempo inferior a 5 min.

A ausência de sinais clínicos no animal tratado por *gavage* pode ser explicada pela elevada polaridade da antx-a(s), fato que impediria sua absorção por esta via e/ou possível degradação da toxina no trato gastrointestinal. Segundo COOK *et al.* (1989b) a antx-a(s) é bem absorvida na cavidade peritoneal, sendo capaz de alcançar a corrente sanguínea, inibir as colinesterases ali presentes, induzir ao aparecimento de sinais clínicos e provocar a morte. COOK *et al.* (1989a) também observaram que camundongos tratados diariamente por via oral com extrato bruto contendo antx-a(s) (22 $ml.kg^{-1}$) não apresentaram sinal clínico após 5 dias. Neste mesmo estudo, os autores relataram que patos tratados via oral com a mesma dose de extrato de antx-a(s) utilizada em camundongos, apresentaram sinais clínicos como sialorréia, diarréia, tremores e ataxia após o segundo dia de tratamento. A diferença de suscetibilidade entre mamíferos e aves é explicada pela maior atividade em mamíferos das enzimas esterases-A, as quais exercem um efeito protetor contra inseticidas organofosforados e carbamatos. Por outro lado, sabe-se que em aves, essas enzimas são menos expressas, o que deixa estes organismos mais suscetíveis ao efeito dos inseticidas inibidores de colinesterases (WALKER & THOMPSON, 1991).

Na avaliação das colinesterases sanguíneas, contrario ao esperado, a atividade das enzimas BuChE e AChE no animal tratado por *gavage* com extrato contendo antx-a(s) mostrou-se inibida mais de 80% e 50%, respectivamente, com relação ao controle (Tabela 6). Estes resultados sugerem que a ausência de sinais colinérgicos não está diretamente relacionada com a atividade normal das colinesterases sanguíneas. A exposição à toxina por via oral permitiria a obtenção de um cenário mais próximo à realidade, porém, a quantidade de toxina necessária para utilizar esta via de administração foi o principal fator limitante. Segundo ROZMAN & KLAASSEN (2001) a administração de um agente tóxico via i.p. em animais de experimentação resulta na rápida absorção do agente devido à boa irrigação e a extensa superfície da cavidade peritoneal. Dentre as vantagens do uso desta via está o fato dela ser capaz de contornar variáveis como o atraso e o esvaziamento gástrico, além de ser uma via comumente utilizada em testes toxicológicos. Sendo assim, optou-se por utilizar a via i.p. para os posteriores bioensaios em camundongos.

O passo seguinte foi escolher a dose de extrato de antx-a(s) e triclorfon a ser utilizada nos tratamentos para avaliação do EO. Adotou-se o critério de escolha da dose que não apresentasse sinal clínico observável e nem morte, porém que inibisse a atividade da enzima AChE. Embora a função fisiológica da BuChE ainda seja desconhecida, a determinação da atividade desse enzima foi considerada relevante, por fazer parte da avaliação do quadro de intoxicação por organofosforados.

Desse modo, doses decrescentes de triclorfon e extrato contendo antx-a(s) foram administradas via i.p. em nove grupos de dois camundongos. Considerando os resultados obtidos anteriormente em animais tratados com triclorfon por via oral, partimos do pressuposto que doses acima de 150 $mg.kg^{-1}$ por via i.p. provocariam sinais clínicos observáveis. De fato, como pode ser visto na tabela 7 nenhum sinal clínico foi observado em animais tratados pela via i.p. com doses inferiores a 150 $mg.kg^{-1}$ de triclorfon. Os sinais clínicos apresentados pelo grupo de animais tratados com 150 $mg.kg^{-1}$ de triclorfon foram moderados, quando comparados com os sinais apresentados pelos animais tratados com 40 $mg.kg^{-1}$ de extrato contendo antx-a(s). Dentre os sinais clínicos apresentados pelos animais tratados com extrato contendo

antx-a(s) na faixa de 1000-40 $mg.kg^{-1}$, destacaram-se as intensas contrações musculares involuntárias (tetania) pela forte contração da musculatura esquelética. Este tipo de contração é típico da hiperestimulação do sistema nervoso somático (CHAMBERS, 1992). Vale lembrar novamente que a intensidade dos sinais observados nos animais tratados com extrato contendo antx-a(s) pode estar relacionada a outros componentes não identificados do extrato.

Nos testes de toxicidade aguda realizados por CHAN *et al.* (1992), efeitos muscarínicos e nicotínicos foram observados quando roedores machos (camundongos *Swiss* e ratos *Sprague-Dawley*) foram tratados via i.p. com extrato purificado contendo antx-a(s) da cepa *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. Estes efeitos são condizentes com a excessiva estimulação colinérgica, bem como, com o quadro clínico observado quando animais são tratados com agentes anticolinesterásicos (CHAN *et al.*, 1992). Desde os primeiros relatos literários, houve interesse em verificar quais seriam os efeitos colinérgicos (muscarínicos ou nicotínicos) mais predominantes na síndrome letal apresentada no quadro de intoxicação aguda por antx-a(s). Neste contexto, com o objetivo de avaliar se o quadro de intoxicação aguda tinha sido resultado da atividade muscarínica, MAHMOOD & CARMICHAEL (1986) trataram camundongos com sulfato de atropina e, logo em seguida, com antx-a(s) via i.p. Os autores observaram que apenas os sinais parassimpáticos foram eliminados, além do tempo de sobrevida ter aumentado em aproximadamente 2 min. Logo após este período, os autores relatam que os animais morreram com sinais de fasciculação, convulsão e parada respiratória. Posteriormente, COOK *et al.* (1990) avaliaram os efeitos nos sistemas cardiovascular e respiratório em um grupo de ratos tratados com antx-a(s) e outro grupo com atropina seguida da antx-a(s), ambos via intravenosa. Os resultados revelaram uma forte diminuição na pressão sanguínea, nas frequências cardíaca e respiratória dos animais tratados somente com antx-a(s). Contudo, estes efeitos foram estabilizados quando os animais foram tratados com atropina e antx-a(s), sequencialmente. Quando grupos de animais foram tratados com antx-a(s) via intravenosa e, submetidos à ventilação artificial concomitante, eles sobreviveram a doses quatro vezes superiores à DL_{50}, mesmo apresentando quedas abruptas na

pressão sanguínea e frequência cardíaca. Com isso, os autores sugeriram que os efeitos da antx-a(s) no sistema cardiovascular ou outros sistemas (sistema pulmonar, por exemplo) não seriam letais. Todavia, acreditou-se que os principais mecanismos que poderiam ocasionar morte estariam relacionados à paralisia do diafragma (observada na síndrome letal provocada por antx-a(s) *in vivo*), paralisia dos músculos respiratórios e, às mudanças no eletromiograma do nervo frênico. Contudo, o mecanismo predominante na síndrome letal produzida pela antx-a(s) ainda não está bem definido.

COOK *et al.* (1990) e MAHMOOD & CARMICHAEL (1986) defenderam a hipótese de que o mecanismo que teria maior importância toxicológica na síndrome letal seria via efeito nicotínico. Posteriormente, COOK *et al*. (1991) sugeriram outra hipótese, de que a morte seria via efeito muscarínico. No presente estudo, a partir da observação dos sinais clínicos (tremores e tetania) nos animais que foram a óbito, constatou-se que a paralisia dos músculos respiratórios via efeito nicotínico teria provocado a morte.

Vale salientar que o tempo de sobrevida dos animais tratados com diferentes concentrações de extrato contendo antx-a(s) não seguiu um padrão linear dose-resposta, ou seja, variou entre 2 a 10 min (Tabela 7). Porém os animais tratados com 40 $mg.kg^{-1}$ desse mesmo extrato vieram a óbito 4 min antes que os animais tratados com uma dose maior (100 $mg.kg^{-1}$). Mesmo assim, o tempo de sobrevida obtido foi praticamente o mesmo que o descrito por MOLICA *et al.* (2005) (3-12 min), utilizando as mesmas linhagens aqui testadas. Da mesma forma, estes dados também são compatíveis aos obtidos por MAHMOOD & CARMICHAEL (1987), que relataram estas observações entre 5 a 11 min.

Adicionalmente como pode ser visto na tabela 7, a sialorréia, um dos sinais clínicos característico da intoxicação com organofosforados, foi observada em dois dos três grupos de camundongos tratados com extrato contendo antx-a(s) (40 e 100 $mg.kg^{-1}$). A dificuldade na visualização deste sinal em bioensaios com roedores também foi evidenciado por HENRIKSEN *et al*. (1997) e MOLICA *et al.* (2005). A teoria que estes autores sustentam é a de que doses elevadas de antx-a(s) podem mascarar os sinais clínicos característicos, e somente doses próximas à DL_{50}

permitiriam a visualização desses efeitos. Seguindo este raciocínio, apesar de não ter sido estabelecida uma DL_{50} experimental para o nosso extrato, os resultados obtidos no experimento 7 (escolha da dose sub-letal) sugerem que ela estaria entre 20 a 40 $mg.kg^{-1}$.

Conforme esperado, com relação à atividade das colinesterases sanguíneas do experimento 7, a atividade da AChE aumentou gradativamente a medida que as doses de extrato da antx-a(s) e triclorfon foram diminuindo. Destaca-se a diminuição da atividade das enzimas AChE e BuChE na faixa de concentração entre 40 a 1000 $mg.kg^{-1}$ de extrato da antx-a(s) (Tabela 7). Este resultado está de acordo com os resultados mostrados por MAHMOOD & CARMICHAEL (1987) que trataram grupos de ratos com 4 doses de toxina pura (0,1; 0,25; 0,5 e 1 $mg.kg^{-1}$). Neste trabalho, doses acima de 0,5 $mg.kg^{-1}$ produziram sinais clínicos nos animais e, a atividade da AChE foi completamente inibida. Por outro lado, neste mesmo trabalho, os animais tratados com as doses de 0,1 e 0,25 $mg.kg^{-1}$, além de não apresentarem sinais clínicos, a atividade da AChE foi de 96 e 18 % com relação ao controle, respectivamente. A justificativa para este fato estaria relacionada à intensa interação da antx-a(s) com o sítio catalítico da AChE. No presente trabalho, esta intensa interação seria a partir de 40 mg de extrato contendo antx-a(s).kg^{-1}. O fato dos animais tratados com doses iguais ou superiores a 40 $mg.kg^{-1}$ terem ido a óbito em menos de 15 min, deve estar relacionado com a impossibilidade de reposição enzimática. Com esses resultados, as doses de extrato da antx-a(s) e triclorfon que foram compatíveis com o critério adotado para escolha da dose (inibição de colinesterases sanguíneas com ausência de sinais clínicos) foram de 20 e 100 $mg.kg^{-1}$, respectivamente.

Logo após a definição do IOF, da via de administração e da dose, iniciaram-se os experimentos para avaliação do estresse oxidativo em camundongos. Os tempos para avaliação da atividade das enzimas colinesterásicas e antioxidantes (24 h, 48 h, 7 e 14 dias) foram estabelecidos seguindo o desenho experimental de COOK *et al*. (1991), com algumas modificações. Para garantir que as soluções utilizadas em cada tratamento fossem as mais semelhantes possíveis, antes de cada tratamento os extratos frescos foram caracterizados por LC-MS e pelo ensaio

da atividade residual da AChE *in vitro*. Na figura 23 é apresentado o perfil cromatográfico da antx-a(s) obtido por LC-MS confirmando a presença dessa toxina nos extratos utilizados em cada tratamento. Logo em seguida, partiu-se para a determinação da atividade biológica da antx-a(s) presente nos extratos utilizando-se o ensaio descrito por INGKANINAN *et al.* (2003). Para avaliação da atividade residual da AChE, dois parâmetros do método descrito por INGKANINAN *et al.* (2003) tiveram que ser modificados. O propósito dessas alterações foi o de estabelecer um período de incubação da enzima com o inibidor que permitisse avaliar o efeito do inibidor e, por outro lado a manutenção da temperatura do meio reacional. Dos três tempos de incubação testados, optou-se por incubar a AChE durante 5 min a 37 °C (Tabela 8).

Para verificar se o método padronizado seria adequado para os ensaios, soluções de diferentes concentrações de triclorfon foram analisadas. Como mostrado na figura 25, mesmo usando doses muito altas de triclorfon (1 $mg.ml^{-1}$) a inibição da AChE pôde ser quantificada.

Uma vez padronizado, este protocolo foi adotado para avaliar o efeito inibitório da AChE *in vitro* dos extratos contendo antx-a(s) e das soluções de triclorfon preparados antes de cada tratamento dos camundongos. A atividade residual da AChE, após incubação da enzima com as soluções usadas nos quatro tratamentos, esteve na faixa entre 20,38 a 35,69 % para o triclorfon e entre 9,24 a 16,18 % para o extrato contendo antx-a(s) (Tabela 9). Esta variação do efeito inibitório sobre a AChE das soluções contendo antx-a(s) e triclorfon foi considerada satisfatória para os objetivos deste trabalho.

Baseados na hipótese de HYDE & CARMICHAEL (1991), que indica que o aduto formado entre antx-a(s) e o sítio ativo da AChE seria praticamente irreversível, decidiu-se aproveitar os animais e investigar possíveis efeitos tardios da toxina. É sabido que além da síndrome colinérgica os ésteres de organofosforados são capazes de produzir outras patologias como a síndrome intermediária e a polineuropatia tardia induzida por organofosforados (OPIDP) (LOTTI, 2002). A síndrome intermediária é caracterizada pelo aparecimento de fraqueza nos músculos respiratórios e na musculatura proximal dos membros, com paralisia após

12 h e até 7 dias da exposição (ALONZO & CORRÊA, 2008). O mecanismo responsável por esta síndrome ainda é desconhecido, porém, existem evidências da diminuição da resposta motora (LOTTI, 2002). A OPIPD é uma complicação tardia de ocorrência rara, cuja incidência pode ser subestimada (ALONZO ALONZO & CORRÊA, 2008). Esta síndrome se caracteriza por ser uma axonopatia simétrica, distal, sensitivo-motora e central-periférica que geralmente afeta os membros. A OPIPD pode aparecer após 1 a 4 semanas de exposição única ao IOF, com doses elevadas ou moderadas e sucessivas. O mecanismo responsável está relacionado com a inibição de outra enzima além da AChE, a esterase neuropática alvo (NTE) (LOTTI & MORETTO, 2005). A NTE é uma hidrolase amplamente distribuída no organismo humano e de roedores, presente no cérebro, medula espinhal, baço, placenta, testículos e linfócitos. A OPIPD inicia-se pela fosforilação e posterior perda da funcionalidade ("envelhecimento") de pelo menos 70% da NTE presente nos nervos periféricos. Por esse motivo, esta enzima é considerada um biomarcador desta patologia (RICHARDSON, 1992).

Considerando-se a carência de trabalhos envolvendo antx-a(s) e testes comportamentais, embora neste trabalho a atividade da NTE não tenha sido quantificada e as doses escolhidas para os tratamentos terem sido isentas de sinais clínicos, optou-se por avaliar as atividades locomotora e comportamental em camundongos.

Existe um grande número de testes comportamentais, os quais podem ser classificados em locomotores, motores, sensoriais, moto-sensoriais, autonômicos e de resposta a reflexo (SEDÝ *et al.*, 2008). Os testes locomotores e motores permitem avaliar o aparato locomotor do animal e analisar a força, coordenação e outras características da musculatura esqueletica. SEDÝ *et al.* (2008) realizaram um levantamento de mais de 500 trabalhos, publicados entre 1995 a 2007, sobre métodos disponíveis para avaliação do comportamento de ratos com dano na medula espinhal. Nessa revisão, são apresentados cerca de quinze testes para avaliação locomotora, os quais vão desde os mais simples até os mais complexos e modernos. O teste do CA é considerado um dos testes mais simples e de baixo custo para o monitoramento de uma diversidade de lesões, além de não precisar de

dispositivos especiais. Sendo assim, este ensaio permite uma medida adequada do comportamento motor e da atividade exploratória de animais (SEDÝ *et al.*, 2008).

O teste CA é bastante utilizado como modelo animal para avaliação de ansiedade, porém essa finalidade ainda é muito questionada (LISTER, 1990). Segundo LISTER (1990) alguns tratamentos podem causar alterações na atividade locomotora por mecanismos que não envolvem necessariamente, a ansiedade dos animais. Este mesmo autor assegura que é muito difícil avaliar o comportamento exploratório independente de outros comportamentos como a locomoção (LISTER, 1990).

Neste trabalho, dos parâmetros avaliados no CA após quatro tempos de exposição, somente a distância e a velocidade na zona periférica da arena mostraram-se significativamente aumentadas nos animais tratados com extrato contendo antx-a(s) após 24 h. A partir desse único resultado estatísticamente significante somente foi possível afirmar que houve uma elevação na atividade motora inespecífica desses animais. Geralmente, duas medidas espaciais são avaliadas no teste do CA: a distância total percorrida (considerada como uma medida da atividade geral) e alguma medida de tendência do animal em evitar o centro da arena (MOREIRA, 2007).

Fundamentados no conhecimento de que, para roedores o centro da arena seria mais ameaçador do que a periferia, alguns pesquisadores sustentam que a tendência de evitar o centro da arena do CA estaria relacionada à ansiedade (GERSHENFELD & PAUL, 1997; CLÉMENT *et al.*, 1997). Porém, a partir do resultado estatisticamente significante obtido neste trabalho, em animais tratados com antx-a(s) após 24 h, não foi possível caracterizar ansiedade. Portanto, ele foi considerado isolado já que não teve relação com os resultados no LCE. O intuito da utilização do teste de CA neste trabalho foi o de avaliar atividade geral e locomotora em animais tratados com extrato de antx-a(s). Neste sentido, não foi observada alteração relevante após diferentes tempos de exposição. Isto pode estar relacionado ao fato de que quanto mais geral e aplicável é um teste, mesmo que seu alcance seja maior, em contraposição, o teste se torna menos preciso e sensível (SEDÝ *et al.*, 2008).

O LCE é um teste amplamente utilizado na triagem de agentes ansiolíticos no modelo de ansiedade em roedores (CALABRESE, 2008). A proporção de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do LCE, expressa como porcentagem do tempo gasto em ambos os braços, é utilizada como indicador de ansiedade. Acredita-se que a relutância dos animais para explorar os braços abertos do labirinto provavelmente deve-se à combinação da aversão dos roedores a espaços abertos e a elevação do labirinto (LISTER, 1990). Neste trabalho não foi obtida nenhuma alteração nos parâmetros avaliados neste teste. Porém, este dado inovador pode ser utilizado como informação complementar do efeito da antx-a(s) em camundongos após exposição aguda ao extrato contendo a toxina.

Contrariando o esperado, não foi observada nenhuma alteração locomotora e/ou comportamental provocada pelo triclorfon nos tempos avaliados. Atualmente, existem relatos da capacidade deste inseticida em provocar OPIPD, tanto em animais como em humanos (LOTTI, 2002). VARONESSI & PADILLA (1992) afirmaram que o uso de camundongos em um modelo experimental para avaliação da OPIPD apresenta a desvantagem da alta variabilidade intra-grupo na atividade da enzima NTE (principal biomarcador dessa síndrome). O modelo mais comumente utilizado para descrição das mudanças patológicas e bioquímicas associadas à OPIPD é em galinhas (VARONESSI & PADILLA, 1992). Como mencionado acima, as avaliações comportamentais utilizadas neste trabalho foram complementares, já que nenhum dos testes utilizados (CA e LCE) é específico para avaliar neurotoxicidade.

Duas propriedades que são de grande relevância na intoxicação com agentes anticolinesterásicos são a capacidade em atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e a duração ou reversibilidade da inibição das colinesterases (TAYLOR, 1985). A incapacidade da antx-a(s) para atravessar a BHE já foi relatada em alguns trabalhos (COOK *et al.*, 1988; COOK, W.O. *et al.*, 1989b; COOK *et al.*, 1991). No entanto, a possibilidade da antx-a(s) atravessar BHE não deve ser completamente descartada, pois os trabalhos citados anteriormente não utilizaram métodos analíticos tão sensíveis quanto os atuais. Neste trabalho foram estudadas somente as colinesterases sanguíneas. A atividade da AChE sofreu inibição significante em

ambos os grupos de animais tratados com triclorfon e extrato da antx-a(s) após 24 h (n=9, $p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente). Como pode ser obervado na figura 34, o efeito anticolinesterásico manteve-se até 48 h no grupo de animais tratado com extrato contendo antx-a(s) (n=9, $p<0,05$). Por outro lado, apesar da atividade da BuChE estar inibida em ~30% nos animais tratados com extrato de antx-a(s) após 24 h e 48 h de tratamento, essa porcentagem não foi estatisticamente significante (ver figura 35). A atividade de ambas as colinesterases estudadas foi completamente recuperada até o sétimo dia. COOK *et al*. (1991) também observaram um comportamento semelhante da AChE sanguínea em camundongos tratados com antx-a(s) isolada. Porém, segundo esses autores, a atividade da AChE eritrocitária manteve-se significativamente inibida (~70%) até o oitavo dia. Esta divergência de resultados pode estar relacionada às doses e as linhagens diferentes utilizadas em ambos os trabalhos. COOK *et al*. (1991) utilizaram uma dose correspondente à DL_{40} (0,29 $mg.kg^{-1}$) da antx-a(s), purificada pelo método de MAHMOOD & CARMICHAEL (1986). Vale ressaltar que a DL_{50} i.p. estabelecida por este mesmo grupo de pesquisa para camundongos Balb/c foi de 31 µg da antx-a(s) purificada.kg^{-1} (COOK *et al.*, 1988).

No presente trabalho, destaca-se a capacidade inibitória da atividade da AChE do extrato contendo antx-a(s) comparado ao do triclorfon. Apesar de ambos compostos inibirem mais de 60% a atividade da AChE até 24 h, somente o extrato contendo antx-a(s) conseguiu manter essa inibição durante 48 h. Com relação à BuChE plasmática de camundongos, COOK *et al.* (1991) mostraram que a atividade dessa enzima foi fortemente inibida pela antx-a(s) até 4 h após exposição via i.p. A rápida recuperação da atividade da BuChE, segundo esses autores, se deve à reposição hepática da mesma, enquanto que a reposição da AChE depende da produção de novos eritrócitos, o que levaria de 20 a 45 dias em camundongos (COOK *et al.*, 1991). Os resultados aqui obtidos confirmam a maior afinidade da antx-a(s) pela enzima AChE do que pela BuChE, estando portanto de acordo com o apresentado por MAHMOOD & CARMICHAEL (1987).

O efeito pró-oxidante do extrato contendo antx-a(s) em camundongos pode ser comprovado pela alteração significativa na atividade das enzimas antioxidantes

avaliadas. Segundo EBADI *et al*. (2007), as enzimas antioxidantes tais como CAT, SOD e complexo de glutationas (total, peroxidase, redutase e transferase) são excelentes marcadores dos efeitos do EO. A SOD e CAT são consideradas a primeira linha de defesa do sistema antioxidante, cujo objetivo é evitar a oxidação de biomoléculas (EL-SHENAWY *et al.*, 2010). No presente estudo, o panorama bioquímico em camundongos mudou progressivamente ao longo dos tratamentos. Inicialmente não houve nenhuma alteração significante na atividade das enzimas antioxidantes determinadas após 24 h do tratamento. Depois de 48h, a atividade da enzima CAT diminuiu somente no grupo de animais tratado com extrato contendo antx-a(s) ($n=9$, $p<0,05$), enquanto que a atividade da GPx declinou tanto no grupos de animais tratados com extrato da antx-a(s) como com triclorfon ($n=9$, $p<0,001$ para ambos os grupos). As alterações enzimáticas foram mais evidentes após 7 dias de tratamento. A atividade da CAT aumentou ($n=10$, $p<0,01$) nos dois grupos de animais tratados, enquanto que a atividade da GR aumentou significativamente somente no grupo tratado com extrato contendo antx-a(s) ($n=10$, $p<0,01$). A atividade da GPx manteve-se fortemente diminuída ($n=10$, $p<0,001$) em ambos os grupos tratados após 7 dias. Todas as enzimas antioxidantes avaliadas retornaram a seus níveis normais até o décimo-quarto dia. A diminuição da atividade da CAT após 48 h pode estar relacionada a um aumento no consumo da mesma, em decorrência do aumento na produção de H_2O_2. Por ser uma enzima que tem um único substrato (o H_2O_2), a CAT conseguiria reverter essa situação rapidamente, como foi observado no sétimo dia. A GPx age sobre peróxidos orgânicos em geral, sendo portanto, mais requisitada no combate dessas espécies reativas de oxigênio e, consequentemente sua reposição seria mais lenta, justificando a acentuada diminuição de sua atividade até o sétimo dia. Como mostrado na figura 15 as enzimas GPx e GR fazem parte de um ciclo que permite a reciclagem da GSH. De acordo com os resultados obtidos a alteração desse ciclo se fez evidente após 7 dias de tratamento com extrato contendo antx-a(s). O aumento estatísticamente significante na atividade da GR e a diminuição na atividade da GPx ($n=10$, $p<0,01$, $p<0,001$, respectivamente) sugerem que, apesar da capacidade da GPx ter sido ultrapassada, a reciclagem da GSH é mantida em decorrência da elevação da atividade da GR. A partir desse mecanismo

compensatório, o sistema de defesa antioxidante recuperaria o equilíbrio até o décimo quarto dia. A atividade da CuZnSOD não apresentou diferença significante em nenhum dos tratamentos.

Correlacionando os resultados de ambas as enzimas, antioxidantes e colinesterásicas, obtidos neste trabalho, pode-se constatar que além do efeito agudo de inibição das colinesterases, uma única dose sub-letal do extrato da antx-a(s) foi capaz de promover um desequilíbrio no sistema enzimático antioxidante. De fato, o primeiro efeito da antx-a(s) observado foi a inibição das colinesterases (24 h). Porém à medida que a atividade dessas enzimas estava retornando a níveis normais (48 h), a atividade das enzimas antioxidantes começou a sofrer alteração. Após 7 dias do tratamento, a atividade das colinesterases foi completamente recuperada. Todavia, o desequilíbrio na atividade de enzimas antioxidantes se manteve, voltando aos níveis normais no décimo-quarto dia. SHADNIA *et al.* (2005) comprovaram que, em intoxicações agudas por IOF, à medida que a atividade da enzima AChE diminuía, a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx aumentava. A obtenção de uma equivalência total entre os resultados que envolvem respostas biológicas, como por exemplo, a atividade enzimática frente a diferentes agentes, é complexa. Mesmo assim é possível correlacionar o desequilíbrio induzido pelo extrato contendo antx-a(s) com este mesmo efeito provocado por outros organofosforados.

A capacidade do extrato da antx-a(s) em promover EO foi comparável com o IOF promotor do EO escolhido, o triclorfon. A capacidade desse IOF em promover alterações no sistema enzimático antioxidante *in vitro* já foi relatada (KARADEMIR *et al.*, 2007) e, serviu como base de comparação do efeito do extrato da antx-a(s). Em quase todos os tratamentos, os animais que receberam triclorfon mostraram um perfil bioquímico muito semelhante ao apresentado pelos animais tratados com extrato da antx-a(s). As diferenças entre as atividades enzimáticas produzidas pelo triclorfon e o extrato da antx-a(s) foram pequenas. Uma dessas diferenças foi observada após 48 h, quando a atividade das colinesterases e da CAT mostraram-se mais inibidas com o extrato da antx-a(s) do que com o triclorfon. Outra diferença ocorreu após 7 dias, quando a atividade da enzima GR mostrou-se aumentada somente nos grupo de animais tratados com extrato da antx-a(s). Os resultados

obtidos com triclorfon estão de acordo com o trabalho publicado por KARADEMIR *et al.* (2007), onde após incubação *in vitro* de eritrócitos humanos com este composto, observou-se diminuição na atividade da enzima GPx e aumento na atividade das enzimas CAT e SOD, além do aumento na concentração de malonaldeído (um dos produtos finais de lipoperoxidação). Esses autores concluíram que o triclorfon induziria mudanças no sistema antioxidante e lipoperoxidação de eritrócitos. A partir disso, foi proposto que as ROS poderiam estar envolvidas nos efeitos tóxicos causados pelo triclorfon.

A capacidade pró-oxidante de extrato contendo antx-a(s) também pôde ser comprovada em outro modelo experimental, ou seja, em sementes de alfafa. Conforme mencionado nos itens anteriores, esta parte do trabalho foi desenvolvida no laboratório do Prof. Dr. Stephan Pflugmacher na cidade de Berlim-Alemanha como parte do doutorado sanduíche financiado pela agência CAPES (bolsa CAPES-PROBRAL) (ANEXO VII). Como na época o método de caracterização da antx-a(s) não havia sido desenvolvido, o extrato utilizado nos tratamentos de sementes, foi um extrato menos puro do que o extrato administrado em camundongos. Mesmo assim, foi possível observar alterações no sistema antioxidante das sementes. Como ilustrado na figura 40, novamente a enzima a GPx apresentou atividade significantemente diminuída após 7 dias no grupo de sementes regadas com extrato contendo antx-a(s) nas concentrações de 0,18; 0,018 e 0,0018 $\mu g.\mu l^{-1}$ ($n=5$, $p<0,05$ e $p<0,01$). A atividade da GST apresentou diferença estatística somente na concentração mais baixa de extrato da antx-a(s) (0,018 $\mu g.\mu l^{-1}$) ($n=5$, $p<0,05$). Por sua vez, as enzimas GR e CAT não apresentaram diferenças significativas para nenhuma das concentrações de extrato contendo antx-a(s).

PFLUGMACHER *et al.* (2006) irrigaram grupos de sementes da alfafa (*Medicago sativa* L.) com uma dose de microcistina e anatoxina-a durante sete dias e, posteriormente avaliaram os efeitos na germinação e na atividade das enzimas antioxidantes. Os autores relataram que a anatoxina-a produziu uma maior redução no desenvolvimento da raiz da alfafa, bem como, alterações nas enzimas antioxidantes avaliadas (aumento significante na atividade das enzimas SOD e ascorbato peroxidase e diminuição na atividade das enzimas CAT, GST e GR).

Embora PFLUGMACHER *et al.* (2006) irrigarem o mesmo tipo de sementes com padrão comercial de outra neurotoxina da família das anatoxinas (anatoxina-a), somente a atividade da enzima GST está de acordo com o descrito por esses pesquisadores. Por outro lado, enquanto esses autores relatam aumento na atividade de uma das peroxidases mais abundantes em plantas, a enzima ascorbato peroxidase (APx, enzima que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em plantas usando o ascorbato como agente redutor) neste trabalho foi observado uma diminuição na atividade da enzima GPx. Esta diferença de resultados pode estar relacionada ao fato da GPx catalizar a redução de diversos peróxidos orgânicos, enquanto que a APx age somente sobre o peróxido de hidrogênio. Tanto no trabalho realizado por PFLUGMACHER *et al.* (2006) como neste estudo utilizou-se um extrato livre de toxina com o objetivo de verificar a influência dos interferentes no ensaio. Como pode ser visto na figura 40, componentes presentes no extrato podem exercer algum efeito, porém este não foi estatisticamente significante. Segundo PFLUGMACHER (2004) as cianotoxinas podem provocar EO em plantas através do aumento na formação de ROS e lipoperoxidação. De fato, o acúmulo de cianotoxinas, como as microcistinas, em sementes já foi confirmado (PEUTHERT *et al.*, 2007). A importância da avaliação do EO provocado por cianotoxinas em sementes está relacionada ao fato de que águas superficiais contaminadas podem estar sendo utilizadas para regar plantações de alimento para consumo humano ou animal (PEUTHERT & PFLUGMACHER, 2010). Dessa maneira, se águas contaminadas com antx-a(s) estiverem sendo utilizadas na agricultura, pelos resultados obtidos em sementes de alfafa neste trabalho, poderia haver um efeito pró-oxidante nessas plantas podendo ocasionar EO e mau desenvolvimento das espécies cultivadas.

Apesar das diferenças evidentes entre os dois modelos utilizados, ambos permitiram comprovar que o extrato contendo antx-a(s) pode provocar um desequilíbrio no sistema enzimático antioxidante, promovendo EO em camundongos e em sementes. Com base nos resultados obtidos nos dois modelos experimentais utilizados foi possível sugerir que a antx-a(s) exerceu a mesma atividade cíclica-redox apresentada por alguns IOF, de acordo com KOVACIC (2003). Isto significa

que a antx-a(s) seria capaz de gerar espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio, o que ocasionaria a alteração no sistema de defesa antioxidante. Sendo assim, a integridade da membrana eritrocitária ficaria ainda mais suscetível a danos causados pela lipoperoxidação. Por outro lado, não se pode descar a possibilidade da própria toxina e/ou outros componentes do extrato terem provocado a diminuição da atividade da enzima GPx, via aumento na produção de hidroperóxidos lipídicos. É importante salientar ainda que este é o primeiro trabalho referente à capacidade pró-oxidante de extrato contendo antx-a(s). Os resultados obtidos em sementes de alfafa fazem parte de um artigo em preparação (ANEXO IV). Na figura 44 é apresentado um esquema ilustrativo do possível envolvimento do extrato contendo antx-a(s) na produção de ROS e, consequente desequilíbrio do sistema enzimático antioxidante.

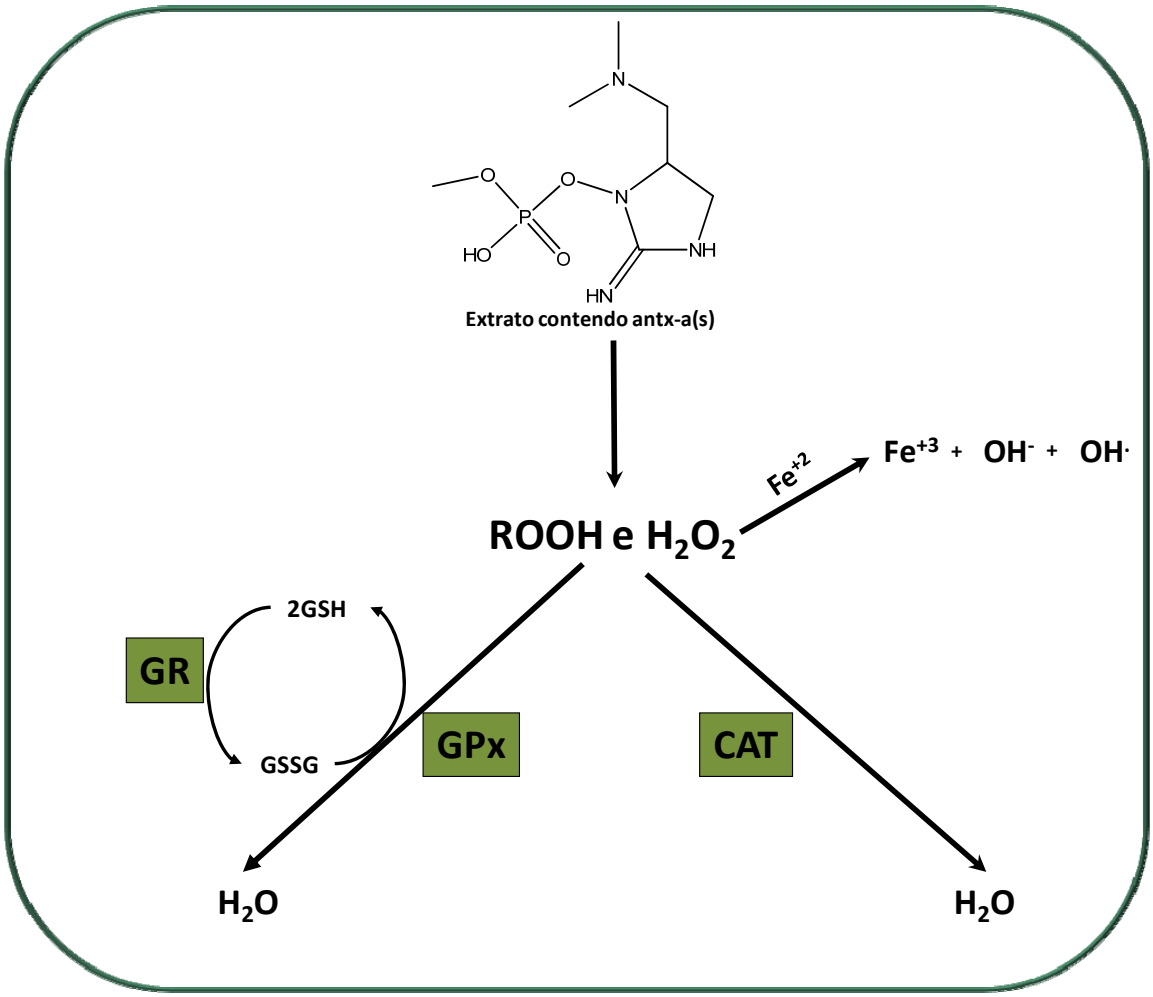


Figura 44. Proposta do desequilíbrio na atividade das enzimas antioxidantes que o extrato contendo antx-a(s) pode ter provocado nos dois modelos estudados neste trabalho (camundongos e sementes).

Seguidamente, decidiu-se avaliar o efeito cardiotóxico do extrato contendo antx-a(s) em outro modelo experimental, ou seja, em coração de baratas *Leurolestes circunvagans*. O número de trabalhos referentes à possível aplicação comercial dos metabólitos secundários de cianobactérias como algicidas, herbicidas e inseticidas é limitado, porém mostra-se cada vez mais promissor. Sabe-se que as cianobactérias produzem uma grande diversidade de metabólitos biologicamente ativos, os quais podem ter potencial para aplicação no impedimento ou controle do crescimento de outros organismos (BERRY *et al.*, 2008). Dentre as vantagens do uso das cianotoxinas para este fim, estaria o papel ecológico que eles possuem como agentes alelopáticos (alelopatia: processo que envolve metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos, que influencia no crescimento e/ou desenvolvimento de outros organismos). De acordo com a teoria de CARMICHAEL (1992) as cianotoxinas exercem uma função protetora, portanto, elas seriam ótimas candidatas para se tornarem agentes de controle de alguns organismos. O conhecimento prévio dos possíveis efeitos que estes agentes poderiam exercer nos ecossistemas aquáticos, ajudaria na melhoria das avaliações do impacto ambiental, evitando desastres ecológicos (BERRY *et al.*, 2008). Caso fosse comprovada a utilidade das cianotoxinas ou outros metabólitos de cianobactérias, estes compostos seriam uma alternativa como agentes de controle ambiental de origem natural interessante. O efeito larvicida de extratos de cianobactéria em mosquitos *Aedes aegypti* já foi testado com sucesso (KIVIRANTA *et al.*, 1993). Certamente, como qualquer candidato a agente de controle, se faz necessária a realização de uma minuciosa avaliação toxicológica em mamíferos e outros organismos, bem como implicações no ecossistema, bioacumulação e biodisponibilidade (BERRY *et al.*, 2008).

A presença da antx-a(s) no extrato utilizado em baratas foi caracterizada por LC-MS (Figura 41) e pelo teste de atividade residual de AChE *in vitro*. A lavagem da preparação do CISB com solução salina antes da adição das soluções de extrato da antx-a(s) foi adotada devido ao fato de que, em pré-testes, algumas baratas apresentaram parada cardíaca após 15 min de aplicação do extrato. Como pode ser

observado na figura 42, o efeito do extrato contendo antx-a(s) na frequência cardíaca das baratas foi dose e tempo dependentes, na faixa de $1,25x10^3$ até $5x10^3$ $\mu g.g^{-1}$ de animal. A maior elevação da frequência cardíaca foi de 18±3% (n=9, $p<0,05$) quando a dose de $2,5x10^3$ $\mu g.g^{-1}$ de animal foi adicionada à preparação do CSIB. Quando uma dose maior foi avaliada ($8x10^3$ $\mu g.g^{-1}$), o efeito cronotrópico positivo diminuiu. Segundo FOX (1981) a adição de agentes anticolinesterásicos ou acetilcolina em preparação do CSIB pode provocar aumento ou diminuição na frequência cardíaca dependendo da concentração testada. De fato, o efeito cardiomodulatório do extrato da antx-a(s) em baratas foi observado. A queda na frequência cardíaca associada à dose mais alta de extrato da antx-a(s) ($8x10^3$ $\mu g.g^{-1}$ de animal) pode ser resultado do acúmulo de acetilcolina no sistema cardiovascular da barata, em razão da inibição da AChE. A presença de receptores colinérgicos, tanto no coração como nos nervos que fazem parte do sistema cardíaco pareado da barata, já foi confirmada (COLLINS & MILLER, 1977; FOX, 1981). Existem discrepâncias na literatura sobre o efeito da acetilcolina na frequência cardíaca de baratas. Embora alguns autores tenham demonstrado que concentrações de acetilcolina na faixa de 10^{-3} a 10^{-7}M aumentariam a frequência cardíaca (NAIDU, 1953; COLLINS & MILLER, 1977), outros afirmam que concentrações de 10^{-2} a 10^{-6}M a diminuiriam (RICHARDS, 1963; SCHAEFER & MILES, 1970). Sendo assim, a resposta obtida com a dose de $2,5x10^3$ $\mu g.g^{-1}$ (18% de aumento da freqüência) está em concordância com os resultados obtidos por COLLINS & MILLER (1977). A importância toxicológica da inibição da AChE de insetos reside no fato de que esta enzima é o principal alvo dos agentes mais utilizados no controle de pragas (SIEGFRIED & SCOTT, 1990). Porém, a eficácia dos IOF e carbamatos tem sido cada vez mais prejudicada, devido à capacidade de alguns insetos em degradá-los. Por este motivo, a pesquisa de novos inseticidas que possam agir numa região específica da AChE desses animais, livre de resistência e menos tóxico para os outros organismos, vem sendo bastante aceita (POLSINELLI *et al.*, 2010). Os resultados obtidos referentes ao efeito do extrato contendo antx-a(s) em baratas fazem parte de um manuscrito submetido para publicação na revista Toxicon (ANEXO V).

7. CONCLUSÕES

O extrato contendo antx-a(s) possui um potencial pró-oxidante capaz de provocar alteração no sistema enzimático de defesa antioxidante tanto de camundongos *Swiss* como de sementes de alfafa *Medicago sativa* L. Assim também, o extrato de antx-a(s) exerce um efeito cardiomodulatorio em baratas *Leurolestes circunvagans* (Blattodea).

Dessa maneira, os estudos realizados neste trabalho mostraram que:

(i) A extração da antx-a(s) a partir da cultura de cianobactérias utilizando o cartucho de extração em fase sólida Sep Pack® C18, permite a eliminação dos interferentes mais apolares presentes no extrato.

(ii) O método desenvolvido para identificação de antx-a(s) por LC-MS pode ser utilizado como uma ferramenta para confirmação da presença da antx-a(s) em amostras de florações.

(iii) Os sinais clínicos apresentados por camundongos tratados com doses decrescentes de extrato contendo antx-a(s) (1000 até 40 $mg.kg^{-1}$) são característicos de uma sindrome colinérgica periférica com ataxia, tremores, tetania e morte por parada respiratória.

(iv) A dose sub-letal de 20 $mg.kg^{-1}$ de extrato contendo antx-a(s) não provoca alteração na atividade locomotora geral no Campo Aberto e, no comportamento no Labirinto em Cruz Elevado, em camundongos tratados via intraperitoneal.

(v) A enzima AChE é mais susceptível à inibição do que a enzima BuChE em sangue de camundongos tratados com 20 mg de extrato contendo

antx-a(s).kg^{-1}, mantendo-se inibida até 48 h após administração e, voltando a níveis normais após 7 dias.

(vi) O tratamento de camundongos com extrato contendo antx-a(s) eleva a formação de peróxidos orgânicos provocando maior consumo da enzima GPx, cuja atividade permanece diminuída até 7 dias após o tratamento. A enzima GR compensa a redução da GPx, aumentando sua atividade na tentativa de manter a homeostase na reciclagem de GSH, permitindo assim o reestabelecimento do equilíbrio antioxidante até o décimo quarto dia após o tratamento. A enzima SOD não apresenta alteração significativa.

(vii) A atividade da enzima GPx diminui quando sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.) são regadas durante 7 dias com extrato contendo antx-a(s) nas concentrações de 0,18; 0,018 e 0,0018 $\mu g.\mu l^{-1}$. Essa redução pode ser devido ao aumento na formação de peróxidos orgânicos. A atividade da enzima GST é reduzida somente na concentração de 0,0018 $\mu g.\mu l^{-1}$. Já as enzimas GR e CAT não apresentam alteração siginificativa nas concentrações analisadas.

(viii) A dose de $2,5x10^3$ µg de extrato contendo antx-a(s).g^{-1} de animal provoca taquicardia em baratas *Leurolestes circunvagans* em função da inibição na atividade da enzima AChE desses animais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, F.B.; GARGOURI, B.; LASSOUED, S.; AMMAR-KESKES, L. Dimethoate-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of Vitamins C and E in vitro. **Toxicol Lett**, v. 196, p. S81-S81, 2010.

ABDOLLAHI, M.; MOSTAFALOU, S.; POURNOURMOHAMMADI, S.; SHADNIA, S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. **Comp Biochem Phys C**, v. 137, p. 29-34, 2004.

AEBI, H. Catalase. In: H.U., B. (Ed.). **Methods of Enzimatic Analysis**. New York: Academic New York, 1974. p. 673-684.

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, 1984. p. 121-126.

AKHGARI, M.; ABDOLLAHI, M.; KEBRYAEEZADEH, A.; HOSSEINI, R.; SABZEVARI, O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 22, p. 205-211, 2003.

ALONZO, H.G.; CORRÊA, C.L. Praguicidas. In: OGA S., C., M., BATISTUZZO, J.A (Ed.). **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu 2008. p. 621-642.

ALY, N.; EL-GENDY, K.; MAHMOUD, F.; EL-SEBAE, A.K. Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. v. 97, p. 7-12, 2010.

AMADO, L.L.; MONSERRAT, J.M. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. **Environ Int**, v. 36, p. 226-235, 2010.

ANJOS, F.M.D.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.D.C.; ZAJAC, M.P.; HILLER, S.; CHRISTIAN, B.; ERLER, K.; LUCKAS, B.; PINTO, E. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. **Toxicon**, v. 48, p. 239-245, 2006.

APELDOORN, M.E.V.; EGMOND, H.P.V.; SPEIJERS, G.J.A.; BAKKER, G.J.I. Toxins of cyanobacteria. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, p. 7-60, 2007.

ARÁOZ, R.; MOLGÓ, J.; TANDEAU DE MARSAC, N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. v. 56, p. 813-825, 2010.

AUGUSTINSSON, K. Acetylcholine Esterase and Cholinesterase. In: SUMNER, J. B. M. K. (Ed.). **The Enzymes;chemistry and mechanism of action**. New York: New York Academic Press, 1950. p. 444-471.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de textos, 2006.

AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **J Appl Phycol**, v. 6, p. 261-265, 1994.

BARROS, L.P.C.; MONSERRAT, J.M.; YUNES, J.S. Determination of optimized protocols for the extraction of anticholinesterasic compounds in environmental samples containing cyanobacteria species. **Environ Toxicol Chem**, v. 23, p. 883-889, 2004.

BAUMANN, E.; GERSCH, M. Purification and identification of neurohormone-D, a heart accelerating peptide from the corpora cardiaca of the cockroach *Periplaneta americana*. **Insect Biochem**, v. 12, p. 7-14, 1982.

BECKER, V.; IHARA, P.; YUNES, J.; HUSZAR, V. Occurrence of anatoxin-a(s) during a bloom of Anabaena crassa in a water-supply reservoir in southern Brazil. **J Appl Phycol**, v. 22, p. 235-241, 2010.

BERRY, J.; GANTAR, M.; PEREZ, M.; BERRY, G.; NORIEGA, F. Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides. **Mar Drugs**, v. 6, p. 117-146, 2008.

BOVE, P.F.; VAN DER VLIET, A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. **Free Radical Bio Med**, v. 41, p. 515-527, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; LOTUFO, J.G.; BARROS, M.T. **Introdução à Engenharia Ambiental**. São Paulo: Prentice Hall, 2002.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Bio Med**, v. 27, p. 951-965, 1999.

BRIMIJOIN, S. Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: Nature, localization and dynamics. **Prog Neurobiol**, v. 21, p. 291-322, 1983.

BROADHURST, P.L. Experiments in psychogenetics. In: EYSENK, H. J. (Ed.). **Experiments in personality**. London: Routledge and Kegan Paul Press, 1960. p. 31-71.

CALABRESE, E.J. An Assessment of Ankiolytic Drug Screening Tests: Hormetic Dose Responses Predominate. **Crit Rev Toxicol**, v. 38, p. 489-542, 2008.

CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comp Biochem Phys C**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CARMICHAEL, W.W. Chemical and Toxicological Studies of the Toxic Freshwater Cyanobacteria Microcystis aeruginosa, Anabaena flos-aquae and Aphanizomenon flos-aquae. **S Afr J Sci**, v. 78, p. 367-372, 1982.

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins. **J Appl Microbiol**, v. 72, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W.W.; GORHAM, P.R. Anatoxins from clones of Anabaena flos-aquae isolated from lakes of western Canada. **Mitt Internat Verein Limmol**, v. 21, p. 285-295, 1978.

CARMICHAEL, W.W.M., N.A.; HYDE, E.G. Marine toxins. In: HALL, S. S., G. (Ed.). **Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology**. Washington DC: American Chemical Society, 1990. p. 87-106.

CARNEIRO, R. **Ecofisiologia de Cylindroespermopsis raciborskii (Cyanobacteria): Influências da intensidade e qualidade da luz e da dureza da água sobre o crescimento e a produção de saxitoxinas** Rio de Janeiro, 2009. 133 p. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CHAMBERS, H.W. Organophosphorus Compounds: An overview. In: CHAMBERS J., L. P. (Ed.). **Organophosphates Chemistry, Fate and Effects**. San Diego-CA: Academic Press Inc, 1992. p. 3-17.

CHAN, P.K.; O'HARA, G.P.; HAYES, W.A. Principle and methods for acute and subchronic toxicity. In: HAYES, W. A. (Ed.). **Principles and Methods of Toxicology**. New York: Boca Raton, CRC Press, 1992. p. 1-51.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: Spon Press, 1999.

CLÉMENT, Y.; PROESCHEL, M.-F.; BONDOUX, D.; GIRARD, F.; LAUNAY, J.-M.; CHAPOUTHIER, G. Genetic factors regulate processes related to anxiety in mice. **Brain Res**, v. 752, p. 127-135, 1997.

CODD, G.A.; STEFFENSEN, D.A.; BURCH, M.D.; BAKER, P.D. Toxic Blooms of Cyanobacteria in Lake Alexandrina,

South Australia-Learning from History. **Aust J Mar Fresh Res**, v. 45, p. 731-736, 1994.

COLLINS, C.; MILLER, T. Studies on action of biogenic-amines on cockroach heart. **J Exp Biol**, v. 67, p. 1-15, 1977.

COOD, G.A.E., C.B.; LAWTON, L.A.; CAMBEL, D.I.; BELL, S.G. . Toxins from cyanobacteria (blue green algae) The Pringsheim lecture. In: WIESSNER, W. S., E.; STARR, R.C. (Ed.). **Algae, environment and human affairs** Bristol: Biopress, 1995. p. 1-17.

COOK, W.O.; BEASLEY, V.R.; DAHLEM, A.M.; DELLINGER, J.A.; HARLIN, K.S.; CARMICHAEL, W.W. Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse brain cholinesterase activity. **Toxicon**, v. 26, p. 750-753, 1988.

COOK, W.O.; BEASLEY, V.R.; LOVELL, R.A.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; MAHMOOD, N.A.; CARMICHAEL, W.W. Consistent inhibition of peripheral cholinesterases by neurotoxins from the freshwater cyanobacterium <I>Anabaena flos-aquae</I>: Studies of ducks, swine, mice and a steer. **Environ Toxicol Chem**, v. 8, p. 915-922, 1989.

COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HARLIN, K.S.; BEASLEY, V.R.; HOOSER, S.B.; HASCHEK, W.M.; CARMICHEAL, W.W. Reversal of cholinesterase inhibition and clinical signs and the postmortem findings in mice after intraperitoneal administration of anatoxin-a(s), paraoxon or pyridostigmine. **Vet Hum Toxicol**, v. 33, 1991.

COOK, W.O.; DELLINGER, J.A.; SINGH, S.S.; DAHLEM, A.M.; CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R. Regional brain cholinesterase activity in rats injected intraperitoneally with anatoxin-a(s) or paraoxon. **Toxicol Lett**, v. 49, p. 29-34, 1989.

COOK, W.O.; IWAMOTO, G.A.; J.SCHAEFFER, D.; CARMICHAEL, W.; BEASLEY, V.R. Pathophysiologic effects of anatoxin-a(s) in anaesthetized rats: the influence of atropine and artificial respiration. **Pharmacol Toxicol**, v. 67, p. 151-155, 1990.

COSSU, C.; DOYOTTE, A.; JACQUIN, M.C.; BABUT, M.; EXINGER, A.; VASSEUR, P. Glutathione Reductase, Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, Glutathione Levels, and Lipid Peroxidation in Freshwater Bivalves,Unio tumidus,as Biomarkers of Aquatic Contamination in Field Studies. **Ecotox Environ Safe**, v. 38, p. 122-131, 1997.

DATTA, C.; GUPTA, J.; SENGUPTA, D. Interaction of organophosphorus insecticides phosphamidon and malathion on lipid profile and acethylcolinesterase activitiy. **Indian J Med Res**, v. 100, p. 87-89, 1994.

DEVIC, E.; LI, D.; DAUTA, A.; HENRIKSEN, P.; CODD, G.A.; MARTY, J.-L.; FOURNIER, D. Detection of Anatoxin-a(s) in Environmental Samples of Cyanobacteria by Using a Biosensor with Engineered Acetylcholinesterases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 4102-4106, August 1, 20022002.

DEWES, L.J.; SANDRINI, J.Z.; MONSERRAT, J.M.; YUNES, J.S. Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab Chasmagnathus granulatus (Decapoda, Brachyura). **Ecotox Environ Safe**, v. 65, p. 201-208, 2006.

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins - occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. **Mol Nutr Food Res**, v. 50, p. 7-17, 2006.

DODDS, W.K.; BOUSKA, W.W.; HEITZMANN, J.L.; PILGER, T.J.; PITTS, K.L.; RILEY, A.J.; SCHLOESSER, J.T.; THORNBRUGH, D.J. Eutrophication of U.S. freshwaters: analysis of potential economic damages. **Environ Sci Technol** v. 43, p. 12-19, 2009.

DÖRR, F.; RODRÍGUEZ, V.; MOLICA, R.; HENRIKSEN, P.; KROCK, B.; PINTO, E. Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Toxicon**, v. 55, p. 92-99, 2010.

DÖRR, F.A.; PINTO, E.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**, v. 56, p. 1247-1256, 2010.

EBADI, A.G.; SHOKRZADEH, M.; MAHMOUDI, G. Chronic toxicity of menazon and relation to oxidative stress in red blood cells of rats. **Toxicol Lett**, v. 172, p. S132-S132, 2007.

EL-SHENAWY, N.S.; EL-SALMY, F.; AL-EISA, R.A.; EL-AHMARY, B. Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. **Pestic Biochem Phys**, v. 96, p. 101-107, 2010.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 88-90, 1961.

EPA - Environmental Protection Agency. Harmonized Test Guideline OPPTS 870.1100 Acute Oral Toxicity. Disponível em: http:/www.epa.gov/oppfead1/harmonization.pdf. Acesso em: 10 junho de 2010.

EPA - Environmental Protection Agency. Malathion Summary Document. Disponível em: http://www.regulations.gov/search/Regs/home.html#documentDetail?D=EPA-HQ-OPP-2009-0317-0006. Acesso em: 20 junho de 2010.

EPA - Environmental Protection Agency. Trichlorfon Summary Document. Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/trichlorfon_red.pdf. Acesso em: 25 junho de 2010.

FILOMENI, G.; CIRIOLO, M.R. Redox Control of Apoptosis: An Update. **Antioxid Redox Sign**, v. 8, p. 2187-2192, 2006.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. [12] Assays of glutathione peroxidase. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, 1984. p. 114-120.

FLOHÉ, L.; OETTING, F. [10] Superoxide dismutase assays. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, 1984. p. 93-104.

FOX, P. **Cyrculatory system**. New York: Springer, 1981.

FRANCIS, G. Poisonous Australian lake. **Nature**, v. 18, p. 11-12, 1878.

GERSHENFELD, H.K.; PAUL, S.M. Mapping Quantitative Trait Loci for Fear-like Behaviors in Mice. **GENOMICS**, v. 46, p. 1-8, 1997.

GOLDBERG DM; SPOONER RJ. Glutathione reductase. In: HU, B. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. New York: Verlag Chemie, Weinheim, 1983. p. 258-265.

GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of Anabaena flos-aquae (Lyngb.) de Bréd. **Verh Internat Verein Limnol**, v. 15, p. 796-804, 1964.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferases. **J Biol Chem**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in Biology and Medicine**. Okford Science Publications, 2007.

HEMSCHEIDT, T.; BURGOYNE, D.L.; MOORE, R.E. Biosynthesis of anatoxin-a(s). (2S,4S)-4-hydroxyarginine as an intermediate. **J Chem Soc Chem Comm**, p. 205 - 206, 1995.

HENRIKSEN, P.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; MOESTRUP, Ø. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. **Toxicon**, v. 35, p. 901-913, 1997.

HSDB - Hazardous Substances Data Bank. Malathion. Disponível em: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB Acesso em: 22 junho 2010.

HSDB - Hazardous Substances Data Bank. Trichlorfon. Disponível em: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB Acesso em: 22 junho 2010.

HUDNELL, H.K. The state of U.S. freshwater harmful algal blooms assessments, policy and legislation. **Toxicon**, v. 55, p. 1024-1034, 2010.

HYDE, E.G.; CARMICHAEL, W.W. Anatoxin-a(a), a naturally occurring organophosphate, is an irreversible active site-directed inhibitor of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). **J Biochem Toxicol**, v. 6, p. 195-201, 1991.

INCHEM - International Programme on Chemical Safety. Trichlorfon. Disponível em: http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v071pr09.htm. Acesso em: 22 junho de 2010.

INGKANINAN, K.; TEMKITTHAWON, P.; CHUENCHOM, K.; YUYAEM, T.; THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **J Ethnopharmacol**, v. 89, p. 261-264, Dec2003.

JAMES, K.J.; FUREY, A.; SHERLOCK, I.R.; STACK, M.A.; TWOHIG, M.; CAUDWELL, F.B.; SKULBERG, O.M. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. **J. of Chromatogr A**, v. 798, p. 147-157, 1998.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.; DE MELO FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. **N Engl J Med**, v. 338, p. 873-878, March 26, 19981998.

KAMPEN, E.J.; ZIJLSTRA, W.C. Erythrocytometric methods and their standardization. **Clin Chim Acta**, v. 6, p. 538, 1964.

KARADEMIR, C.; OZDEN, S.; ALPERTUNGA, B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. **Toxicol in vitro**, v. 21, p. 1538-1544, 2007.

KARALLIEDDE, L.D.; EDWARDS, P.; MARRS, T.C. Variables influencing the toxic response to organophosphates in humans. v. 41, p. 1-13, 2003.

KERKUT, G.A. Acetylcholinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7.). **Gen Pharmacol-Vasc S**, v. 15, p. 375-378, 1984.

KIVIRANTA, J.; ABDEL-HAMEED, A.; SIVONEN, K.; NIEMELÄ, S.I.; CARLBERG, G. Toxicity of cyanobacteria to mosquito larvae - screening of active compounds. **Environ Toxic Water**, v. 8, p. 63-71, 1993.

KLOWDEN, M.J.; VITALE, A.J.; TRUMBLE, M.J.; WESSON, C.R.; TRUMBLE, W.R. A bioassay for cobra cardiotoxin activity using semiisolated cockroach heart. v. 30, p. 295-301, Mar1992.

KOMÁREK, J.; ZAPOMĚLOVÁ, E. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus Anabaena = subg. Dolichospermum – 1. part: coiled types., v. 7, p. 1-31, 2007.

KOVACIC, P. Mechanism of organophosphates (Nerve Gases and Pesticides) and Antidotes: electron transfer and oxidative stress. **Curr Med Chem**, v. 10, p. 2705-2709, 2003.

KUJBIDA, P. **Efeitos das microcistinas sobre funções de neutrófilos**. São Paulo, 2008. 182 p. Tese de Doutorado - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo.

KUJBIDA, P.; HATANAKA, E.; CAMPA, A.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. **Biochem Bioph Res Co**, v. 341, p. 273-277, 2006.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S.M.F.Q.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii, isolated from Brazil. **Toxicon**, v. 37, p. 1359-1373, 1999.

LANG, F. Sistema Neuromuscular e Sensorial. In: S. SILBERNAGL, F. L. (Ed.). **Fisiopatologia - Texto e Atlas**. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 305.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Therapeut**, v. 46, p. 321-340, 1990.

LOTTI, M. Low-level exposures to organophosphorus esters and peripheral nerve function. **Muscle Nerve**, v. 25, p. 492-504, 2002.

LOTTI, M.; MORETTO, A. Organophosphate-Induced Delayed Polyneuropathy. **Toxicol Reviews**, v. 24, p. 37-49, 2005.

MA, B.; CHANG, F.N. Purification and cloning of a Delta class glutathione S-transferase displaying high peroxidase activity isolated from the German cockroach Blattella germanica. v. 274, p. 1793-1803z, 2007.

MAHMOOD, N.A.; CARMICHAEL, W.W. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium Anabaena flos-aquae NRC 525-17. **Toxicon**, v. 24, p. 425-434, 1986.

MAHMOOD, N.A.; CARMICHAEL, W.W. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium Anabaena flos-aquae NRC-525-17. **Toxicon**, v. 25, p. 1221-1227, 1987.

MAHMOOD, N.A.; CARMICHAEL, W.W.; PFAHLER, D. Anticholinesterase poisonings in dogs from a cyanobacterial (blue-green-algae) bloom dominated by *Anabaena flos-aquae*. **Am J Vet Res**, v. 49, p. 500-503, Apr1988.

MAJORI, G.; BETTINI, S.; CASAGLIA, O. Effect of black widow spider venom on cockroach heart. **J. Insect Physiol.**, v. 18, p. 913-927, 1972.

MATSUNAGA, S.; MOORE, R.E.; NIEMCZURA, W.P.; CARMICHAEL, W.W. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from Anabaena flos-aquae. **J Am Chem Soc**, v. 111, p. 8021-8023, 1989.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase. **J Biol Chem**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MÍDIO, A.; SOARES, E. Mecanismos de ação tóxica dos inseticidas – acaricidas organofosforados e carbamatos. In: MÍDIO, A. S., E. (Ed.). **Inseticidas – Acaricidas Organofosforados e Carbamatos**. São Paulo: Roca, 1995. p. 35-39.

MILLER, T.; METCALF, R.L. Site of action of pharmacologically active compounds on heart of *Periplaneta americana* L. **J. Insect Physiol.**, v. 14, p. 383-394, 1968a.

MILLER, T.; METCALF, R.L. Site of action of pharmacologically active compounds on heart of *Periplaneta americana* L. **J Insect Physiol**, v. 14, p. 383-394, 1968b.

MITROVIC, S.M.; PFLUGMACHER, S.; JAMES, K.J.; FUREY, A. Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. **Aquat Toxicol**, v. 68, p. 185-192, 2004.

MOLICA, R.J.R.; OLIVEIRA, E.J.A.; CARVALHO, P.V.V.C.; COSTA, A.N.S.F.; CUNHA, M.C.C.; MELO, G.L.; AZEVEDO, S.M.F.O. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, v. 4, p. 743-753, 2005.

MONSERRAT, J.M.; YUNES, J.S.; BIANCHINI, A. Effects of Anabaena spiroides (cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species. **Environ Toxicol Chem**, v. 20, p. 1228-1235, 2001.

MOORE, B.S.; OHTANI, I.; DE KONING, C.B.; MOORE, R.E.; CARMICHAEL, W.W. Biosynthesis of anatoxin-a(s). Origin of the carbons. **Tetrahedron Lett**, v. 33, p. 6595-6598, 1992.

MOREIRA, C. **Toxicidade em camundongos devido à exposição prolongada a uma floração de cianobactérias contendo microcistinas: avaliações comportamental, hematológica, bioquímica e anatomopatológica**. São Paulo, 2007. 155 p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo.
MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria n. 518 de 25 de março de 2004**. Disponível em: : http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_518_2004.pdf Acesso em: 4 de maio 2010.

NACHMANSOHN, D.; ROTHENBERG, M.A. Studies on cholinesterase.1. On the specificity of the enzyme in nerve tissue. **J Biol Chem**, v. 158, p. 653-666, 1945.

NAIDU, M.B. Physiological action of certain drugs and insecticides on an insect heart. **T Roy Soc Trop Med H**, v. 47, p. 266-266, 1953.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. **J I Microbiol Biot**, v. 17, p. 373-384, 1996.

ONODERA, H.; OSHIMA, Y.; HENRIKSEN, P.; YASUMOTO, T. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium Anabaena lemmermannii, as the cause of bird kills in Danish Lakes. **Toxicon**, v. 35, p. 1645-1648, 1997.

OSSWALD, J.; RELLÁN, S.; GAGO, A.; VASCONCELOS, V. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. **Environ Int**, v. 33, p. 1070-1089, 2007.

PAERL, H.W.; MILLIE, F. Physiological ecology of toxic cyanobacteria. **Phycologia**, v. 35, p. 160-167, 1996.

PAI, H.H.; WU, S.C.; HSU, E.L. Insecticide resistance in German cockroaches (Blattella germanica) from hospitals and households in Taiwan. v. 15, p. 33-40, 2005.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Meth**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PETERS, L.D.; LIVINGSTONE, D.R. Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot. **J Fish Biol**, v. 49, p. 986-997, 1996.

PEUTHERT, A.; CHAKRABARTI, S.; PFLUGMACHER, S. Uptake of microcystins-LR and -LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). **Environ Toxicol**, v. 22, p. 436-442, 2007.

PEUTHERT, A.; PFLUGMACHER, S. Influence of the cyanotoxin microcystin-LR on tocopherol in Alfalfa seedlings (Medicago sativa). **Toxicon**, v. In Press, Corrected Proof, 2010.

PFLUGMACHER, S. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte Ceratophyllum demersum during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. **Aquat Toxicol**, v. 70, p. 169-178, 2004.
PFLUGMACHER, S.; JUNG, K.; LUNDVALL, L.; NEUMANN, S.; PEUTHERT, A. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (<I>Medicago sativa</I>) and induction of oxidative stress. **Environ Toxicol Chem**, v. 25, p. 2381-2387, 2006.

PFLUGMACHER, S.; OLIN, M.; KANKAANPÄÄ, H. Nodularin induces oxidative stress in the Baltic Sea brown alga Fucus vesiculosus (Phaeophyceae). **Mar Environ Res**, v. 64, p. 149-159, 2007.

PFLUGMACHER, S.; STEINBERG, C. Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in aquatic macrophytes. **J Appl Bot Food Qual**, v. 71, p. 144–146, 1997.

POLSINELLI, G.A.; SINGH, S.K.; MISHRA, R.K.; SURANYI, R.; RAGSDALE, D.W.; PANG, Y.-P.; BRIMIJOIN, S. Insect-specific irreversible inhibitors of acetylcholinesterase in pests including the bed bug, the eastern yellowjacket, German and American cockroaches, and the confused flour beetle. **Chem-Biol Interact**, v. *in press*, 2010.

POSSAMAI, F.P.; FORTUNATO, J.J.; FEIER, G.; AGOSTINHO, F.R.; QUEVEDO, J.; WILHELM FILHO, D.; DAL-PIZZOL, F. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. **Environ Toxicol Phar**, v. 23, p. 198-204, 2007.

POURIA, S.; DE ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R.L.; BARRETO, V.T.S.; WARD, C.J.; PREISER, W.; POON, G.K.; NEILD, G.H.; CODD, G.A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**, v. 352, p. 21-26, 1998.

PRASANNA, R.; SOOD, A.; JAISWAL, P.; NAYAK, S.; GUPTA, V.; CHAUDHARY, V.; JOSHI, M.; NATARAJAN, C. Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds (Review). **Appl Biochem Micro+**, v. 46, p. 119-134, 2010.

REPAVICH, W.M.; SONZOGNI, W.C.; STANDRIDGE, J.H.; WEDEPOHL, R.E.; MEISNER, L.F. Cyanobacteria (blue-green algae) in wisconsin waters: acute and chronic toxicity. **Water Res**, v. 24, p. 225-231, 1990.

REYNOLDS, C. Growth and replication of phytoplankton. In: REYNOLDS, C. (Ed.). **Ecology of Phytoplankton: Ecology Biodiversity and Conservation**. New York: Cambridge University Press, 2006. p. 178-236.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Bio Med**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RICHARDS, A.G. The effect of temperature on heart-beat frequency in the cockroach, Periplaneta americana. **J Insect Physiol**, v. 9, p. 597-606, 1963.

RICHARDSON, R. Interactions of Organophosphorus Compounds with Neurotoxic Esterase. In: P., C. J. L. (Ed.). **Organophosphates Chemistry, Fate, and Effects**. San Diego: Academic Press Inc, 1992. p. 299-323.

RODRÍGUEZ, V.; MOURA, S.; PINTO, E.; PEREIRA, C.M.P.; BRAGA, R.C. Aspectos toxicológicos e químicos da Anatoxina-a e seus análogos. **Quim Nova**, v. 29, p. 1365-1371, 2006.

ROZMAN, K.K.; KLAASSEN, C.D. Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). **Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. Kansas: McGraw-Hill, 2001. p. 107-132.

SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.D. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 71, p. 359-385, 2000.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.D.; SENNA, P.A.C.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. Revista Brasil. Bot.,Brasil, v.27, n.2, p.213-227, 2004.

SCHAEFER, C.W.; MILES, J. Inhibition by acetylcholine of cockroach heart (Gromphadorhina portentosa). **Comp Gen Pharmacol**, v. 1, p. 426-430, 1970.

SEDÝ, J.; URDZÍKOVÁ, L.; JENDELOVÁ, P.; SYKOVÁ, E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. **Neurosci Biobehav R**, v. 32, p. 550-580, 2008.

SHADNIA, S.; AZIZI, E.; HOSSEINI, R.; KHOEI, S.; FOULADDEL, S.; PAJOUMAND, A.; JALALI, N.; ABDOLLAHI, M. Evaluation of oxidative stresse and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. **Hum Exp Toxicol**, v. 24, p. 439-445, 2005.

SHIMIZU, Y. Microalgal metabolites: A new perspective. **Annu Rev Microbiol**, v. 50, p. 431-465, 1996.

SIEGFRIED, B.D.; SCOTT, J.G. Properties and inhibition of acetylcholinesterase in resistant and susceptible German cockroaches (Blattella germanica L.). **Pestic Biochem Phys**, v. 38, p. 122-129, 1990.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, v. 82, p. 291-295, March 1, 19971997.

SVRCEK, C.; SMITH, D.W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. **J Environ Eng Sci**, v. 3, p. 155-185, 2004.

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In: GILMAN, A. G. G., L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. (Ed.). **The Pharmacologic Basis of Terapheutics**. New York: Mcgraw hill, 1985. p. 110-129.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.; CARVALHO, V.L.D.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil
Bulletin of the Pan American Health Organization, v. 27, p. 244-253, 1993.

TORRES, L.H. **Efeitos da inalação de fumaça do cigarro no estresse oxidativo do sistema nervoso central de camundongos jovens**. São Paulo, 2009. 100 p. Dissertação de mestrado - Departamento de Análises clínicas e toxicológicas, Universidade de São Paulo.

VARONESSI, B.; PADILLA, S. Rodent Models of Organophosphorus-Induced Delayed Neuropathy. In: CHAMBERS J., L. P. (Ed.). **Organophosphates Chemistry, Fate, and Effects**. San Diego: Academic Press Inc, 1992. p. 353-366.

VIDYASAGAR, J.; KARUNAKAR, N.; REDDY, M.S.; RAJNARAYANA, K.; SURENDER, T.; KRISHNA, D.R. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. **Indian J Pharmacol**, v. 36, p. 76-79, 2004.

VIEIRA, J.M.D.S.; AZEVEDO, M.T.D.P.; AZEVEDO, S.M.F.D.O.; HONDA, R.Y.; CORRÊA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, v. 45, p. 901-909, 2005.

VILLATTE; VILLATTE, F.; SCHULZE; SCHULZE, H.; SCHMID; SCHMID, R.; BACHMANN; BACHMANN, T. A disposable acetylcholinesterase-based electrode biosensor to detect anatoxin-a(s) in water. **Anal Bioanal Chem**, v. 372, p. 322-326, 2002.

WACKLIN, P.; HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus Dolichospermum (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. **Fottea**, v. 9, p. 59-64, 2009.

WALKER, C.H.; THOMPSON, H.M. Phylogenetic distribution of cholinesterase and related esterases. In: MINEAU, P. (Ed.). **Cholinesterase-inhibiting insecticides their impact on wildlife and the environment. Chemicals in agriculture**. Amsterdam, 1991. p. 2-17.

WERNER, V.R.; LAUGHINGHOUSE, I.V.; HAYWOOD, D. Bloom-forming and other planktonic Anabaena (Cyanobacteria) morphospecies with twisted trichomes from Rio Grande do Sul State, Brazil

Nova Hedwigia, v. 89, p. 17-47, 2009.

WINTERBOURN, C.C.; STERN, A. Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. v. 80, p. 1486-1491, 1987.

WOREK, F.; MAST, U.; KIDERLEN, D.; DIEPOLD, C.; EYER, P. Improved determination of acetylcholinesterase
activity in human whole blood. **Clin Chim Acta**, v. 288, p. 73-90, 1999.

YANG, Z.; MORROW, L.; ROBERTS, L.; DETTBARN, W. Diisopropylphosphorofluoridate-induced muscle hyperactivity associated with enchanced lipid peroxidation in vivo. **Biochem Pharmacol**, v. 52, p. 357-361, 1996.

9.1 ANEXO I

Aprovação do Comité de Ética em Pesquisa-FCF-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 12/2007

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto "**Investigação de mecanismos bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo em ratos e/ou camundongos após exposição a anatoxinas**" (Protocolo CEEA nº137), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Vânia Rodríguez Salazar** e do orientador(a) Prof. Ernani Pinto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 12/03/2007.*

São Paulo, 12 de março de 2007.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br

9.2 ANEXO II

CURRICULUM VITAE

Vania Cristina Rodríguez Salazar
Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Vania Cristina Rodríguez Salazar
Filiação Saúl Rodríguez López e Ma. Cristina Salazar de Rodríguez
Nascimento 11/11/1978 - Santa Cruz de la Sierra/ - Bolívia
Carteira de Identidade V3843166 CIMCRE/C - SP - 03/01/2004
CPF 73629405134
Passporte 3923628

Formação Acadêmica/Titulação

2007 Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Investigação de mecanismos bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo em ratos e/ou camundongos após exposição a anatoxinas
Orientador: Ernani Pinto
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2004 - 2007 Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometría de massas para identificação e quantificação de anatoxina-a em amostras de água e florações algais, Ano de obtenção: 2007
Orientador: Ernani Pinto Junior
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

1997 - 2001 Graduação em Licenciatura Em Bioquímica.
Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, UAGRM, Bolívia

Formação complementar

2009 - 2009 II Latin America Risk Assessment Workshop.
International Union of Toxicology, IUTOX. Águas de São Pedro-SP

2009 - 2009 Curso de curta duração em Escola de Altos Estudos em Toxicologia.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Gerenciamento de resíduos de laboratórios analític.
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, CCQA, Brasil

2008 - 2008 Treinamento: operação e manutenção básica do HPLC.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Advanced Workshop of Toxic Cyanobacteria tools.
Universidade do Porto, U.PORTO, Porto, Portugal

2007 - 2007 Curso de curta duração em Apresentação e aplicação da NBR 14725:2005 (ABNT).
INTERTOX, INTERTOX, Brasil

2007 - 2007 Extensão universitária em Guest scientist.
Leibniz Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, IGB- BERLIN, Alemanha
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2007 - 2007 Extensão universitária em Doutorado sandwich.
Friedrich-Schiller University of Jena, FSUJ, Alemanha
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2005 - 2005 Extensão universitária em Recuperação de poluentes prioritários de soluções.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2004 - 2004 Programa de Practica Professionalizante.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2003 - 2003 TOEFL TEST.
CENTRO BOLIVIANO AMERICANO, CBA, Bolívia

2003 - 2003 Curso de curta duração em Complete Course Of Proficiency In English Advanced.
Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiania, Brasil

2003 - 2003 Toxicologia de Medicamentos.
Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiania, Brasil

2000 - 2002 Complete Course Of Proficiency In English Advanced.
CENTRO BOLIVIANO AMERICANO, CBA, Bolívia

2002 - 2002 Preparation course for the CBA proficiency test.
CENTRO BOLIVIANO AMERICANO, CBA, Bolívia

2002 - 2002 Curso de curta duração em TOEFL TEST.
CENTRO BOLIVIANO AMERICANO, CBA, Bolívia

2002 - 2002 Curso de curta duração em II CURSO INTERNACIONAL DE TOXICOLOGIA.
Hospital Universitario Japonés, HUJ, Bolívia

2001 - 2001 Curso de curta duração em REPARATION COURSE FOR THE CBA PROFICIENCY TEST.
Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, UAGRM, Bolívia

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Atividades

02/2007 - Atual Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Participação em projetos:
Investigação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos em organismos expostos à anatoxina-a(s)

06/2004 - Atual Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Participação em projetos:
Fapesp - 04/11416-4 - Toxinas alcaloídicas presentes em florações algais: isolamento e padronização de métodos analíticos para monitoramento biológico , Fapesp - 03/06443-0 - Algas presentes em florações: Isolamento e padronização de métodos analíticos para a quantificação de toxinas , Investigação de mecanismos bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo em ratos e/ou camundongos após exposição a anatoxinas

06/2004 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Linhas de Pesquisa:
Investigação de Toxinas Alcaloídicas Produzidas por Algas de Água Doce , Desenvolvimento de Métodos Analíticos por GC-MS para a determinação de anatoxina e derivados

01/2004 - 06/2004 Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Estágio:
Análises de amostras para o controle de Dopagem

Linhas de pesquisa

1. Desenvolvimento de Métodos Analíticos por GC-MS para a determinação de anatoxina e derivados

2. Investigação de Toxinas Alcaloídicas Produzidas por Algas de Água Doce

Projetos

2007 - Atual Investigação de mecanismos bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo em ratos e/ou camundongos após exposição a anatoxinas
Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
Integrantes: Vania Cristina Rodríguez Salazar (Responsável);
Financiador(es):

2004 - 2007 Fapesp - 04/11416-4 - Toxinas alcaloídicas presentes em florações algais: isolamento e padronização de métodos analíticos para monitoramento biológico
Descrição: A maioria da população mundial utiliza a água doce, presente em reservatórios, represas ou rios como a principal fonte de água potável. Os órgãos responsáveis pelo abastecimento de água potável são constantemente surpreendidos por florações algais ("blooms"). Muitas dessas

florações são causadas pelo crescimento acentuado de cianobactérias. Um terço dos 50 gêneros de cianobactérias são capazes de produzir toxinas. Os mecanismos de toxicidade dessas substâncias são diversos e podem ser: hepatotóxicas, neurotóxicas, dermatotóxicas ou promover a inibição da síntese de proteínas. As toxinas alcaloídicas, tais como a anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(s), e saxitoxina, são pouco estudas no Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, e métodos para a sua detecção e monitoramento em estações de tratamento de água, ainda não foram desenvolvidos.A longo prazo, o objetivo desse projeto é isolar, identificar quimicamente e padronizar métodos analíticos para a determinação de anatoxina-a, seus derivados (homoanatoxina, anatoxina-a(s)) e a saxitoxina em amostras de água coletadas na represa Billings e Guarapiranga e também em culturas de cianobactérias (Anabaena spp. e Cylindrospermopsis racibonsky) mantidas em laboratório.Para isso, usaremos técnicas cromatográficas como colunas de sílica, C18, C8 e/ou Sephadex, camada delgada, HPLC, CG-MS e espectroscópicas como UV-VIS, RMN de 1H e 13C, IV e espectrometria de massas.
Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (0); Especialização (0); Mestrado acadêmico (1); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);
Integrantes: Vania Cristina Rodríguez Salazar (Responsável); ; Ernani Pinto; Mauricio Yonamine
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2004 - Atual Fapesp - 03/06443-0 - Algas presentes em florações: Isolamento e padronização de métodos analíticos para a quantificação de toxinas

Descrição: Além de São Paulo, outras cidades de grande e médio porte do interior e litoral do estado, em razão da relativa fragilidade gerada pelo impacto da intensa dinâmica de ocupação, possuem suas fontes de água para abastecimento e recreação da população ameaçadas pela poluição e pelo aparecimento de florações de algas tóxicas. Recentemente, por meio da portaria nº 1469/00 de janeiro de 2001, A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) passou a exigir dos órgãos competentes e responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água, o controle de toxinas de algas (microcistinas, cilindrospermopsina e saxitoxinas). Esses órgãos têm um prazo máximo de 36 meses para se adequar a essa portaria.Poucas são as pesquisas voltadas para o estudo de tais toxinas no Brasil. Este projeto tem como objetivo estudar as toxinas presentes em algas envolvidas nos fenômenos de floração em água doce. Para isso, coletaremos as algas durante os processos de floração e/ou cultivaremos espécies já isoladas em laboratório. As toxinas serão isoladas de culturas axênicas mantidas em laboratório. Cabe ressaltar que os planos gerais do projeto envolverão alguns centros especializados nacionais e internacionais (técnicos da CETESB, toxicologistas, farmacêuticos, taxonomistas e químicos) que, de forma integrada e multidisciplinar, conduzirão as pesquisas em cada uma das suas respectivas áreas. Além de artigos científicos e relatórios, pretendemos capacitar pessoal especializado nas diferentes áreas do conhecimento incorporadas ao projeto e também kits de imunoensaio e PCR para a detecção de toxinas e espécies tóxicas.
Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (2); Especialização (0); Mestrado acadêmico (5); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (1);
Integrantes: Vania Cristina Rodríguez Salazar (Responsável); ; Humberto Frias; Paula Kujbida; Ernani Pinto; Meron Petro Zajac; Fabyana Maria dos Anjos; Sidnei Silva Moura; Daniele Cardozo
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. DORR, F., RODRÍGUEZ, V., MOLICA, R., HENRIKSEN, P., KROCK, B., PINTO, E.
Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled
to electrospray ionization-tandem mass spectrometry (Impresso). Toxicon, v.55, p.92 - 99, 2010.

2. RODRÍGUEZ, V., MOURA, Sidnei, PEREIRA, Claudio M. P., PINTO, E.
Aspectos Toxicológicos e Químicos da Anatoxina e seus Análogos. Química Nova (Impresso). , v.29, p.1365 - 1371, 2006.

3. RODRÍGUEZ, V., YONAMINE, M., PINTO, E.
Determination of anatoxin-a in environmental water samples by solidphase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Separation Science (Online). , v.29, p.2085 - 2090, 2006.

Livros publicados

1. KUJBIDA, Paula, RODRÍGUEZ, V., PINTO, E.
Fundamentos de Toxicologia. São Paulo : Atheneu, 2008

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Júlio, A., RODRÍGUEZ, V., PINTO, E.
Avaliação do crescimento da cepa produtora de anatoxina-a(s) e determinação do grau de inibição de acetilcolinesterase In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte.
XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2009. v.22.

2. RODRÍGUEZ, V., Spinosa, H., PINTO, E.
Comparative cholinesterases inhibition specificity by trichlorfon and anatoxin-a(s) In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte.
XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2009. v.22.

3. MORI, B., RODRÍGUEZ, V., Dal Belo, C., PINTO, E.
Efeito cardiotóxico do extrato de A. oumiana contendo anatoxina-a(s) em modelo experimental de baratas In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte.
XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia. Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2009. v.22.

4. RODRÍGUEZ, V., PFLUGMACHER, S., PINTO, E.
Efeitos da anatoxina-a(s) na germinação e geração de estresse oxidativo em sementes de alfafa (Medicago sativa) In: XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2008, São Paulo.
XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. , 2008.

5. RIVELLIS, A., RODRÍGUEZ, V., PINTO, E.
Obtenção de padrão de anatoxina-a(s) a partir de cepas de Anabaena spiroides In: XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2008, São Paulo.
110 Anos do ensino de farmácia em São Paulo XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. , 2008.

6. RODRÍGUEZ, V., Bortolli, S., PINTO, E.
Anaylises of anatoxin-a from lyiphilized blooms samples by solid phase extraction and gas chromatography In: XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2007, São Paulo.
XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. , 2007.

7. RODRÍGUEZ, V., YONAMINE, Mauricio, PINTO, E.
Identificação e quantificação de anatoxina-a por microexrtação em fase sólida e cromatografia gasosa

acoplada à epsectrometria de massas In: XI Congresso Brasileiro de Ficologia & Simpósio Latino-americano sobre algas nocivas, 2006, Itajaí.
XI Congresso Brasileiro de ficologia & simpósio latino-americano sobre algas nocivas. Itajaí: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2006. p.3 - 231

8. RODRÍGUEZ, V., YONAMINE, Mauricio, PINTO, E.
Detecção de anatoxina-a em amostras aquosas por SPME/CG-MS In: 28 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poço de Caldas.
28 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo: , 2005. v.1.

9. RODRÍGUEZ, V.
Determinação de anatoxina-a em água por SPME e CG-EM In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife-PE.
Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo: Comissão Editorial Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2005. v.18. p.161 - 161

Produção Técnica

1. RODRÍGUEZ, V.
Enzimologia, 2010. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

2. RODRÍGUEZ, V., PINTO, E.
Monitoramento de cianotoxinas por LC-MS, 2010. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

3. RODRÍGUEZ, V., PINTO, E.
Monitoramento de organofosforados em água através da avaliação da enzima acetilcolinesterase, 2010. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

4. RODRÍGUEZ, V., PINTO, E.
Toxinas alcaloídicas presentes em florações algais: isolamento e desenvolvimento de métodos analíticos para monitorização ambiental, 2006. (Relatório de pesquisa)

Orientações e Supervisões
Orientações e Supervisões em andamento

Iniciação científica

1. Barbara Coelho de Freitas. **Avaliação bioquímica do potencial inibidor de colinesterases e potencial pró-oxidante do organofosforado natural anatoxina-a(s)**. 2010. Iniciação científica - Universidade de São Paulo.

9.3 ANEXO III

ARTIGO PUBLICADO

Toxicon 55 (2010) 92–99

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry

Felipe Augusto Dörr[a], Vania Rodríguez[a], Renato Molica[b], Peter Henriksen[c], Bernd Krock[d,**], Ernani Pinto[a,*]

[a] Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Avenida Lineu Prestes, 580, 05508900 São Paulo, SP, Brazil
[b] Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brazil
[c] Department of Marine Ecology, National Environmental Research Institute, University of Aarhus, Roskilde, Denmark
[d] Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 April 2009
Accepted 8 July 2009
Available online 24 July 2009

Keywords:
Anatoxin-a(s)
Cyanobacteria
LC–MS/MS
Electrospray

ABSTRACT

Anatoxin-a(s) is a potent irreversible inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase with a unique *N*-hydroxyguanidine methylphosphate ester chemical structure. Determination of this toxin in environmental samples is hampered by the lack of specific methods for its detection. Using the toxic strain of *Anabaena lemmermani* PH-160 B as positive control, the fragmentation characteristics of anatoxin-a(s) under collision-induced dissociation conditions have been investigated and new LC–MS/MS methods proposed. Recommended ion transitions for correct detection of this toxin are 253 > 58, 253 > 159, 235 > 98 and 235 > 96. Chromatographic separation is better achieved under HILIC conditions employing a ZIC-HILIC column. This method was used to confirm for the first time the production of anatoxin-a(s) by strains of *Anabaena oumiana* ITEP-025 and ITEP-026. Considering no standard solutions are commercially available, our results will be of significant use for the correct identification of this toxin by LC–MS/MS.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cyanobacteria (blue-green algae) are ubiquitous microorganisms with a fundamental role as primary producers in different ecosystems. Under appropriate conditions, these organisms are capable of massive reproduction, mainly in eutrophic and hypertrophic freshwater bodies where nutrients are abundant. Such outbreaks are known as blooms and are increasingly compromising the use of water for drinking and recreational purposes, especially when bloom-forming species are able to produce toxic secondary metabolites (cyanotoxins), which can accumulate to high levels and pose serious health risks to animals and humans (Dittmann and Wiegand, 2006).

Cyanotoxins are commonly grouped according to their biological effects into hepatotoxins (microcystins and nodularins), neurotoxins (anatoxins and *paralytic shellfish poisoning* toxins), cytotoxins (cylindrospermopsin) and toxins with irritating potential (lipopolysaccharide) (Sivonen and Jones, 1999).

One of the freshwater toxins documented in poisoning incidents is the neurotoxic alkaloid anatoxin-a(s), originally described from the strain *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17 (Mahmood and Carmichael, 1986), and later identified as a unique *N*-hydroxyguanidine methylphosphate ester (Fig. 1) (Matsunaga et al., 1989).

Anatoxin-a(s) is a potent irreversible inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase with an intraperitoneal LD_{50} of

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30911505; fax: +55 11 30319055.
** Corresponding author. Tel.: +49 471 48312055; fax: +49 471 48311425.
E-mail addresses: bernd.krock@awi.de (B. Krock), ernani@usp.br (E. Pinto).

0041-0101/$ – see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.017

9.4 ANEXO IV

ARTIGO EM PREPARAÇÃO

ANATOXIN EFFECTS ON THE GERMINATION AND THE ANTIOXIDATIVE ENZYMES OF ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA*) SEEDLINGS

Vania Rodríguez[1], Renato Molica[2], Ernani Pinto[1], Stephan Pflugmacher[3,*]

[1]Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, 05508 900 São Paulo, Brazil

[2] Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, Av. Bom Pastor s/n 55292-901 Pernambuco, Brazil

[3]Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, AG Biochemical Regulation, Müggelseedamm 301, 12587 Berlin, Germany

Corresponding author: Ernani Pinto

e-mail address: ernani@usp.br (E. Pinto)

9.5 ANEXO V

ARTIGO SUBMETIDO

EFFECTS OF THE CYANOBACTERIAL ORGANOPHOSPHATE ANATOXIN-A(S) ON CARDIAC RHYTHM OF *Leurolestes circunvagans*

Vania Rodríguez[1], Bruno Mori[1], Felipe Augusto Dörr[1], Chárístón André Dal Belo[2*], Ernani Pinto[1*]

[1]Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580,São Paulo, Brazil.

[2]Universidade Federal do Pampa - Campus São Gabriel, Av. Antonio Trilha 1847, Rio Grande do Sul, Brazil.

[*]Corresponding authors:

Tel.: + 55 11 30911505; fax + 55 11 30319055

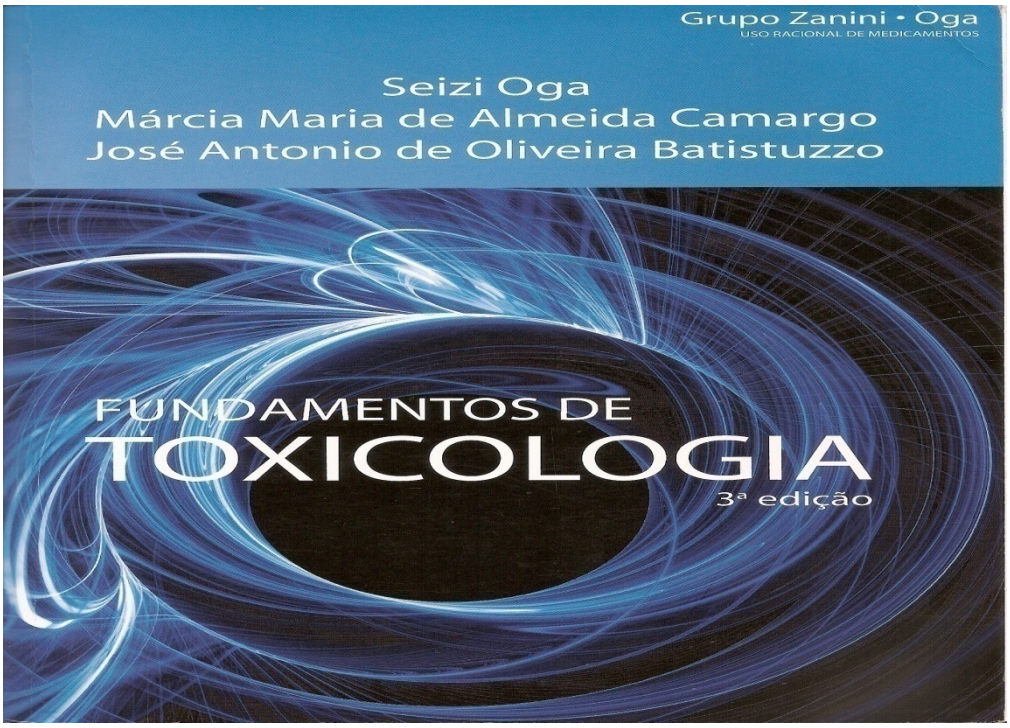
e-mail address: ernani@usp.br (E. Pinto)

and

Tel.: +55 55 32326075; e-mail address: charistonbelo@unipampa.edu.br (C. A. Dal Belo)

9.6 ANEXO VI

CAPÍTULO DE LIVRO



2.7.

Cianobactérias e Microalgas Tóxicas em Ambientes Aquáticos

Paula Kujbida, Vania Rodríguez e *Ernani Pinto*

SUMÁRIO

1. Introdução
2. Toxinas
3. Toxinas freqüentes em água doce
   3.1. Hepatotoxinas
      3.1.1. Microcistinas
      3.1.2. Nodularinas
      3.1.3. Cilindrospermopsinas
   3.2. Neurotoxinas
      3.2.1. Anatoxina-a e homoanatoxina-a
      3.2.2. Anatoxina-a(S)
      3.2.3. Saxitoxina
4. Toxinas freqüentes em água marinha
   4.1. Saxitoxina
   4.2. Dinofisistoxinas
   4.3. Ácido domóico
   4.4. Brevetoxinas
   4.5. Ciguatoxinas, gambierol e maitotoxina
   4.6. Azaspirácidos
   4.7. Lingbiatoxinas
   4.8. Aplisiatoxinas
   4.9. Pectenotoxinas
   4.10. Iessotoxinas
5. Regulações e monitoramento
6. Bibliografia

9.7 ANEXO VII

seit 1558

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Friedrich-Schiller-Universität Jena · Postfach · D-07740 Jena

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

Institut für
Ernährungswissenschaften
Lehrstuhl Lebensmittelchemie

Univ.-Prof.
Dr. Bernd Luckas

Dornburger Straße 25
D-07743 Jena

Telefon: + 49 [0] 3641·94 96 50
Telefax: + 49 [0] 3641 94 96 52

E-Mail: Bernd.Luckas@uni-jena.de
www.uni-jena.de/biologie/ieu/lc
Jena,

to whom
it may concern

CERTIFICATE

Vania Cristina Rodríguez Salazar, born 1978-11-11, citizen of Bolivia and PhD-student at the Department of Toxicology and Toxicological Analyses, FCF/USP, Av. Prof. Lineu Prestes No. 580 CEP 05508-900, São Paulo, Brazil, was as guest researcher at the Department of Food Chemistry of the Institute for Nutrition of the Friedrich-Schiller-University of Jena during four months (July - November 2007). Some parts of the laboratory work was also carried out at the Department of Plant Physiology of the Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries Berlin.

During her stay in Germany, the student Vania C. Rodríguez Salazar was involved in a research project about cyanotoxins formed by known strains of cyanobacteria.

She has planned and carried out laboratory experiments together with my PhD-student Thomas Krueger to investigate the behavior of three different cyanobacterial strains (*Anabaena flos-aquae, Cylindrospermopsis raciborskii-AUS* and *Cylindrospermopsis raciborskii ITEP-18*) separately as well as mixed in the same medium. It was evaluated the amount of PSP`s, anatoxin-a and cylindrospermopsin produced by those strains. The extraction and toxin determinations were performed in our laboratory by application of HPLC-DFL, LC-MS and LC-MS-MS analytical techniques.

In addition, during her stay at the Leibniz-Institute in Berlin Vania Rodriguez was working with Dr. Stephan Pflugmacher to elucidate the effects of anatoxin-a(S) containing cyanobacterial extracts on the germination of alfalfa (*Luzerne medicago sativa*) seeds and the induction of oxidative stress.

I was very encouraged to have Vania C. Rodríguez Salazar in my research group. She has a positive vibrancy, was hard working and very interested in his research. She has the ability to perform analytical and physiological analyses producing a large amount of high-quality data in a relatively short time. She is very engaged in theoretical discussions as well as in field and laboratory situations.

Prof. Dr. Bernd Luckas
Head of the Dept. of Food Chemistry
Director of the Institute for Nutrition