

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Aplicação de extrato contendo guanitoxina produzida por  
cianobactéria para aplicação no controle de *Tuta absoluta*  
(*Lepidoptera: Gelechiidae*)**

**Jéssica Chaves Fadul**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2023**

**Jéssica Chaves Fadul**  
**Bacharela em Farmácia**

**Aplicação de extrato contendo guanitoxina produzida por cianobactéria para aplicação no controle de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)**

Orientador:  
Prof. Dr. **ERNANI PINTO JUNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba**  
**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Fadul, Jéssica Chaves

Aplicação de extrato contendo guanitoxina produzida por cianobactéria para aplicação no controle de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) / Jéssica Chaves Fadul - - Piracicaba, 2023.

92 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cianobactérias 2. Guanitoxina 3. Agricultura sustentável 4. Inseticidas  
I. Título

Aos meus amigos e familiares,  
por todo o carinho e suporte

**Ofereço**

Aos meus pais Jacinta e Jorge,  
por todo o incentivo para os estudos  
e amor incondicional

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho à minha amada mãe, que é a luz da minha vida, bem como ao meu pai, que já não está aqui, porém sempre foi meu maior incentivador. Dedico também à minha madrinha, tia Cici, que sempre acreditou na minha capacidade de vencer os obstáculos e à minha tia Rosa, como carinhosamente chamo de segunda mãezinha.

À minha família, em especial à minha irmã Bárbara e minha sobrinha Alice, por me lembrarem o que é amor incondicional. Ao meu irmão Dudu por tanto amor e carinho que ele transmite. Ao meu padrinho Hugo e às minhas primas Gabriella, Fabíola e Isabella por todo o carinho e apoio, apesar da distância.

Ao meu orientador, Professor Ernani, por ter permitido a realização deste trabalho e me aceitado em seu grupo de pesquisa. Aos colaboradores do laboratório de Biogeoquímica Ambiental: Lilian, Dagmar, Sandra, Ralf, Margato e Simone, por serem sempre tão gentis e solícitos, serei eternamente grata. Dedico também à Paloma, Larissa, Núbia, Rafaela, Mariana, Matheus e Kelly, pelo suporte no decorrer dessa trajetória.

Aos meus amigos e colegas da ESALQ e CENA que conheci no decorrer desta caminhada, Gabriel, Anderson, Izabelly, Mariana, Maurício, Rafael, Bruno, Leonardo, obrigada pela ajuda e carinho. Agradeço também às minhas amigas e vizinhas Julia e Lorena, e também à Geovanna e sua família que me acolheram nos meus primeiros dias na cidade, vocês têm um lugar muito especial no meu coração.

Aos meus amigos da Geografia, Marcelo, Ellen, Natan, Gabi, Iury e Juliana, bem como meus amigos do Ensina Brasil, minha família de Açailândia: Mona Lisa, Lorena, Gabriel e Jenifer. Amo vocês pra sempre.

Aos meus amigos de longa data, Cássio (irmão), Ana Paula, Jéssica, Marina, João Victor, Amanda, Cris, Jane e Leonora. Obrigada por tanto.

Enfim, dedico a todos que contribuíram de alguma forma para meu crescimento pessoal e profissional, só assim pude concluir esta etapa tão importante da minha vida. Meu muito obrigada!

*Somos todos comunidades ambulantes de bactérias.  
O mundo brilha, uma paisagem pontilhista  
feita de minúsculos seres vivos.*

Lynn Margulis

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. HIPÓTESE.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
4.1 Impacto do uso de agroquímicos no ambiente e na saúde humana.....	23
4.1.1 <i>Tuta absoluta</i> : uma relevante peste do tomateiro.....	25
4.2 Cianobactérias.....	27
4.2.1 Identificação de espécies: <i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i> .....	33
4.3 Cianotoxinas.....	35
4.4 Guanitoxina.....	37
4.5 Métodos de detecção.....	44
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
5.1 Cultivo da cepa ITEP-024 e produção de biomassa.....	49
5.2 Microscopia eletrônica de varredura da cepa ITEP-24.....	50
5.3 Detecção de guanitoxina por análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).....	50
5.3.1 Reagentes utilizados no LC-MS.....	50
5.3.2 Preparo da biomassa da cepa ITEP-024 para confirmação de GNT (LC-MS).....	50
5.3.3 Detecção de GNT na biomassa da cepa ITEP-024 (LC-MS).....	51
5.4 Preparo dos extratos aquosos da cepa ITEP-024 para o bioensaio com <i>Tuta absoluta</i> .....	52
5.5 Avaliação do potencial inseticida dos extratos aquosos da cepa ITEP-024.....	53
5.5.1 Criação de <i>Tuta absoluta</i> .....	53
5.5.2 Cultivo da <i>Lycopersicon esculentum</i> CV MICRO-TOM.....	54

5.5.3 Bioensaio no estágio larval.....	54
5.5.4 Bioensaio no estágio embrionário (ovos).....	56
5.6 Avaliação de dano foliar do micro-tomateiro causado pela <i>Tuta absoluta</i> exposta a extratos aquosos da cepa ITEP-024.....	57
5.7 Análise estatística.....	58
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
6.1 Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura da cepa ITEP-024.....	59
6.2 Detecção de GNT na biomassa da cepa ITEP-024 (LC-MS).....	60
6.3 Avaliação do potencial inseticida dos extratos aquosos da cepa ITEP-024....	64
6.4 Avaliação de dano foliar do micro-tomateiro causado pela <i>Tuta absoluta</i> exposta a extratos aquosos da cepa ITEP-024.....	68
7. CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO.....	91



## RESUMO

### **Aplicação de extrato contendo guanitoxina produzida por cianobactéria para aplicação no controle de *Tuta absoluta***

A utilização de inseticidas é amplamente estudada na melhoria da eficiência das produções agrícolas, todavia, seu excesso é nocivo para a saúde humana e tem um impacto negativo no ambiente. Há um interesse mundial na substituição dos inseticidas sintéticos por bioprodutos sustentáveis. Deste modo, tem-se ampliado pesquisas com cianobactérias, por serem alternativas promissoras para a biossíntese de compostos de interesse agrícola. A guanitoxina (GNT), anteriormente conhecida como anatoxina-a(s), é uma molécula polar produzida por cianobactérias de água doce. Estudos mostraram que a GNT apresenta capacidade inibitória da enzima acetilcolinesterase maior ou igual a um dos organofosforados sintéticos mais conhecidos e potentes, o paraoxon. Por não haver nenhum produto agrícola no mercado a partir destes organismos, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial inseticida da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP-024), através de extratos aquosos brutos em diferentes concentrações em insetos da espécie *Tuta absoluta*, relevante peste do tomateiro. Para a realização deste estudo, a cepa ITEP-024, foi cultivada em condições controladas para obtenção da biomassa liofilizada. Para confirmação da presença da toxina, foi realizada cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). A biomassa foi utilizada como controle positivo para confirmação da GNT em todas as amostras do estudo. Para avaliação do potencial inseticida dos extratos aquosos em três diferentes concentrações (250mg/L, 125mg/L e 62,5mg/L), foi realizado bioensaio em microtomateiro (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM) com a espécie *T. absoluta* tanto no estágio larval como no estágio embrionário (ovos). Também foi realizado avaliação de dano foliar causado por *T. absoluta* após exposição aos tratamentos. Os resultados indicaram que a exposição aguda da *T. absoluta* em estágio larval apresentou resultados significativos para os extratos com as duas maiores concentrações (250mg/L e 125mg/L). Já a exposição aguda da *T. absoluta* em estágio embrionário (ovos), apresentou resultados significativos apenas para maior concentração do extrato (250mg/L). Os resultados do dano foliar indicaram que os extratos testados (250mg/L e 62,5mg/L) apresentaram maior dano que o controle negativo (água ultrapura). O presente estudo, além de reforçar o potencial tóxico da molécula de guanitoxina, contribui com informações sem precedentes sobre seu potencial inseticida testado de forma inédita por bioensaios com insetos da espécie *T. absoluta*.

Palavras-chave: Cianobactérias, Agricultura sustentável, Guanitoxina, Anatoxina-a(s), Inseticidas

## ABSTRACT

### **Application of extract containing guanitoxin produced by cyanobacteria for application in the control of *Tuta absoluta***

The use of insecticides is widely studied to improve the efficiency of agricultural production. However, its excess is harmful to human health and has a negative impact on the environment. There is worldwide interest in replacing synthetic insecticides with sustainable bioproducts. Thus, research with cyanobacteria has been expanded, as they are promising alternatives for the biosynthesis of compounds of agricultural interest. Guanitoxin (GNT), formerly known as anatoxin-a(s), is a polar molecule produced by freshwater cyanobacteria. Studies have shown that GNT has an acetylcholinesterase enzyme inhibitory capacity greater than or equal to one of the most well-known and potent synthetic organophosphates, paraoxon. As there are no agricultural products on the market from these organisms, the objective of this study was to investigate the insecticidal potential of the cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP-024), through crude aqueous extracts at different concentrations in insects of the species *Tuta absoluta*, relevant tomato pest. To carry out this study, we cultivated the ITEP-024 strain under controlled conditions to obtain lyophilized biomass. We performed liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) to confirm the presence of the toxin. We used the biomass as a positive control for confirmation of GNT in all study samples. We performed a bioassay on micro-tomato plants (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM) with the species *T. absoluta* in the larval stage as well as in the embryonic stage (eggs) to evaluate the insecticidal potential of aqueous extracts at three different concentrations (250mg/L, 125mg/L and 62.5mg/L). We also carried out an evaluation of leaf damage caused by *T. absoluta* after exposure to treatments. The results indicated that the acute exposure of *T. absoluta* in the larval stage showed significant results for the extracts with the two highest concentrations (250mg/L and 125mg/L). On the other hand, the acute exposure of *T. absoluta* in the embryonic stage (eggs) showed significant results only for the highest concentration of the extract (250mg/L). The results of leaf damage indicated that the tested extracts (250mg/L and 62.5mg/L) showed greater damage than the negative control (ultrapure water). The present study, in addition to reinforcing the toxic potential of the guanitoxin molecule, contributes with unprecedented information on its insecticidal potential, tested in an unprecedented way by bioassays with insects of the *T. absoluta* species.

**Keywords:** Cyanobacteria, Sustainable agriculture, Guanitoxin, Anatoxin-a(s), Insecticides

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo biológico da *Tuta absoluta* com seus quatro estágios de desenvolvimento (ovo, lagarta, pupa e adulto) e breve descrição dos danos causados pelas lagartas. Fonte: BALDO, 2020.....26
- Figura 2. Estrutura celular simplificada de cianobactéria. Membrana externa (1), Camada de peptidoglicano (2), Membrana plasmática (3), Tilacóides (4), Ficobilissomos (5), Ribossomos (6), Proteína Rubisco (7), Carboxissomo (8), DNA circular (9) – Elaborada pela autora e colaboradores (2023). Adaptada de SMARDA *et al.*, 2002; KOMÁREK, 2008.....30
- Figura 3. Árvore filogenética da espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP-024) feita pela comparação entre gêneros de cianobactérias alinhada a partir de sequências de nucleotídeos de agrupamentos gênicos da anabenopectina. Fonte: LIMA *et al.*, 2017.....33
- Figura 4. Morfologia da espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae*. Fonte: WERNER *et al.*, 2012.....35
- Figura 5. Estrutura química da molécula de GNT destacando o grupo guanidino (de azul) e o grupo fosfato (de vermelho), de acordo com Fiore *et al.*, 2020; ChemSpider, 2023. – Imagem elaborada pela autora e colaboradores (2023).....38
- Figura 6. O esquema 1 refere-se ao mecanismo de degradação fisiológico da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase resultando em 1 molécula de colina e 1 molécula de ácido acético. O esquema 2 refere-se ao mecanismo de ação da guanitoxina ligando-se à enzima acetilcolinesterase de modo irreversível. Como resultado há um acúmulo de acetilcolina na junção neuromuscular, desencadeando uma síndrome colinérgica. O radical “R” refere-se ao grupo guanido presente na GNT. De acordo com Santos *et al.*, 2020; Mahmood & Carmichael, 1986 – Imagem elaborada pela autora (2023).....39
- Figura 7. O fluxograma refere-se aos métodos diretos e indiretos para detecção de cianotoxinas. – Imagem elaborada pela autora (2022). Adaptada de Kaushik & Balasubramanian, 2013.....47

- Figura 8. Culturas não axênicas da cepa ITEP-024 em condições controladas de laboratório. Foto elaborada pela autora (2023).....49
- Figura 9. Esquema das etapas de manutenção da população de *Tuta absoluta* em condições controladas de laboratório. Fonte: SOUZA, 2022.....53
- Figura 10. Metodologia utilizada para pulverização nas plantas de *Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM. Foto elaborada pela autora (2023).....55
- Figura 11. Inoculação de larvas neonatas (primeiro instar – L1) de *Tuta absoluta* nas plantas de *Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM após pulverização dos tratamentos. Fonte: SOUZA, 2022.....55
- Figura 12. Plantas de *Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM em exposição por 48 horas aos tratamentos utilizados no experimento. Foto elaborada pela autora (2023).....56
- Figura 13. Bioensaio com ovos de *Tuta absoluta* com 4 tratamentos (extratos aquosos contendo a cepa ITEP-024 nas concentrações de 62,5 mg/L; 125 mg/L e 250 mg/L, e água ultrapura como controle negativo) e 5 repetições (N=20). Foto elaborada pela autora (2023).....57
- Figura 14: Imagens digitais de alta resolução (a e b) da cepa ITEP-024 utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV). Foto elaborada pela autora e colaboradores (2023).....59
- Figura 15. Os cromatogramas (a), (b) e (c) representam a detecção de guanitoxina na biomassa da cepa ITEP-024 em LC-MS no modo MRM (+ESI) e transições de m/z 253>58 [M+H]<sup>+</sup> e m/z 253>159 [M+H]<sup>+</sup>.....61
- Figura 16. Cromatograma representando detecção de padrão de guanitoxina da cepa ITEP-024 por LC-MS no modo MRM (+ESI) e transições de m/z 253>58 [M+H]<sup>+</sup> e m/z 253>159 [M+H]<sup>+</sup>.....63

Figura 17. Exposição aguda do extrato bruto liofilizado da cepa ITEP-024 em diferentes concentrações, após 48 horas, em *T. absoluta* no estágio larval.....64

Figura 18. Exposição aguda do extrato bruto liofilizado da cepa ITEP-024 em diferentes concentrações, após 48 horas, em *T. absoluta* no estágio embrionário (ovos).....65

Figura 19. Análise de dano foliar do micro-tomateiro (*L. esculentum*) causado por *T. absoluta* em estágio larval (L3/4) após exposição por 48h a extratos aquosos da cepa ITEP-024 em diferentes concentrações.....68

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Drogas administradas em animais para comparação ou tratamento da guanitoxina, de acordo com seus efeitos.....41
- Tabela 2. Parâmetros utilizados para determinação de guanitoxina em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).....52
- Tabela 3. Exposição aguda por 48 horas ao extrato bruto liofilizado da cepa ITEP-024 em três diferentes concentrações (62,5 mg/L, 125mg/L e 250mg/L), controle negativo (água ultrapura), controle positivo (malathion 500 Ce), aplicados em microtomateiro (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM) com *Tuta absoluta* no estágio larval (L1). .....91
- Tabela 4. Exposição aguda por 48 horas ao extrato bruto liofilizado da cepa ITEP-024 em três diferentes concentrações (62,5 mg/L, 125mg/L e 250mg/L) e controle negativo (água ultrapura), aplicados em micro placas com *Tuta absoluta* no estágio embrionário (ovos) para análise de eclosão.....92



## 1. INTRODUÇÃO

Karl Marx, em 1867, já discutia em seu livro “O Capital” como os efeitos nocivos do modelo capitalista de agricultura afetavam o solo, prejudicando permanentemente sua fertilidade. Com o aumento da população urbana, houve uma maior demanda na produção de alimentos, ocasionando um desequilíbrio entre o ser humano e o ambiente, já que a regeneração do solo de forma natural fica cada vez mais prejudicada devido seu acelerado esgotamento. A degradação ambiental ocasionada por este modelo intensificou-se após a 1ª Guerra Mundial com a introdução dos agroquímicos (MARX, 1985; MARQUES, 2015).

Inicialmente, essas substâncias foram sintetizadas com o objetivo de desenvolver armas químicas, entre as décadas de 1920 e 1940. Todavia, estudos com esses compostos mostraram seu potencial na agricultura, surgindo assim os herbicidas sintéticos, e os inseticidas organofosforados e organoclorados. E apesar da utilização de agroquímicos ser amplamente estudada para melhoria da eficiência das produções agrícolas, seu uso excessivo e inadequado é nocivo para a saúde humana e tem um impacto negativo no ambiente (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012; CARVALHO *et al.*, 2017; SILVA, 2021).

Sua aplicação, apesar de promover a inibição do crescimento de alguns insetos-praga, prejudica as propriedades da água, do solo e ar. Além disso, podem acumular-se nos alimentos, prejudicando a saúde de quem os consome. Estudos mostram que o efeito de agroquímicos em organismos não-alvo tem sido motivo de alerta no mundo, pois predadores naturais de insetos-praga são um dos mais afetados pelo uso dos agroquímicos. Isso ocasiona um severo desequilíbrio ambiental, pois organismos não-alvo tem um papel essencial no controle populacional de pragas-alvo (GILL & GARG, 2013; SINGH *et al.*, 2018).

A publicação do livro “Primavera Silenciosa” em 1962, por Rachel Carson, é considerada um grande marco no estudo da toxicologia, já que os efeitos dos agroquímicos ainda não eram amplamente questionados e a relação destes com as possíveis causas do câncer ainda não eram profundamente compreendidas. Carson faz uma severa crítica ao uso do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), considerado o primeiro agroquímico moderno e um dos mais comuns no controle de pragas. Após o impacto causado pela publicação de seu livro, o uso do DDT para fins agrícolas foi proibido nos Estados Unidos (CARSON, 1962; HUPFFER *et al.*, 2019).



No Brasil, até 2009, o DDT ainda era amplamente utilizado, especialmente no controle de pragas, como malária e leishmaniose, sendo o país que mais consumia agroquímicos no mundo. É compreensível que países sem recursos financeiros ainda utilizem agroquímicos menos modernos. Todavia, o Brasil já possui subsídios para desenvolver trabalhos relacionados ao controle de pragas e vetores, evitando assim que o uso de substâncias tóxicas seja utilizado em excesso (GOBBO, 2016; LOPES & ALBUQUERQUE, 2018).

Além disso, o consumo de agroquímicos no Brasil tem sofrido um aumento significativo nos últimos anos devido o atual modelo agropecuário, sendo o consumidor de 20% da produção mundial. Entre os anos 2000 e 2014 houve um aumento de 135% no consumo de agroquímicos, representando um acréscimo de 170.000 toneladas para 500.000 toneladas em 15 anos. Das substâncias disponíveis, o glifosato é o herbicida mais utilizado no país (BOMBARDI, 2017). Sendo assim, pode-se afirmar a urgência em pesquisas que busquem produtos naturais e ambientalmente sustentáveis para atenuar os efeitos negativos dos inseticidas sintéticos.

Nesse contexto, as cianobactérias, que são procariontes fotossintetizantes datados de 3,5 bilhões de anos, habitando os mais diversos ecossistemas (STANIER & COHEN-BARIZE, 1977; TOMITANI 2006), representam um potencial biológico por produzirem diversos metabólitos secundários ativos (PRASANNA *et al.*, 2010), como herbicidas, algicidas e inseticidas (BERRY *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2016). As toxinas produzidas por esses microrganismos, as cianotoxinas, tem o poder de defendê-los de possíveis ameaças, e por este motivo, representam uma possível alternativa como produtos de controle de algumas pragas (CARMICHAEL, 1992).

A guanitoxina (GNT), anteriormente nomeada anatoxina-a(s), é o único organofosforado natural conhecido, e é produzida por algumas espécies de cianobactérias, sendo capaz de inibir a acetilcolinesterase, enzima essencial na propagação do impulso nervoso, representando assim um potencial para o desenvolvimento de inseticidas naturais (COOK *et al.*, 1988; COOK *et al.*, 1989a; COOK *et al.*, 1991; FIORE *et al.*, 2020).

Ainda não há nenhum produto com finalidade agrícola no mercado produzido a partir destes organismos, apesar de estudos demonstrarem o potencial de aplicabilidade de extratos contendo GNT no controle de pragas (RODRIGUEZ *et al.*,

2012; SANTOS *et al.*, 2019). A investigação dos efeitos de substâncias ativas produzidas por microrganismos é uma área promissora e possui diversas aplicações biotecnológicas, sendo o foco deste trabalho.



## 2. HIPÓTESE

*Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024), produtora de guanitoxina (GNT), terá aplicabilidade como insumo agrícola no controle da espécie *Tuta absoluta*, traça presente em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial efeito inseticida da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024), produtora de guanitoxina (GNT), através da obtenção de extrato aquoso bruto em diferentes concentrações em uma exposição aguda em insetos-praga da espécie *Tuta absoluta*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Realizar a extração da biomassa liofilizada da cepa ITEP-024 para confirmar a presença da GNT através do método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS);
- b) Obter extrato aquoso bruto com diferentes concentrações de células liofilizadas da cepa ITEP-024;
- c) Avaliar o potencial inseticida dos extratos aquosos em insetos-praga da espécie *Tuta absoluta* através de bioensaio em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM);
- d) Avaliar o dano foliar em micro-tomateiro causado pela *Tuta absoluta* exposta a extratos da cepa ITEP-024.



## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Impacto do uso de agroquímicos no ambiente e na saúde humana

O desenvolvimento tecnológico do ser humano, apesar de próspero, tem causado diversos efeitos negativos no ambiente, o que tem prejudicado outras formas de vida que coabitam o planeta. E a aplicação sem controle dos agroquímicos tem ocasionado o aparecimento de novos insetos-praga devido o exício de espécies que são predadoras naturais destes organismos. Isso tem como resultado a resistência de insetos a algumas dessas substâncias, aumentando a busca por produtos cada vez mais seletivos (MOREIRA *et al.*, 1996; GILL & GARG, 2013; NASCIMENTO & MELNYK, 2016).

A pesquisadora Rachel Carson foi a primeira a denunciar os efeitos nocivos ocasionados pelo uso indiscriminado de agroquímicos no ambiente e na saúde humana, em especial o DDT, primeiro poluente persistente orgânico (POP) moderno, através da publicação do livro Primavera Silenciosa, em 1962. Além de doenças como o câncer serem consideradas raras antes do desenvolvimento da indústria química, a autora ainda demonstra como esses compostos afetam negativamente as propriedades do solo, os organismos que vivem nele e as plantas que dependem da terra para sua nutrição e crescimento. Seu trabalho mostra como todos os ecossistemas estão ligados, e como o uso de agroquímicos tem interferido em toda a cadeia alimentar, causando um ciclo de extermínio sem fim (CARSON, 1962; HUPFFER *et al.*, 2019).

O Brasil é o país que mais utiliza agroquímicos. Estudos comprovam seus efeitos deletérios na saúde humana, dos animais e também na liberação dessas substâncias no ambiente (LOPES & ALBUQUERQUE, 2018). Okuyama e colaboradores (2020) analisaram as intoxicações causadas por agroquímicos e os fatores associados à sua letalidade através das notificações dos centros de informação e assistência toxicológica no Brasil. O estudo afirma que em cada 100 intoxicações, 4 evoluíram para óbito, sendo que os trabalhadores do setor agropecuário estão dentre aqueles que apresentam maior chance de óbito, além de homens, idosos e tentativas de suicídio com produtos extremamente tóxicos (OKUYAMA *et al.*, 2020).

O estudo de Parrón e colaboradores (2014) mostra que há evidências cada vez maiores entre a exposição crônica a agroquímicos em ambientes de trabalho com o aumento de alguns tipos de doenças crônicas, inclusive diversos tipos de câncer. Foi



realizado um caso-controle no Sul da Espanha entre 1998 e 2005 para estimar o risco de câncer em diferentes distritos. Os resultados mostraram que a população que está exposta a um alto uso de agroquímicos teve risco aumentado de câncer em todos os locais analisados (PARRÓN *et al.*, 2014).

Estudo de Ribas e Matsumura (2009) ressalta inúmeros relatos de óbitos e doenças ocasionados pelo uso de agroquímicos. O Brasil apresenta como segunda causa de intoxicação a exposição a essas substâncias, ficando atrás apenas do uso incorreto de medicamentos. Presume-se que o número de casos de exposição aos agroquímicos seja maior que o relatado visto que há uma subnotificação no número de acidentes (RIBAS & MATSUMURA, 2009).

Os efeitos da exposição aos agroquímicos são classificados em crônicos ou agudos. Os efeitos crônicos são aqueles que ocorrem após repetidas exposições, por um tempo mais prolongado, mas em quantidades menores. Já os efeitos agudos são aqueles que ocorrem rapidamente a intoxicação. É sabido que a exposição aguda aos agroquímicos em níveis elevados tem efeitos neurotóxicos já estabelecidos, todavia, sua exposição crônica a níveis inferiores ainda é controversa. Estudos indicam que a tal exposição pode estar relacionada ao aumento do risco de doenças degenerativas como Parkinson (DICH *et al.*, 1997; KAMEL & HOPPIN, 2004; INCA, 2019).

Como exemplos de efeitos agudos, identificam-se: alergias na pele, ardor na boca e nariz, coriza, desidratação, vômitos, dificuldade na respiração, entre outros. Além desses, podemos ter os sintomas inespecíficos como fraqueza, irritabilidade, tremores e dor de cabeça. Os efeitos crônicos podem apresentar os seguintes sintomas clínicos: problemas respiratórios mais graves, alteração no sistema renal e funcionamento hepático, depressão, alterações hormonais na tireoide, próstata e ovários. Aborto, dificuldade de gerar filhos, malformação no desenvolvimento infantil também podem ser efeitos crônicos (INCA, 2019; ALOIZOU *et al.*, 2020).

Os trabalhadores rurais são diretamente afetados com a exposição tanto aguda quanto crônica aos agroquímicos. E por este motivo, o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) é essencial para evitar os efeitos colaterais dessas substâncias na saúde dessa população. Todavia, dados afirmam que os agricultores não fazem uso desta proteção no ambiente de trabalho. É importante ressaltar também que tais efeitos colaterais não ficam contidos apenas nas pessoas que moram ou trabalham no campo. Os animais, o ar, o solo e as águas também são

afetados, bem como os alimentos que são vendidos para as cidades ainda podem reter resíduos químicos (CASSAL *et al.*, 2014; YARPUZ-BOZDOGAN, 2018).

O agroquímico mais utilizado no Brasil e no mundo é o glifosato (organofosforado). Por não ser seletivo e possuir um amplo espectro de ação, está diretamente relacionado à impactos na saúde humana e no ambiente, ocasionando efeitos tóxicos em seres vivos de todos os níveis tróficos. A segurança no seu uso vem sendo rebatida internacionalmente por pesquisas que relacionam sua utilização com o aumento do risco de câncer e outras doenças (LIMA *et al.*, 2021).

Desde os anos 2000 o Brasil vem sofrendo um aumento no consumo dessas substâncias e é o responsável por 20% da produção mundial. Posto isto, há um grande interesse quanto o desenvolvimento de produtos naturais que consigam realizar o controle de insetos-praga, sem causar a resistência de espécies, não agredindo os ecossistemas, bem como apresentarem-se seguros para os seres humanos e outros animais (BOMBARDI, 2017; HUPFFER *et al.*, 2019).

#### 4.1.1 *Tuta absoluta*: uma relevante peste do tomateiro

*T. absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) é uma espécie de inseto lepidóptero (traças) capaz de causar perdas de até 100% na produção do tomate. E por este motivo é uma das principais pragas do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) no Brasil. O seu controle ainda tem sido realizado por meio de diversos inseticidas, como organofosforados e carbamatos, o que ocasiona efeitos prejudiciais no ambiente, resistência a dezenas de inseticidas pela espécie, além de elevar os custos da produção (SOUZA *et al.*, 1983; CHERIF & VERHEGGEN, 2019).

Um fator que contribui para que o tomate seja um dos produtos mais contaminados por agroquímicos é a sua vulnerabilidade a insetos-praga (ANVISA, 2007). Deste modo, a estratégia de manejo integrado de pragas (MIP), que utiliza métodos biológicos, físicos, bioquímicos e culturais, tem sido considerada uma das melhores opções para o controle da espécie até então. Além da proteção dos cultivos, o MIP promove melhorias na saúde pública (CHHETRI, 2018). Todavia, ainda não há uma solução definitiva para o controle da *Tuta absoluta*.

Estudos buscam alternativas para o controle da espécie, seja com extratos aquosos de plantas (controle químico) ou RNA de interferência (controle biológico). O estudo de Brunherotto e Vendramim (2001) analisou os efeitos de extratos aquosos de *Melia azedarach* L no desenvolvimento da *Tuta absoluta*. O estudo de

Vendramim e Thomazini (2001) avaliou a atividade de extratos aquosos de *Trichilia pallida* Swartz em duas cultivares de tomateiro no desenvolvimento deste inseto-praga. Já Camargo e colaboradores (2016) analisaram o silenciamento gênico pelo RNA de interferência (RNAi) para o controle do inseto em tomateiro (BRUNHEROTTO & VENDRAMIM, 2001; VENDRAMIM & THOMAZINI, 2001; CAMARGO *et al.*, 2016).

O ciclo biológico da *Tuta absoluta* tem duração dependente da temperatura e pode ocorrer em 64, 35, 23, 18 dias, nas temperaturas 15°C, 20°C, 25°C e 30°C, respectivamente (KRECHEMER & FOERSTER, 2015), e é sabido quatro estágios no seu desenvolvimento, que são ovo, lagarta, pupa e adulto (URBANEJA *et al.*, 2007).



Figura 1. Ciclo biológico da *Tuta absoluta* com seus quatro estágios de desenvolvimento (ovo, lagarta, pupa e adulto) e breve descrição dos danos causados pelas lagartas. Fonte: BALDO, 2020.

Após a eclosão dos ovos, ocorre a penetração no fruto, parênquima foliar ou ápice das hastes, e ficam entre 4 a 5 dias até se transformarem em lagartas (13 a 15 dias). Em seguida, ocorre a fase de pupa, em que o período de incubação ocorre entre 8 e 10 dias, ficando principalmente no solo ou nas folhas. A última fase é a adulta em

que o ciclo das fêmeas tem duração entre 10 a 15 dias e dos machos de 6 a 7 dias (BALDO, 2020; FILHO *et al.*, 2013).

A *Tuta absoluta* é um inseto com alta capacidade de dispersão pelo globo, já tendo sido encontrada em diversos países da América, Europa, África e Ásia. Além do tomateiro, pode ser encontrada em outras culturas, como a beringela (*Solanum melongena*), beterraba (*Beta vulgaris*), batata (*Solanum tuberosum*) e até mesmo no feijão (*Phaseolus vulgaris*) (BENTO, 2017; BALDO, 2020).

Em razão deste inseto representar um problema mundial sobre seu desenvolvimento em tomateiro, é necessária uma maior investigação com substâncias ativas produzidas por plantas, animais e microrganismos com potencial inseticida para combatê-lo (SINGH *et al.*, 2016; CHHETRI, 2018).

#### **4.2 Cianobactérias**

As cianobactérias são microrganismos procariontes que realizam o processo de fotossíntese para obtenção de energia. Esses seres, pertencentes ao domínio *Bacteria*, são datados de 3,5 bilhões de anos, final do Éon arqueano, sendo considerados um dos primeiros seres vivos do planeta. Estão diretamente relacionadas ao primeiro grande evento de oxidação, do inglês *the great oxidation event*, (GOE), cujo fato ocasionou um significativo aumento dos níveis de oxigênio na atmosfera primitiva, e posterior desenvolvimento dos seres aeróbicos, alterando o curso da vida no planeta (CARMICHAEL, 1994; FOURNIER *et al.*, 2021).

O segundo grande evento de oxidação ocorreu na era Neoproterozoica (evento de oxidação neoproterozoico, do inglês *neoproterozoic oxidation event* (NOE), e a crise de poluição ocasionada por esse aumento de oxigênio na atmosfera há milhões de anos foi designada “o holocausto do oxigênio” (MARGULIS & SAGAN, 1986; SÁNCHEZ-BARACALDO & CARDONA, 2020).

Estes microrganismos contribuíram significativamente com a retirada do gás carbônico da atmosfera e o desenvolvimento da camada de ozônio. Esse acontecimento trouxe como consequências a diminuição do efeito estufa daquele período, a morte da maioria dos seres anaeróbicos estritos, e decorrente surgimento de seres complexos como plantas, fungos e animais (SCHIRRMESTER *et al.*, 2013; SCHIRRMESTER *et al.*, 2015).

Além disso, a hipótese mais aceita é de que a vida iniciou nos oceanos, e as cianobactérias deixaram importantes pistas através dos estromatólitos, formações de

rochas semelhantes a tapetes que foram preservadas por bilhões de anos. Essas formações ocorrem devido a sucessivas precipitações de carbonato quando comunidades de cianobactérias morrem, e outras se formam por cima das mais antigas. Em outras palavras, os estromatólitos são indicadores dessas interações com esses microorganismos (BOSAK *et al.*, 2013; HEARD *et al.*, 2022).

É provável que a capacidade dos eucariotos superiores de realizarem fotossíntese deu-se por meio de um evento endossimbiótico, ou seja, processo de englobamento de ancestrais de cianobactérias semelhantes a cloroplastos, habilitando os eucariotos superiores para a fotossíntese após muitas gerações evolutivas (MARGULIS & SAGAN, 1986). Estudos mostram que um eucarioto completo foi o hospedeiro para o ancestral de cianobactérias, e o sequenciamento do DNA foi essencial para o entendimento da evolução desses microrganismos unicelulares (ZABLEN *et al.*, 1975; BONEN & DOOLITTLE, 1975; BONEN & DOOLITTLE, 1976).

Já a origem da fotossíntese em cianobactérias ainda é um tópico desafiador para os pesquisadores, pois as linhagens bacterianas que deram início ao processo já não existem mais. Há evidências que os primeiros modelos de fotossíntese já ocorriam durante todo o Éon arqueano, ou seja, antes dos primeiros registros fósseis das cianobactérias. É sabido que a diversidade de cianobactérias, dentre elas, a que originou os cloroplastos, surgiu após o grande evento de oxidação. Mais estudos sobre a evolução genômica são necessários para a determinação das características dos primeiros centros de reação fotoquímicos para que seja feita a reconstrução das sequências ancestrais (SÁNCHEZ-BARACALDO & CARDONA, 2020).

Em relação à citologia, sua organização é simples, do tipo procarionte. Não possuem núcleo, organelas e nem flagelos. Entretanto, possuem um envoltório de mucilagem, responsável por proteger a célula do meio externo e captar nutrientes. Possuem parede celular que tem a capacidade de corar-se como bactérias gram-negativas, formada por quatro camadas (duas de polissacarídeos, uma de peptidoglicano (mureína), e uma de citoplasma exterior à membrana celular) (REVIERS, 2018).

Possuem ainda uma membrana plasmática onde encontram-se os tilacóides, que são estruturas em que pigmentos fotossintéticos (clorofila-a e ficobilinas, por exemplo) estão inseridos. As cianobactérias possuem uma característica peculiar de realizar tanto o processo de fotossíntese quanto a respiração celular no mesmo

compartimento (tilacóides), que possui as cadeias transportadoras de elétrons fotossintéticos e também respiratórios. Em seu citoplasma, encontram-se basicamente ribossomos e alguns outros pigmentos dispersos, e possuem nucleotídeos serpentados, onde está localizado o material genético (VERMAAS, 2001; GROSSMAN, 2003).

Em algumas espécies, os plasmídeos podem ser encontrados, que são estruturas de DNA circular, replicando-se de forma autônoma. Os plasmídeos possuem genes envolvidos em processos importantes relacionados à adaptação e resistência da célula ao meio externo, como por exemplo, reparo do DNA, termotolerância, biossíntese de cisteína (aminoácido essencial), e até mesmo resistência à intoxicação por metais pesados (Cassier-Chauvat et al., 2021; Goodchild-Michelman et al., 2023). A tecnologia de DNA recombinante vem sendo utilizada para diversas aplicações dos plasmídeos na indústria e na agricultura.

Além disso, possuem estruturas celulares diferenciadas, como os heterócitos, capazes de realizar a fixação de nitrogênio. Possuem também acinetos, que são formados quando estas sofrem estresse devido a mudanças não favoráveis do meio externo. Temos também os ficobilissomos, estruturas aderidas aos tilacóides que coletam a energia luminosa, e finalmente os carboxissomos, importantes no ciclo de Calvin para fixação do carbono (CHONUDOMKUL *et al.*, 2004; RAJANIEMI *et al.*, 2005).

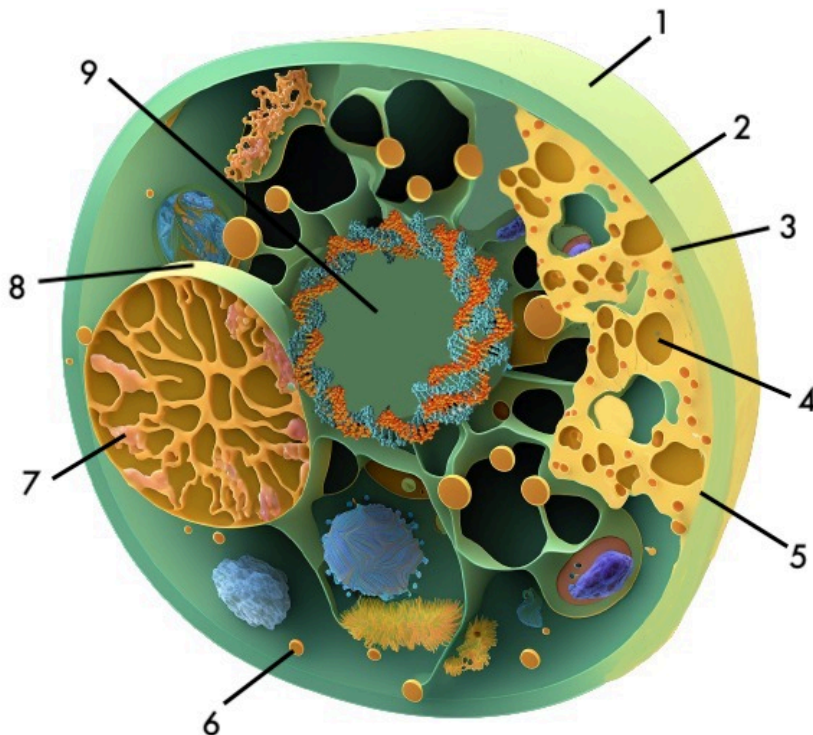


Figura 2. Estrutura celular simplificada de cianobactéria. Membrana externa (1), Camada de peptidoglicano (2), Membrana plasmática (3), Tilacóides (4), Ficobilissomos (5), Ribossomos (6), Proteína Rubisco (7), Carboxissomo (8), DNA circular (9) – Elaborada pela autora e colaboradores (2023). Adaptada de SMARDA *et al.*, 2002; KOMÁREK, 2008.

Estes microorganismos fazem parte de um grupo muito variado, podendo viver de forma filamentosa, em colônias ou manifestando-se de modo unicelular (RIPPKA *et al.*, 1979). Sua reprodução ocorre de modo assexuado por divisão binária ou esporos. Pode ocorrer ainda uma fragmentação em espécies filamentosas, resultando em descendentes idênticos geneticamente, denominados homogônios (STANIER & COHEN-BARIZE, 1977; REVIERS, 2018).

Muitas espécies de cianobactérias são extremófilas, ou seja, conseguem habitar os mais diversos ecossistemas em condições geoquímicas consideradas hostis por outros seres vivos, por possuírem estruturas celulares e mecanismos de adaptação especiais. Há aquelas que são psicrófilas (reproduzindo-se à baixas temperaturas), as termófilas (altas temperaturas), e as halófilas (sobrevivendo em altas concentrações de sal). Em relação ao pH do meio, podem ser neutrófilas, alcalifílicas ou acidófilas. Ainda há aquelas que são resistentes à radiação e outras que são

tolerantes à exposição de metais pesados (MANDAL & RATH, 2014). Desta maneira, temos alguns fatores que influenciam seu desenvolvimento, são eles: a luz, o pH, a temperatura e quantidade de gases dissolvidos no meio (oxigênio, nitrogênio, dióxido de carbono e fósforo).

Este conhecimento abriu margem para estudos com esses microrganismos em um ramo da ciência conhecido como Astrobiologia, que estuda entre muitos tópicos, a possibilidade de existência de vida fora da Terra, baseando-se em bioassinaturas ou marcadores químicos da vida (água e moléculas orgânicas, por exemplo), e também simulando ambientes extraterrestres com estes seres vivos. Um exemplo disto é a recente descoberta de uma espécie extremófila de cianobactéria que consegue viver em ambientes com uma quantidade de luz muito reduzida, sendo possível a hipótese de vida em exoplanetas (planetas fora do Sistema Solar) orbitados por estrelas que emitem muito menos radiação que o sol, assim como estudos que objetivam utilizar cianobactérias para a produção de biocombustível na exploração espacial, sobretudo na ida à Marte (PAULINO-LIMA & LAGE, 2010; KRUYER *et al.*, 2021; CLAUDI *et al.*, 2021).

As cianobactérias são capazes de produzir muitos metabólitos secundários, divididos em classes químicas, são eles: peptídeos (maioria), seguido por alcalóides, então os policetídeos, alcanos, terpenoides, entre outros. Tais metabólitos podem ser tóxicos ou não, sendo os que apresentam toxicidade nomeados cianotoxinas (GADEMANN & PORTMANN, 2008; CHLIPALA *et al.*, 2011).

Destarte, tais metabólitos possuem potencial para diversas aplicações em áreas biotecnológicas, como a agricultura, tratamento de rejeitos e até mesmo nutrição, representando uma alternativa mais ambientalmente correta na produção industrial (SOUZA, 2018).

Apesar de muitas aplicações possíveis, as cianobactérias são motivo de preocupação mundial, e são monitoradas em corpos de água devido as toxinas que produzem. As florações (do inglês *blooms*), como é chamada a reprodução sem controle desses microrganismos resultando em manchas visíveis na água, são ocasionadas devido ao aumento de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, oriundos principalmente de efluentes, resultando em eutrofização. Outro fator contribuinte para essas florações está no aumento da temperatura global e consequente aquecimento das águas (RODRIGUES *et al.*, 2021).



É importante ressaltar que as florações não representam um risco somente pelas cianotoxinas, mas também por causarem o esgotamento do oxigênio da água, ocasionando a morte dos seres que dependem dele, bem como colocam em risco a qualidade da água e comprometem a segurança desta para quem as consome, como seres humanos e outros animais. Tais riscos são potencializados quando as cianobactérias produtoras de cianotoxinas ficam expostas a outros componentes adicionais como agroquímicos, metais na água e até mesmo microplásticos (METCALF & CODD, 2020; CHORUS & WELKER, 2021).

Em 1996, um caso grave de intoxicação por cianotoxinas ocorreu em Caruaru (PE), após o atendimento de pacientes em hemodiálise. Foram 131 pacientes atendidos, todos apresentando sintomas como enjoos e distúrbios visuais, dos quais 100 sofreram insuficiência hepática aguda, e 76 foram a óbito. Após análises de água provenientes da clínica e soro dos pacientes, concluiu-se que houve contaminação por dois tipos de cianotoxinas, sendo a concentração encontrada na água, quase vinte vezes o nível permitido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (CARMICHAEL *et al.*, 2001).

Posto isto, o monitoramento das Florações de Algas Cianobacteriais Nocivas (sigla em inglês, *CyanoHABs*) por órgãos competentes é necessário. A partir deste trabalho é possível elaborar planos de ações, realizar o controle e remediação nas áreas afetadas, fazer a identificação das espécies e das possíveis toxinas produzidas por estes microrganismos (CARMICHAEL, 2012; BRÊDA-ALVES *et al.*, 2021).

Dado o exposto, pode-se afirmar que as cianobactérias são seres de grande relevância ecológica na Terra. Foram um dos primeiros produtores primários existentes, e são as principais responsáveis por fornecerem nitrogênio aos oceanos, sendo a base da cadeia alimentar para esses ecossistemas. Elas ainda servem de fonte de suplementação alimentar, como a *Spirulina sp.*, bem como são estudadas na produção de bioenergia (biodiesel), represando uma alternativa sustentável. Seus metabólitos secundários são um potencial para o desenvolvimento de inseticidas e herbicidas bem como o representam uma fonte para a descoberta de novos medicamentos. Explorar o potencial desses microrganismos é de suma importância para o desenvolvimento científico e também de toda a sociedade (MANDAL & RATH, 2014; FARROKH *et al.*, 2019; ALAGAWANY *et al.*, 2021).

#### 4.2.1 Identificação de espécies: *Sphaerospermopsis torques-reginae*

A espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP-024), produtora de GNT, passou por algumas reclassificações taxonômicas: inicialmente foi inserida por critérios morfológicos no gênero *Anabaena* spp., por possuir “tricomas torcidos com acinetos esféricos adjacentes aos heterócitos”, segundo Werner *et al.*, (2012). Após análises moleculares, todas as espécies deste gênero foram deslocadas para outro gênero, *Dolichospermum* spp. Sua última reclassificação para o gênero *Sphaerospermopsis* spp. ocorreu em razão de uma caracterização polifásica com duas cepas (ITEP-024 e ITEP-026). Foi somente através da análise filogenética e da técnica de sequenciamento do RNA ribossomal (16S rRNA) que pode haver tal afirmação (WERNER *et al.*, 2012).

Entretanto, a discussão acerca da classificação da espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* não chegou ao fim. Cirés e Ballot (2016) questionam a inclusão da espécie no atual gênero, já que ela está mais próxima da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* filogeneticamente do que do gênero *Sphaerospermopsis* spp. (CIRÉS & BALLOT, 2016). Deste modo, nota-se que a classificação de espécies de cianobactérias é algo que está sendo constantemente discutido e avaliado, pois através do sequenciamento genético é possível comparar as espécies analisadas com bases de dados, como o GeneBank, e assim realizar a análise (SHIELS *et al.*, 2019; SALMASO *et al.*, 2022).

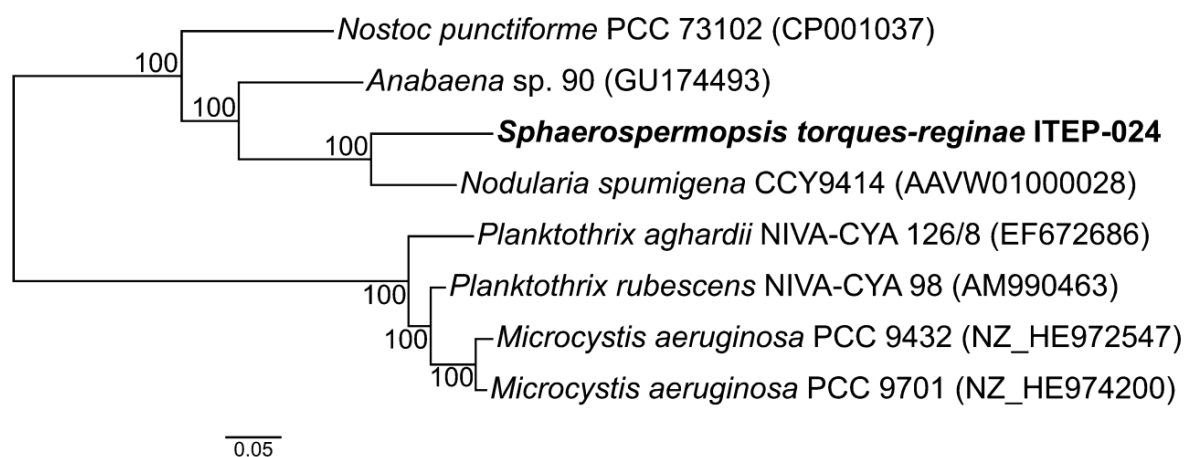


Figura 3. Árvore filogenética da espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP-024) feita pela comparação entre gêneros de cianobactérias alinhada a partir de sequências de nucleotídeos de agrupamentos gênicos da anabenopectina. Fonte: LIMA *et al.*, 2017.

É válido ressaltar que a nomenclatura das cianotoxinas está diretamente relacionada ao gênero de cianobactéria que foi descoberta a estrutura química, como por exemplo, anatoxina-a(s) (atual guanitoxina) foi dado em razão ao gênero *Anabaena spp.*. Deste modo, tem-se discutido uma nomenclatura baseada nos grupos químicos encontrados nas toxinas, e não mais no gênero. Por este motivo, a mudança de anatoxina-a(s) para guanitoxina (grupo guanido presente na estrutura química) ocorreu (FIORE *et al.*, 2020).

Primeiramente identificada como *Anabaena torques-reginae* em ambientes eutrofizados em Cuba a partir de florações (KOMÁREK, 1984), a espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* já foi localizada em países da América do Sul, como Colômbia e Argentina, e até mesmo no Brasil. Sua primeira coleta e identificação no país foi realizada no estado de Pernambuco, no reservatório Tapacurá, em Recife. Molica *et al.*, (2005) identificaram a espécie pela primeira vez no Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP), em que as cepas ITEP-024, ITEP-025 e ITEP-026 receberam as denominações. Entretanto, um equívoco na identificação da espécie ocorreu, e as cepas foram inicialmente identificadas como *Anabaena spiroides*, sendo corrigido somente mais tarde (MOLICA *et al.*, 2005; WERNER *et al.*, 2012).

A espécie é produtora de metabólitos secundários como as micosporinas (MAAs), e alguns peptídeos como as anabenopectinas, spumiginas e namalides. Um estudo de Geraldles *et al.*, (2020) demonstrou pela primeira vez que a espécie é produtora de micosporina-glicina-alanina (MGA), sendo a primeira cianobactéria a ser identificada com essa produção (GERALDES *et al.*, 2020). Além disso, estudos demonstraram a identificação da produção de guanitoxina pela espécie através de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a diferentes detectores (DÖRR *et al.*, 2010; RODRIGUEZ *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2020).

Sanz *et al.*, (2015) reportaram pela primeira vez a produção de quatro novos congêneres de spumigina pela espécie. Outro estudo de Sanz *et al.*, (2017) identificou a produção de namalides B e C, bem como a produção de spumigina K-N pela mesma cepa. Lima *et al.*, (2017) identificaram os agrupamentos dos genes relacionados à família spumigina e anabenopectinas na cepa ITEP-024 (SANZ *et al.*, 2015; SANZ *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2017).

Vale evidenciar que a espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* não é a única produtora de guanitoxina (GNT), também temos algumas espécies do gênero

*Dolichospermum* spp. (*D. flos aquae*, *D. lemmermannii*, *D. spiroides*, *D. crassa*) que produzem esta cianotoxina (KAAS & HENRIKSEN, 2000; MONSERRAT *et al.*, 2001; BECKER *et al.*, 2010; METCALF *et al.*, 2018), bem como os gêneros *Aphanizomenon* sp. e *Cuspidothrix* sp. são potenciais produtores desta neurotoxina (LIMA *et al.*, 2022).

*Sphaerospermopsis torques-reginae* é uma espécie importante quanto o monitoramento de corpos de água por formar florações e produzir GNT, toxina muito polar capaz de causar efeitos muscarínicos como salivação excessiva e incontinência urinária, bem como efeitos nicotínicos como paralização dos músculos respiratórios em mamíferos (Figura 2) (MAHMOOD *et al.*, 1988; COOK *et al.*, 1991). Há poucos trabalhos na literatura sobre os metabólitos que a espécie produz, bem como há um baixo monitoramento da produção de GNT em comparação a outras cianotoxinas, por este motivo, é necessária uma maior investigação.



Figura 4. Morfologia da espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae*. Fonte: WERNER *et al.*, 2012.

### 4.3 Cianotoxinas

Um dos principais metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias são as cianotoxinas, compostos químicos capazes de ocasionar efeitos adversos em muitos organismos, inclusive em animais. E apesar da elucidação da estrutura química de muitas cianotoxinas já ter sido bem estudada, suas funções fisiológicas

ainda não foram totalmente compreendidas (KAEBERNICK & NEILAN, 2001; CHORUS & WELKER, 2021).

De acordo com o mecanismo de ação, as cianotoxinas podem ser classificadas em: neurotóxicas (compostos químicos de ação rápida no sistema nervoso, causando seu mal funcionamento, como a anatoxina-a, homoanatoxina-a, saxitoxinas e a guanitoxina), dermatotóxicas (substâncias que reagem com proteínas da pele, causando irritações primárias ou penetrando na corrente sanguínea, e causando até gastroenterite, como as toxinas lipopolissacarídicas - LPSs), hepatotóxicas (compostos que causam danos no fígado, como as microcistinas e nodularinas), e finalmente as citotóxicas (substâncias capazes de causar dano celular ou impedir sua proliferação, como a cilindrospermopsina) (VAN APELDOORN *et al.*, 2007; BORTOLI & PINTO, 2015).

De acordo com as classes químicas, podem ser peptídeos cíclicos (que são provenientes da ligação de dois ou mais aminoácidos, como a microcistina e a nodularina), alcalóides (que são aminas cíclicas, como a guanitoxina, anatoxina-a, homoanatoxina-a, cilindrospermopsina e saxitoxinas), terpenoides (grupo mais diverso), entre outros (TILLET *et al.*, 2000; NICHOLSON & BURCH, 2001; VAN APELDOORN *et al.*, 2007; BORTOLI & PINTO, 2015; LUDWICZUK *et al.*, 2017).

Ainda são desconhecidos todos os mecanismos bioquímicos de produção das cianotoxinas. Todavia, estudos mostram que fatores ambientais afetam tal produção, como pH do meio, luz solar e quantidade de nutrientes absorvidos por estes microrganismos. (CARMICHAEL, 1996; RASTOGI *et al.*, 2014).

Embora as cianobactérias estejam distribuídas em praticamente todos os ecossistemas do planeta e serem consideradas um dos primeiros seres vivos existentes, é desconhecido a primeira ocorrência de intoxicação em humanos. Todavia, há possíveis relatos de florações de fitoplâncton em documentos como a Bíblia Sagrada dos Cristãos, referente à primeira praga do Egito, em que as águas do rio ganharam coloração avermelhada, fenômeno conhecido como maré vermelha (CARMICHAEL, 1992, VALENZUELA *et al.*, 2011; BÍBLIA, 2022).

Os casos de intoxicação por cianotoxinas tiveram um aumento a partir dos anos 2000, considerando o número de publicações sobre tais toxinas, o que mostra um maior interesse nessas análises toxicológicas. Um estudo revelou que de 1118 registros das mais citadas cianotoxinas em 66 países, as microcistinas foram as que tiveram um maior número, seguidas da cilindrospermopsina, anatoxinas, saxitoxinas,

e finalmente as nodularinas (casos mais raros). Em relação à distribuição de casos por continentes, o maior registro de envenenamento por cianotoxinas foi na América do Norte e América Central, seguido de Austrália e Nova Zelândia, sendo o menor número de registros feitos na Ásia e América do Sul (SVIRČEV *et al.*, 2019).

Considerando que muitas cianobactérias produzem toxinas que podem afetar a saúde humana e de outros animais, e levando em consideração o aumento do nível de poluição em corpos de água devido a descarga de efluentes, são necessários cada vez mais investimentos para que as agências de inspeção e pesquisadores consigam identificá-las no ambiente através de testes padronizados (CARMICHAEL, 1996; RODRIGUES *et al.*, 2021).

#### **4.4 Guanitoxina**

A guanitoxina (GNT) é um alcaloide, classificado como neurotoxina por seu mecanismo de ação, sendo uma molécula polar, de baixo peso molecular (252.211 g/mol) e instável em soluções básicas (Figura 3) (HARADA *et al.*, 1991; ONODERA *et al.*, 1997; FERNANDES *et al.*, 2020).

A produção desta cianotoxina foi primeiramente observada na espécie *Anabaena flos aquae* (atual *Dolichospermum flos aquae*) em um lago no Canadá, em 1965. Carmichael e Gorham (1978) a nomearam anatoxina-a(s) em razão do gênero em que foi descoberta, *Anabaena spp.*, bem como por apresentar mesma dose letal e tempo de sobrevivência que a anatoxina-a em animais testados, com o diferencial de causar severa salivação (por isso a letra “s” ao final do nome) (CARMICHAEL & GORHAM, 1978).

O nome da cianotoxina foi alterado para guanitoxina por esta molécula apresentar o grupo guanidino em sua estrutura (FIORE *et al.*, 2020). Esta proposta de classificação para a GNT é a mais adequada, pois baseia-se na estrutura química da molécula.

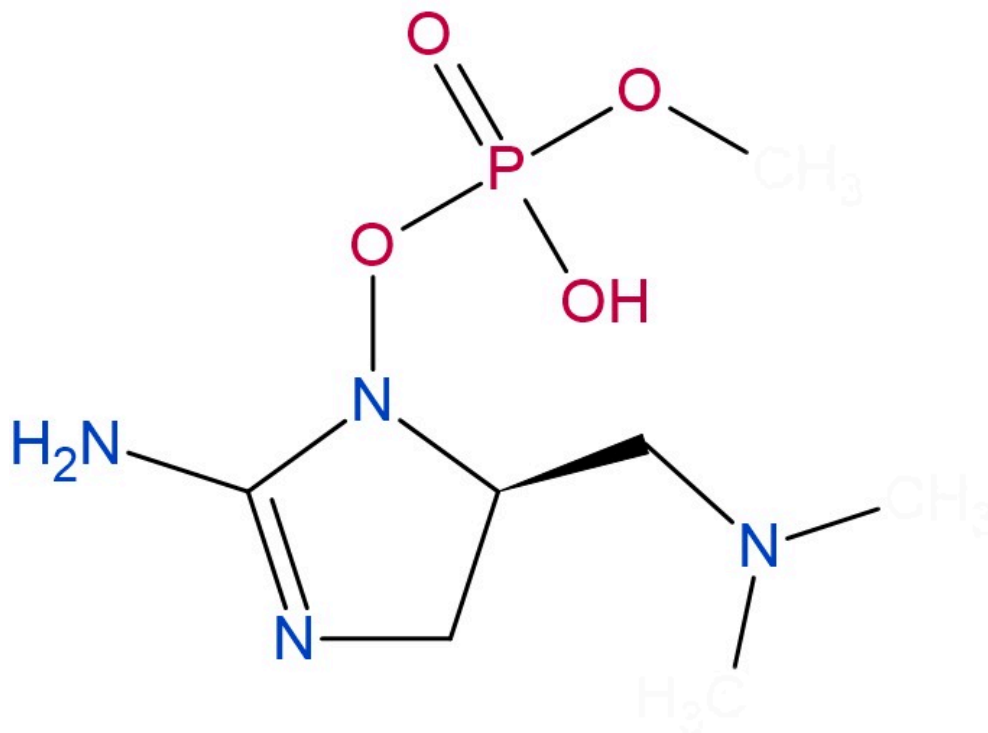


Figura 5. Estrutura química da molécula de GNT destacando o grupo guanidino (de azul) e o grupo fosfato (de vermelho), de acordo com Fiore *et al.*, 2020; ChemSpider, 2023. – Imagem elaborada pela autora e colaboradores (2023).

Desde a primeira espécie de cianobactéria produtora de GNT descoberta, muitas outras espécies já foram identificadas essa produção, como a *Dolichospermum lemmermannii*, *Dolichospermum spiroides*, *Sphaerospermopsis torques-reginae* e *Dolichospermum crassa* (HENRIKSEN *et al.*, 1997; MONSERRAT *et al.*, 2001; MOLICA *et al.*, 2005; BECKER *et al.*, 2010). Os gêneros *Aphanizomenon sp.* e *Cuspidothrix sp.* São potenciais produtores de guanitoxina, de acordo com trabalho realizado por LIMA e colaboradores (2022), identificado através da bioinformática pela análise genética.

Do mesmo modo, muitos países do mundo já identificaram cepas produtoras de GNT de diversas espécies em lagos, rios e reservatórios, dentre eles, Canadá, Estados Unidos, Dinamarca, Suécia, Brasil, Nigéria e Catar (CARMICHAEL & GORHAM, 1978; MAHMOOD *et al.*, 1988; HENRIKSEN *et al.*, 1997; WILLÉN & MATTSSON, 1997; MONSERRAT *et al.*, 2001; ODOKUMA & ISIRIMA, 2007; METCALF *et al.*, 2012).





efeitos nicotínicos são aqueles que resultam de uma hiperatividade do sistema nervoso simpático. Os observados em animais que ingeriram ou foram administrados GNT, são: fasciculações, paralisia dos músculos respiratórios e taquicardia (COSTA, 1988, MAHMOOD *et al.*, 1988; KAAS & HENRIKSEN, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação observado na GNT é característico de organofosforados e carbamatos, inseticidas mais utilizados no mundo. Por ser o único organofosforado natural conhecido, a molécula de GNT possui um grande potencial biotecnológico e no desenvolvimento de novos medicamentos (RODRIGUEZ, 2006; SILVA, 2012). Um estudo de Cook *et al.*, (1990) sugeriu que a GNT não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (COOK *et al.*, 1990), bem como a neostigmina, medicamento utilizado no tratamento de miastenia gravis (SCIACCA *et al.*, 2018), configurando um potencial fármaco para essa condição.

Em relação ao tratamento em casos de intoxicação, a atropina é a droga mais utilizada para controle dos efeitos muscarínicos. Já para uma síndrome colinérgica, além da administração da atropina, é necessário fármacos que reativem a enzima acetilcolinesterase, como a obidoxima e a pralidoxima (2-PAM) (FOSSIER *et al.*, 1983; SANTOS, 2009; SAVALL *et al.*, 2018). Alguns estudos testaram diferentes drogas em animais para efeito de comparação com a GNT, como é o caso dos fármacos fisostigmina, piridostigmina e neostigmina (inibidores da acetilcolinesterase) e também dos inseticidas paraoxon, diclorvos e carbaryl. Os fármacos utilizados para reverter o efeito da GNT nos animais foram a atropina, pralidoxima (2-PAM) e TMB4, como mostrado na tabela 1 (MAHMOOH & CARMICHAEL, 1986; COOK *et al.*, 1988; HYDE & CARMICHAEL, 1991; PARRIS *et al.*, 2000).

Tabela 1. Drogas administradas em animais para comparação ou tratamento da guanitoxina, de acordo com seu efeito. (continua)

<b>Drogas testadas</b>	<b>Classificação</b>	<b>Efeito</b>	<b>Animais testados</b>	<b>Autores</b>
Fisostigmina	Inibidor reversível da AcHE	Parassimpatico mimético	Ratos	Cook et al (1988); Hyde & Carmichael (1991)
Piridostigmina	Inibidor reversível da AcHE	Parassimpatico mimético	Ratos	Cook et al (1988); Cook et al (1991)
Neostigmina	Inibidor reversível da AcHE	Parassimpatico mimético	Camundongos e ratos; peixes; baratas	Mahmood & Carmichael (1986); Metcalf (2018); Santos et al (2019)
Paraoxon	Inseticida organofosforado	Parassimpatico mimético	Ratos	Cook et al (1988); Cook et al (1989b); Cook et al (1991)
Diclorvos	Inseticida organofosforado	Parassimpatico mimético	Tecido cerebral de Peixes e atividade enzimática de caranguejo	Parris et al (2000)

Tabela 1. Drogas administradas em animais para comparação ou tratamento da guanitoxina, de acordo com seus efeitos. (conclusão)

<b>Drogas testadas</b>	<b>Classificação das drogas</b>	<b>Efeitos das drogas</b>	<b>Animais testados</b>	<b>Autores</b>
Carbaryl	Inseticida carmabato	Parassimpatico mimético	Tecido cerebral de Peixes e atividade enzimática de caranguejo	Parris et al (2000)
Atropina	Antagonista muscarínico	Parassimpatolítico	Ratos, patos, porcos, boi	Mahmood & Carmichael (1986); Cook et al (1989a); Cook et al (1990); Hyde & Carmichael (1991)
Pralidoxima (2-PAM)	Oxima	Reativação da AcHE	Ratos	Hyde & Carmichael (1991)
TMB4	Oxima	Reativação da AcHE	Ratos	Hyde & Carmichael (1991)

Legenda: As drogas fisostigmina, piridostigmina e neostigmina, bem como os inseticidas paraoxon, diclorvos e carbaryl foram testados em razão dos seus efeitos parassimpaticomiméticos em comparação com a molécula de GNT. Já os fármacos atropina, pralidoxima e TMB4 foram utilizados devido seu efeito reverso na síndrome colinérgica no tratamento de intoxicação por GNT.

É válido ressaltar que a GNT apresentou capacidade inibitória e irreversibilidade da inibição das colinesterases tão quanto o paraoxon, que é um dos organofosforados sintéticos mais potentes disponíveis (COOK *et al.*, 1991). Além disso, estudos revelaram que ratos testados com GNT apresentaram efeitos clínicos

iguais ou por maior tempo do que aqueles testados com paraoxon, salicilato de fisostigmina, brometo de piridostigmina (COOK *et al.*, 1988; COOK *et al.*, 1991).

Estudos mostraram que a dose letal de GNT em ratos é de aproximadamente 60 mg/kg e a dose letal mediana (LD50) fica entre 40-60 µg/kg. O tempo de vida nos animais testados variou entre 4 minutos até 1 hora (CARMICHAEL & GORHAM, 1978; MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986).

Sobre a biossíntese da GNT, o estudo de Moore *et al.*, (1992), foi o primeiro a descrever a origem dos carbonos da molécula, que foram derivados da L-arginina. Em seguida, o estudo de Hemscheidt *et al.*, (1995), diferenciou possíveis mecanismos de biossíntese da GNT, em que a (2S,4S)-4-Hidroxiarginina é um intermediário oriundo da L-arginina. Ambos estudos realizaram seus achados através da técnica analítica de HPLC. Moura e Pinto., (2010) realizaram um estudo por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para estabelecer a rota para a síntese da cadeia alquila que está presente nas anatoxinas, além disso objetivaram desenvolver uma síntese de um 2,3-diaminoácido que pode ser um potencial intermediário na síntese da guanitoxina (MOORE *et al.*, 1992; HEMSCHEIDT *et al.*, 1995; MOURA & PINTO, 2010).

O estudo de LIMA *et al.*, (2022) descreveu tanto o conjunto de genes relacionados com a biossíntese da GNT quanto a via metabólica em nove etapas detalhadas a partir da L-arginina. Este trabalho abre caminhos para o monitoramento de genes biossintéticos e ambientais, bem como a detecção da GNT em escala global (LIMA *et al.*, 2022).

Ainda não há um teste de padrão analítico para a detecção da molécula de GNT. Os estudos mais recentes confirmam sua presença nas amostras através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC, no inglês) acoplada ao espectrômetro de massa (SANTOS *et al.*, 2019; FERNANDES *et al.*, 2021; PASSOS *et al.*, 2022).

Outros estudos buscaram indícios da GNT em florações de cianobactérias através de testes não específicos, como o ensaio colorimétrico *in vitro* da acetilcolinesterase (AChE) e também através de bioensaios em animais (YUNES *et al.*, 2003; BECKER *et al.*, 2010; CHATZIEFTHIMIOU *et al.*, 2014). Todavia, não se pode confirmar a presença da molécula através destes últimos em razão de serem testes indiretos, ou seja, baseiam-se nos sintomas manifestados dos organismos testados ou na inibição da AChE.

De todas as cianotoxinas de água doce, a guanitoxina é a mais potente, entretanto a menos monitorada. É necessário o estabelecimento de um padrão ouro para sua detecção em amostras para que agências de vigilância sanitária e grupos de pesquisa independentes possam identificá-la com mais facilidade, e assim estabelecer protocolos de segurança nas áreas contaminadas, visando a prevenção de florações e mantendo a qualidade da água a níveis considerados seguros para consumo (FIORE *et al.*, 2020; BRÊDA-ALVES *et al.*, 2021).

#### **4.5 Métodos de detecção**

A microscopia ótica não é capaz de diferenciar populações produtoras ou não produtoras de cianotoxinas que habitam o mesmo ambiente. E mesmo os métodos mais inovadores utilizados não são capazes de identificar todas as variantes de cianotoxinas. Esses desafios dificultam o monitoramento destas toxinas na água e implicam o seu controle de qualidade. Há diversos métodos de detecção de cianotoxinas: os ensaios biológicos, biosensores, métodos analíticos e métodos moleculares, diferenciando-se principalmente na sensibilidade da técnica (KAUSHIK & BALASUBRAMANIAN, 2013; SANSEVERINO *et al.*, 2017).

Os ensaios biológicos baseiam-se nos efeitos fisiológicos e tóxicos dos organismos ou tecidos testados, proporcionando uma triagem fácil e rápida. Em relação às microcistinas, cianotoxinas mais comumente detectadas, esse tipo de detecção ainda pode ser classificado em três categorias. Há os bioensaios com o organismo vivo, geralmente realizado em camundongos, em que o extrato da toxina é administrado intraperitonealmente no animal, sendo o teste considerado qualitativo, sem fornecer a confirmação da toxina (KAUSHIK & BALASUBRAMANIAN, 2013; GAGET *et al.*, 2017).

Há também os ensaios bioquímicos, que se baseiam na inibição de enzimas essenciais no tecido do organismo testado, servindo como medida da concentração das toxinas analisadas. Uma desvantagem do método, apesar de sensível, é que essas proteínas não estão disponíveis à comercialização, o que torna sua preparação muito complexa e de alto custo. É válido ressaltar que o ensaio colorimétrico da proteína fosfatase, tipo de ensaio bioquímico, correlaciona-se muito bem com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), gerando um ensaio com grande sensibilidade (CODD *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2014).

Finalmente há os ensaios imunológicos (testes bioquímicos que medem a concentração de uma substância em uma amostra a partir da reação de anticorpos). Esses ensaios foram importantes principalmente no que diz respeito a detecção de cianotoxinas em amostras ambientais, sendo padrão pela OMS na detecção de microcistinas. Como exemplo de ensaios imunológicos temos ELISA e cromatografia de imunoafinidade (NICHOLSON & BURCH, 2001; BORTOLI, 2011).

Além dos ensaios biológicos mencionados, há a tecnologia baseada em biosensores que foi desenvolvida com o intuito de realizar uma triagem rápida para detecção de cianotoxinas. Essa tecnologia pode ser associada a um imunossensor. Devic *et al.*, (2002) desenvolveram um sensor amperométrico contendo enzimas mutantes de acetilcolinesterase para aumentar a sensibilidade de detecção da guanitoxina, chegando a níveis abaixo de nanomol por litro (nmol/L) (DEVIC *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2018; VOGIAZI *et al.*, 2019).

Outros métodos diretos para detecção de cianotoxinas são os métodos analíticos, que realizam a detecção de grupos funcionais presentes nas estruturas das cianotoxinas através de propriedades físico-químicas. Há muitas técnicas, todavia as mais utilizadas são: os métodos analíticos de separação (cromatografia e eletroforese), métodos de detecção (UV, Fluorescência e espectrometria de massa) e espectrometria de massa por ionização com dessorção à laser assistido por matriz e analisador de tempo de Voo (MALDI-TOF-MS, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) (KAUSHIK & BALASUBRAMANIAN, 2013; AL-SAMMAK *et al.*, 2013).

Dentre os métodos analíticos utilizados, a cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massa (HPLC-MS) foi capaz de reduzir o limite de detecção da análise em aproximadamente 5 vezes, aumentando sua sensibilidade. Esse método foi inicialmente realizado para o estudo de saxitoxinas em mariscos, todavia tem sido utilizado na avaliação de outras cianotoxinas (BARBOSA, 2009).

Os métodos moleculares baseiam-se na detecção de cianobactérias produtoras de cianotoxinas de acordo com o DNA de cada espécie, e diferentemente dos citados anteriormente, são métodos indiretos. Em outras palavras, analisa-se o cluster de genes da biossíntese de uma cianotoxina específica. Esses métodos são vantajosos, dentre muitos fatores, por não haver a necessidade de cultivar a espécie analisada. Um aliado aos métodos moleculares é a bioinformática, cada vez mais utilizada no monitoramento ambiental. Como exemplo de métodos moleculares

temos a PCR, PCR em tempo real e a técnica de microarray (BAKER *et al.*, 2002; MANKIEWICZ-BOCZEK *et al.*, 2006; PEARSON *et al.*, 2008).

Ainda não há um padrão analítico para a identificação da GNT devido suas características químicas, principalmente no que diz respeito sua instabilidade em meio alcalino e em altas temperaturas. O que dificulta sua purificação e padronização para fins comerciais (FERNANDES *et al.*, 2021). Deste modo, diversos estudos utilizam técnicas diferentes para detectar a presença da neurotoxina.

Alguns trabalhos sobre a guanitoxina realizaram testes de inibição da acetilcolinesterase (AChE) por método colorimétrico (HENRIKSEN *et al.*, 1997; BARROS *et al.*, 1998; PARRIS *et al.*, 2000; YUNES *et al.*, 2003; METCALF *et al.*, 2012; CHATZIEFTHIMIOU *et al.*, 2014; METCALF *et al.*, 2018), a partir do trabalho de Ellman e colaboradores (1961), e/ou bioensaios para observação dos sintomas nos organismos testados (CARMICHAEL & GORHAM, 1978; WILLÉN & MATTSSON, 1997; KAAS & HENRIKSEN, 2000; MONSERRAT *et al.*, 2001; MOLICA *et al.*, 2005; ODOJUMA & ISIRIMA, 2007; BECKER *et al.*, 2010). Todavia esses testes não são específicos e não se pode concluir que há GNT na amostra apenas a partir destes.

O método mais confiável atualmente para a confirmação da GNT em amostras é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa (HPLC-MS), em que é utilizado a presença da massa/carga ( $m/z$ ) para tal confirmação (FERNANDES, 2020; DÖRR *et al.*, 2010; PASSOS *et al.*, 2022). E a determinação de sua fórmula molecular foi inicialmente deduzida por ressonância magnética nuclear (RMN) (ONODERA *et al.*, 1997).

Além das cianotoxinas terem o potencial de causar morte súbita em animais, a bioacumulação destas toxinas configura uma ameaça crescente em organismos aquáticos, sendo possível a transferência através da cadeia alimentar. É importante a realização de trabalhos que foquem em uma detecção mais seletiva, rápida e de baixo custo dessas toxinas ainda no início das florações para evitar sua proliferação em massa (SANSEVERINO *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2022; PASSOS *et al.*, 2022).

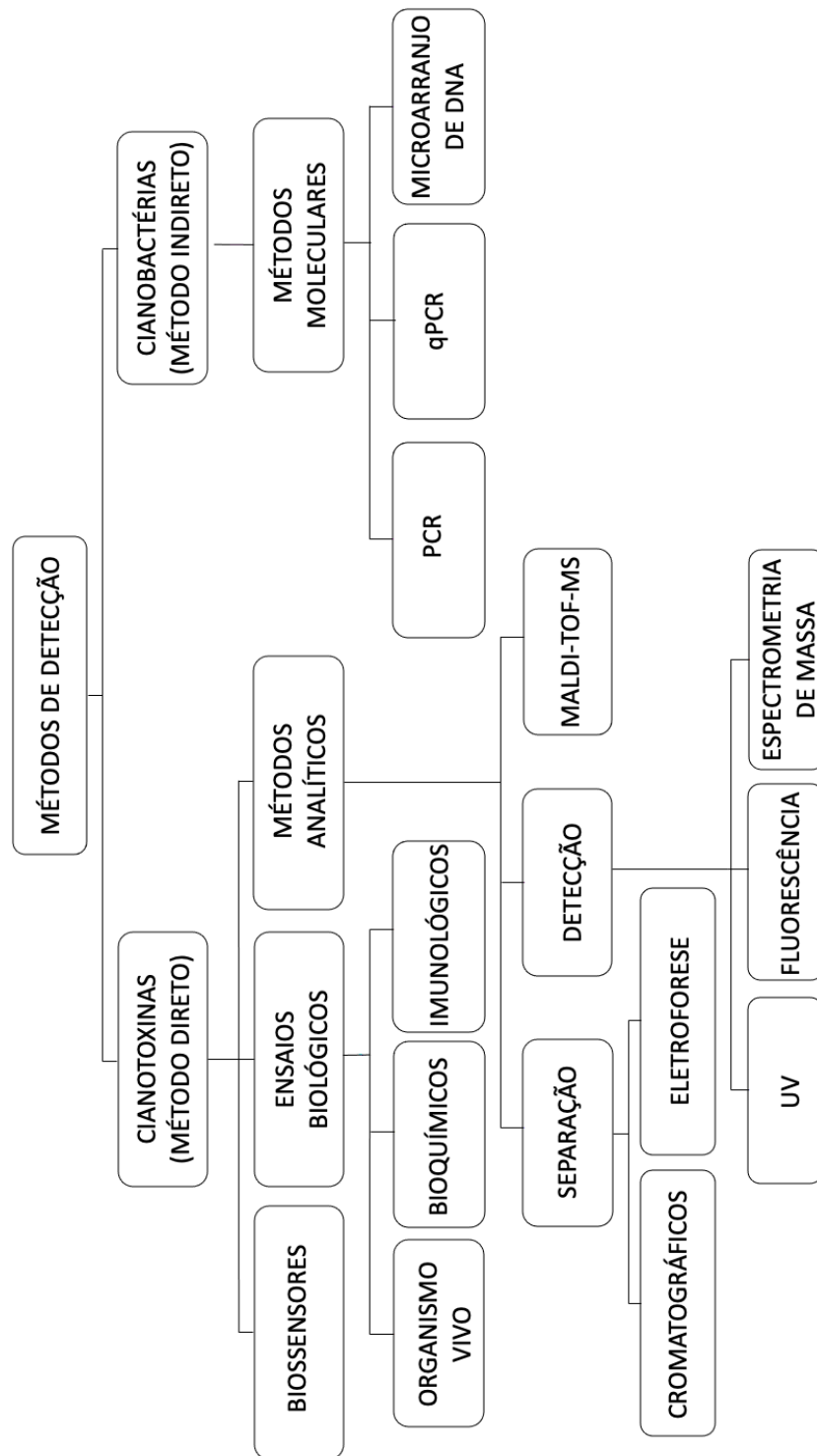


Figura 7. O fluxograma refere-se aos métodos diretos e indiretos para detecção de cianotoxinas. – Imagem elaborada pela autora (2023). Adaptada de Kaushik & Balasubramanian, 2013.





## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Cultivo da cepa ITEP-024 e produção de biomassa

Para este estudo, foi analisada a espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024), já isolada (MOLICA *et al.*, 2005) e mantida em culturas não axênicas no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA-USP). A cepa foi cultivada nas seguintes condições de controle: pH de 7,4 no meio BG-11, à uma temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; fotoperíodo de 12:12 em intensidade de  $40 \mu\text{mol.fotons.ms}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , sem aeração ou agitação. A cada 20 dias, as culturas eram interrompidas e centrifugadas (10.000 RPM, à  $4^\circ\text{C}$ , por 15 minutos – condições que foram utilizadas em todas as análises, HIMAC – CR 21GII, Japan) para concentrar as células e obter-se a biomassa. O período de 20 dias foi escolhido para a obtenção da biomassa devido ao crescimento celular estar no final de sua fase exponencial (aumento evidenciado do número de microrganismos na cultura) (GERALDES, 2019).

Após a etapa de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet congelado por 24 horas, e em seguida, submetido ao processo de liofilização de 4 à 5 dias (Vaccum 11.250 mBar. LABCONCO, FreeZone 4.5 Liter Benchtop Freeze Dry System, U.S. and Canada). O material liofilizado foi congelado para posteriores análises (FERNANDES, 2020). Optou-se pelo material liofilizado para obter a exata concentração de biomassa no extrato aquoso utilizado no bioensaio com *Tuta absoluta* (biomassa por volume de água, mg/L).



Figura 8. Culturas não axênicas da cepa ITEP-024 em condições controladas de laboratório. Foto elaborada pela autora (2023).

## **5.2 Microscopia eletrônica de varredura da cepa ITEP-024**

As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky por um período de 6 horas e, em seguida, aderidas a lamínulas de vidro utilizando poli-L-lisina. Para a desidratação, empregou-se uma série de concentrações de etanol variando de 30% a 100%. As amostras foram submetidas à secagem crítica no equipamento LAICA EM CPD300, seguida da montagem em suportes de alumínio utilizando fitas duplas carbonatadas e revestidas com uma fina camada de ouro por meio do sputter coater Baltec SCD050. As amostras preparadas foram observadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo JEOL IT300, e as imagens resultantes foram registradas digitalmente.

## **5.3 Detecção de guanitoxina por análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)**

### **5.3.1 Reagentes utilizados no LC-MS**

Foram utilizados ácido fórmico, formiato de amônio, acetonitrila e água ultrapura, Mili-Q (Milipore). Todos os reagentes foram de grau analítico e alta pureza, Merk (Sigma-Aldrich, Alemanha) e JT Baker (Phillipsburg, EUA).

### **5.3.2 Preparo da biomassa da cepa ITEP-024 para confirmação de GNT (LC-MS)**

A GNT é mais estável em soluções ácidas (pH entre 1,5 e 5,0), sendo o pH de 3,0 mais adequado para extração em soluções aquosas (FERNANDES, 2020). Deste modo, para a extração da biomassa liofilizada (5mg em triplicata) e confirmação da GNT foi utilizada água acidificada (ácido fórmico 0,1% e formiato de amônio 2mM, pH 3,05). Para o rompimento da célula, as amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto e ficaram em repouso durante 1h em temperatura ambiente (22 °C). Após esse tempo, amostras foram agitadas em vórtex novamente, e centrifugadas por 10 minutos (10.000 RPM, 5°C, Centrífuga Eppendorf 5415 R). Em seguida, foram filtradas (PVDF de 0,22 µm, Analytical) e transferidas para um vial. Estas foram analisadas no equipamento Triplo Quadrupolo LC-MS. A biomassa foi utilizada como controle positivo para confirmação da GNT em todas as amostras do estudo (adaptado de GERALDES *et al.*, 2020).

### 5.3.3 Detecção de GNT na biomassa da cepa ITEP-024 (LC-MS)

Para detecção de GNT, utilizou-se cromatografia líquida (série 1290 equipada com bomba 1290 VL e injetor 1260 HiP ALS) acoplada a um espectrômetro de massas (Agilent Technologies; 6460 Triplo Quadrupolo). A fonte de ionização utilizada foi por Electrospray (ESI), e a coluna utilizada para separação cromatográfica foi Synergi 4 $\mu$  Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) (Phenomenex, EUA), à temperatura de 30 °C, com vazão de 0,4 ml/min. Os eluentes A utilizados foram: água, ácido fórmico 0,1% e 2mM de formiato de amônio, com ajuste de pH para 3,05. Os eluentes B utilizados foram acetonitrila/H<sub>2</sub>O – 8:2 e ácido fórmico 0,1%. A proporção dos eluentes ocorreu de acordo com o tempo de corrida, que foi de 12 minutos: do tempo inicial até 2 minutos, utilizou-se 100% de A. De 2 até 4 minutos, utilizou-se um gradiente linear para B até 95%. Após 1,5 minuto a 95% de B, o eluente A alcançou 100% em 0,5 minutos e mantido por 4 minutos (reequilíbrio da coluna até a próxima injeção). O tempo de 6 minutos até o final da análise foi utilizado para os resíduos GERALDES *et al.*, 2020).

O software MassHunter Workstation B.04.01 (Agilent Technologies, EUA) operou o equipamento Triplo Quadrupolo. A seleção do precursor e do íon produto, e a otimização das energias de colisão foram realizadas com injeção em fluxo de soluções padrão, e o programa MassHunter Optimizer foi utilizado para esta análise (PASSOS *et al.*, 2022).

Na espectrometria de massas, as condições utilizadas no equipamento foram as seguintes (tabela 2):

Tabela 2. Parâmetros utilizados para determinação de guanitoxina em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).

Parâmetros	Valores
Temperatura do gás de secagem (N <sub>2</sub> )	300°C
Fluxo do gás de secagem	12ml/min
Pressão do nebulizador	45psi
Temperatura do gás de revestimento (N <sub>2</sub> )	350°C
Fluxo de gás de revestimento	10ml/min
Tensão capilar	3500V
Tensão do bico	500V
Energia de colisão	30V
Volume de injeção	10µL
Tempo total de corrida	12 minutos

O Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) foi realizado em modo positivo para detecção de GNT, identificada por seus íons característicos (transições)  $m/z$  253>58 [M+H]<sup>+</sup> e  $m/z$  253>159 [M+H]<sup>+</sup> (DOOR *et al.*, 2010; GERALDES *et al.*, 2020). As análises dos dados foram realizadas pelo programa MassHunter (Agilent Technologies, EUA).

#### 5.4 Preparo dos extratos aquosos da cepa ITEP-024 para o bioensaio com *Tuta absoluta*

Para obtenção dos extratos aquosos com diferentes concentrações de células liofilizadas da cepa ITEP-024, a biomassa liofilizada foi extraída três vezes com água (ultrapura Mili-Q, Milipore) em vórtex por 2 minutos, ultrassom com sonda por 10 minutos e centrifuga por 10 minutos, 4°C, 10000 RPM. Na última extração, foi realizado apenas o vórtex e a ultrassom (GERALDES *et al.*, 2020). Foram utilizados 15,625 mg, 31,25 mg e 62,5 mg de biomassa para cada concentração, respectivamente (62,5 mg/L; 125 mg/L e 250 mg/L). Utilizou-se volume padrão de água de 250mL em todos os extratos aquosos para realização do bioensaio. A escolha da extração com água e os valores das concentrações foram determinados para simular contaminações no ambiente por cianobactérias em concentrações de relevância ambiental, e também pela guanitoxina ser uma molécula polar (PASSOS

et al., 2022). É válido ressaltar que a biomassa foi extraída apenas para causar rompimento celular, e que nenhuma parte da amostra foi descartada neste processo.

## 5.5 Avaliação do potencial inseticida dos extratos aquosos da cepa ITEP-024

### 5.5.1 Criação de *Tuta absoluta*

Os insetos utilizados foram provenientes da criação de *Tuta absoluta*, estabelecida no Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ/USP. Estes foram alimentados com dieta natural, seguindo metodologia adaptada de Bajonero e Parra (2017). Utilizou-se lagartas recém-eclodidas, mantidas em gaiolas de acrílico, 70 x 50 x 50 centímetros com ambiente controlado (temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ , umidade relativa de  $60\% \pm 10$  e fotoperíodo de 14:10). Fez-se a verificação diária dos insetos adultos recém-emergidos, que foram transferidos para outra gaiola objetivando sua cópula e postura. Foram mantidos folíolos de tomateiro “Santa Clara” para otimizar a coleta dos ovos (adaptado de BENTO, 2017 e SOUZA, 2022).

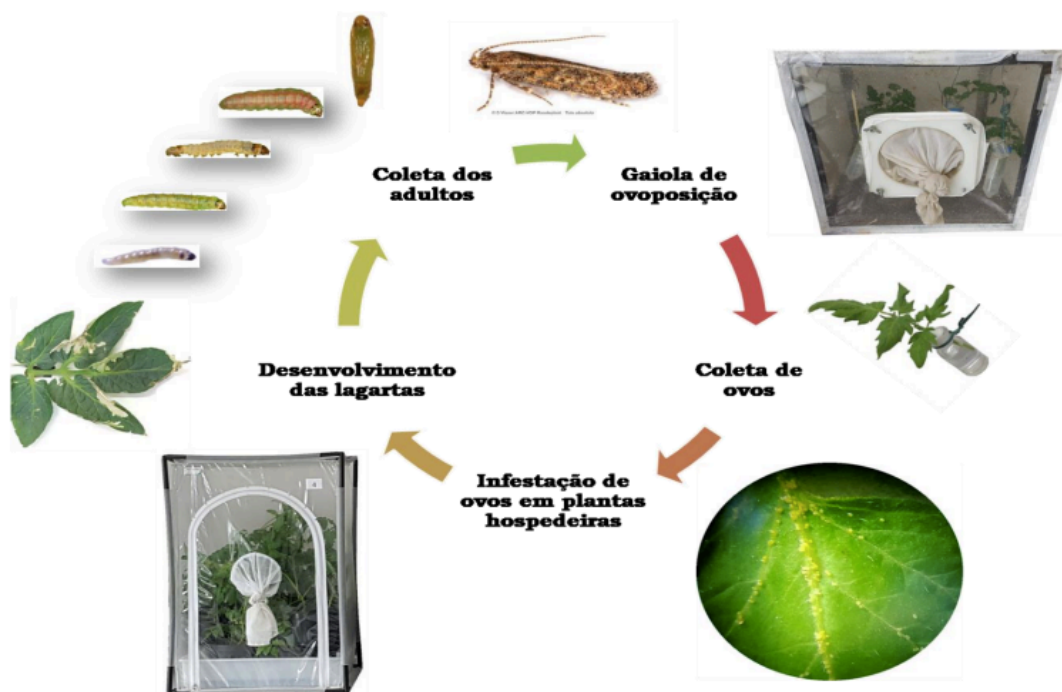


Figura 9. Esquema das etapas de manutenção da população de *Tuta absoluta* em condições controladas de laboratório. Fonte: SOUZA, 2022.

### 5.5.2 Cultivo da *Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM

A espécie de planta utilizada no experimento foi a *Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM. As sementes foram distribuídas em bandejas com células individualizadas. Foram feitas 60 sementeiras para obter-se uma média de 35 plantas para o experimento. Para o substrato, foi utilizado NPK e calcário na proporção 1:1, 4g/L. Foi feito 4L para este experimento e misturado com vermiculita na proporção de 1:1. Foi acrescentado água nas bandejas após a inoculação das sementes. As bandejas foram levadas para uma câmara climática do tipo fitotron, em umidade ( $70\% \pm 10$ ), temperatura ( $24^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) e fotoperíodo (14:10) controlados (LOMBARDI, 2008).

Após 5 dias, foi feito o transplante das bandejas para vasos de 150ml. Em seguida, os vasos foram colocados na câmara climática e as plantas permaneceram por mais 20 dias para crescimento. Após esse período, foram coletadas e levadas para uma sala de luz com temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $60\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (14:10) controlados. As plantas foram colocadas em uma câmara úmida (caixa) 24 horas antes do experimento para que houvesse abertura máxima dos estômatos (adaptado de BENTO, 2017).

### 5.5.3 Bioensaio no estágio larval

Para a realização do bioensaio com a *Tuta absoluta* no estágio larval (L1), foi preparado extratos aquosos (já descrito) contendo a cepa ITEP-024 (nas concentrações de 62,5 mg/L; 125 mg/L e 250 mg/L). Para controle positivo foi utilizado inseticida sintético malation 500 Ce diluído na concentração especificada pelo fabricante (3ml/L) e para controle negativo foi utilizado água ultrapura. Foi adicionado a estes 5 tratamentos o adjuvante tween 80 (0,03% do volume utilizado). Para cada tratamento, fez-se 7 repetições (N=35). A pulverização nas plantas cultivadas de micro-tomateiro foi feita utilizando um aerógrafo a uma pressão de 2 kgf/cm<sup>2</sup>, a uma distância de 25cm, braço posicionado a 90°, rotação de 3,5 voltas para que toda as folhas fossem cobertas pelos tratamentos. O volume para cada planta utilizada na pulverização foi de 5ml. Após a pulverização, foi inoculado as lagartas já eclodidas em cada planta. Utilizou-se 6 lagartas por planta, inoculando 1 lagarta por folíolo (3 de um lado da planta e 3 do lado oposto). As plantas ficaram sob condição controlada de umidade ( $60\% \pm 10$ ) e temperatura ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e expostas a cada tratamento por 48h até a análise dos resultados (adaptado de SOUZA, 2022).



Figura 10. Metodologia utilizada para pulverização nas plantas de *Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM. Foto elaborada pela autora (2023).



Figura 11. Inoculação de larvas neonatas (primeiro instar – L1) de *Tuta absoluta* nas plantas de *Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM após pulverização dos tratamentos. Fonte: SOUZA, 2022.





Figura 12. Plantas de *Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM em exposição por 48 horas aos tratamentos utilizados no experimento. Foto elaborada pela autora (2023).

#### 5.5.4 Bioensaio no estágio embrionário (ovos)

Para a realização do bioensaio com a *Tuta absoluta* no estágio embrionário (ovos), utilizou-se 4 tratamentos (extratos aquosos contendo a cepa ITEP-024 nas concentrações de 62,5 mg/L; 125 mg/L e 250 mg/L, e o controle negativo sendo água ultrapura), e 5 repetições para cada (N=20). Optou-se por não utilizar o controle positivo, pois não há evidências que o organofosforado malation tenha efeito em ovos de *Tuta absoluta*, apenas em adultos e ninfas (BÔAS *et al.*, 2009).

Foi utilizado placas de petri de 60x15mm, colocado papel de filtro qualitativo sob cada placa (Corning ® 60mm/Tissue Culture Dish, Sterile 25011, NY, USA. 14831). Foi inoculado 100µl em cada placa de modo que todo o conteúdo fosse absorvido pelo papel. Em seguida, foi inserido um total de 10 ovos por placa. As placas foram seladas e transferidas para o BOD (umidade 60% ± 10, fotofase de 14h no claro, temperatura de 25°C ±1) por 5 dias até a análise de eclosão das larvas. (adaptado de PAMPOLINI *et al.*, 2021).

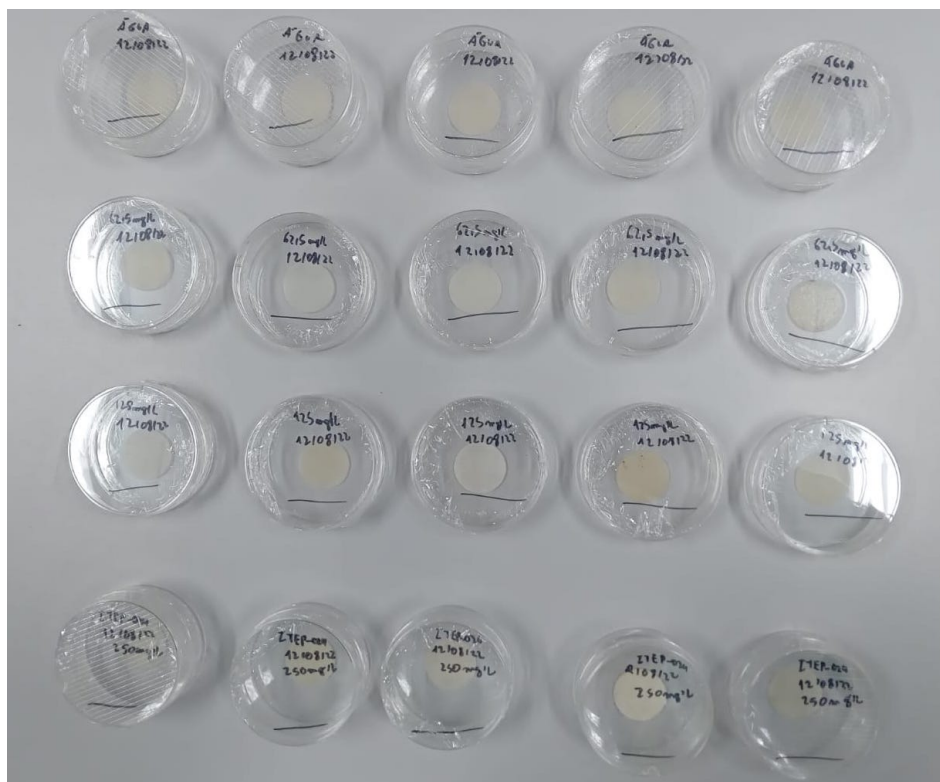


Figura 13. Bioensaio com ovos de *Tuta absoluta* com 4 tratamentos (extratos aquosos contendo a cepa ITEP-024 nas concentrações de 62,5 mg/L; 125 mg/L e 250 mg/L, e água ultrapura como controle negativo) e 5 repetições (N=20). Foto elaborada pela autora (2023).

### 5.6 Avaliação de dano foliar do micro-tomateiro causado pela *Tuta absoluta* exposta a extratos aquosos da cepa ITEP-024

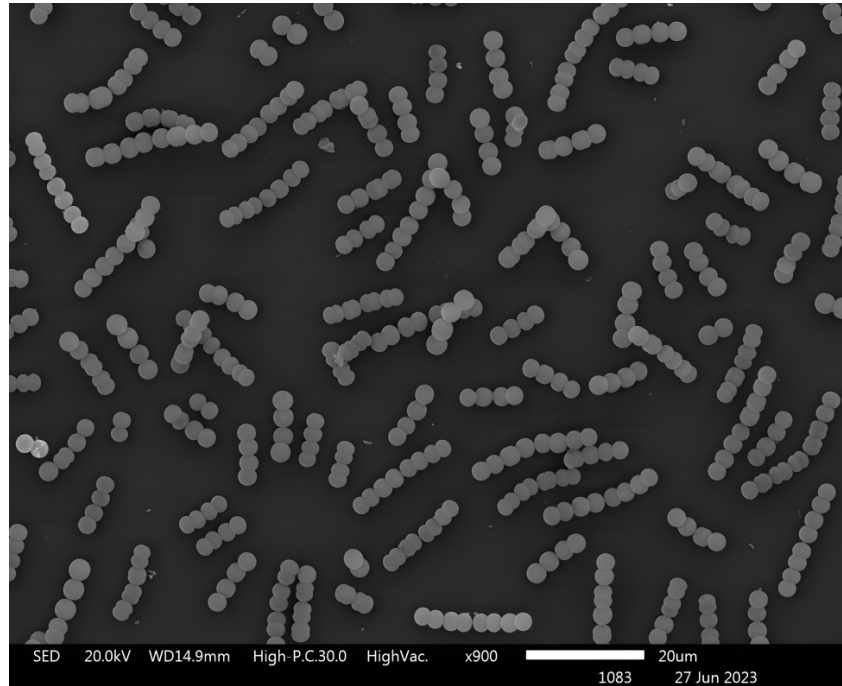
Para a avaliação de dano foliar do micro-tomateiro, utilizou-se a metodologia para criação de *T. absoluta* e cultivo da *Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM já descritos. O bioensaio feito com as larvas de *T. absoluta* para a avaliação de dano foliar seguiu também a mesma metodologia já descrita, porém foi realizado no estágio larval entre 3 e 4 dias (L3/4) para obtenção de maiores larvas. Utilizou-se como tratamento apenas o controle negativo (água ultrapura) e as concentrações C1 (250mg/L) e C3 (62,5mg/L), (N=21), já que experimentos anteriores não demonstraram dano foliar visível quando aplicado o controle positivo (malation 500 Ce) (adaptado de SOUZA, 2022). O software utilizado para análise das imagens obtidas foi o ImageJ for microscopy (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

### **5.7 Análise estatística**

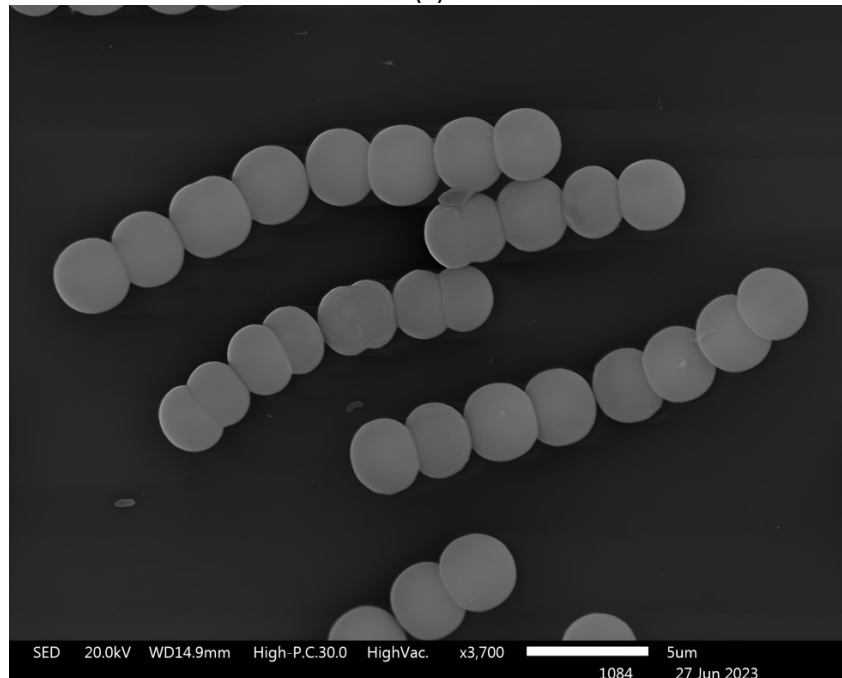
A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados de mortalidade de *T. absoluta* no estágio larval apresentaram distribuição não normal. Todos os dados foram analisados e suas diferenças detectadas pela análise de variância ANOVA One-Way (estágio embrionário) e Kruskal-Wallis One Way (estágio larval), seguida pelo pós-teste de Dunnett para comparação dos tratamentos com o grupo controle. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) e as diferenças significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura da cepa ITEP-024



(a)



(b)

Figura 14: Imagens digitais de alta resolução (a e b) da cepa ITEP-024 utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV). Foto elaborada pela autora e colaboradores (2023).

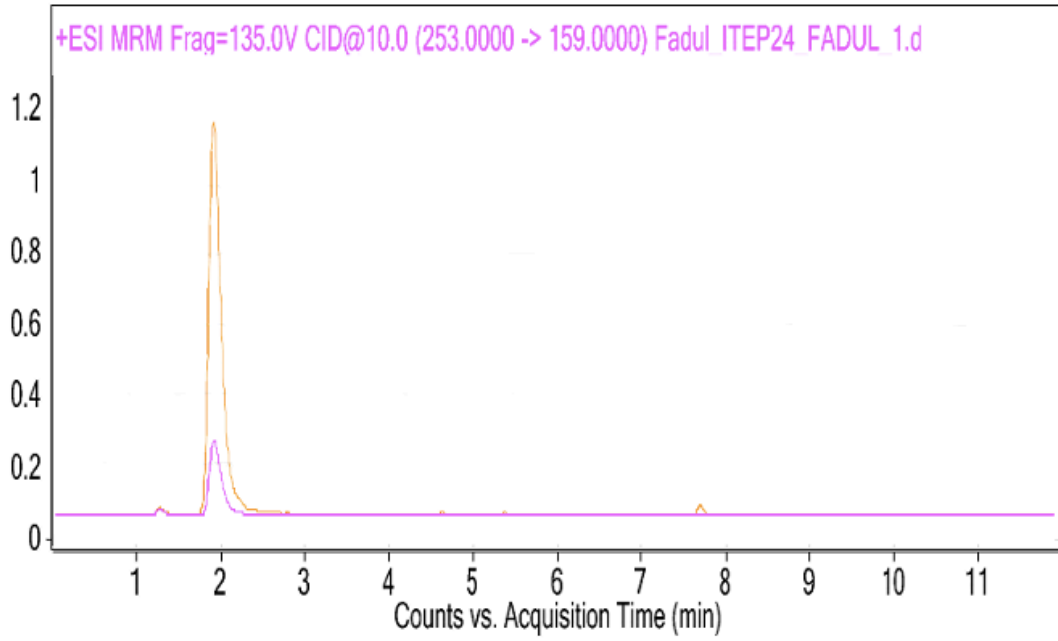
Até o desenvolvimento da filogenética molecular, área da ciência que estuda a semelhança evolutiva entre os mais diversos grupos de seres através das sequências de DNA, a identificação de espécies de microrganismos era feita somente pela morfologia, análises bioquímicas e ecológicas. Portanto, é compreensível que muitas mudanças venham ocorrendo na nomenclatura de diversas espécies de cianobactérias, que estão sendo reclassificadas em razão das novas técnicas (HUGENHOLTZ & PACE, 1996; YANG & RANNALA, 2012).

E como já discutido, a espécie passou por diversas reclassificações até ser alocada em seu atual gênero. Por conter “tricomas torcidos com acinetos esféricos adjacentes aos heterócitos” característicos, foi alocada inicialmente no gênero *Anabaena spp*, todavia foi somente através de análises filogenéticas (16S rRNA) que sua mais recente classificação ocorreu para o gênero *Sphaerospermopsis spp* (WERNER *et al.*, 2012).

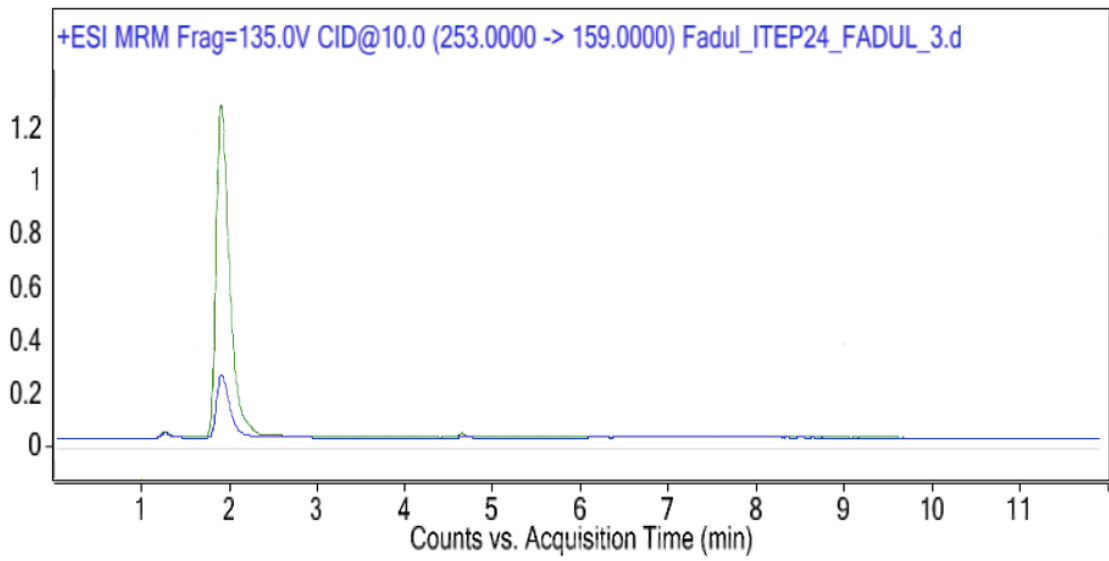
A análise microscópica proveniente dos cultivos da cepa ITEP-024 revela uma cianosfera moderada, indicando uma colônia uniforme. E apesar de não ser utilizada para classificações taxonômicas, a técnica é muito importante para revelar a complexidade de interação desses microrganismos.

## **6.2 Detecção de GNT na biomassa da cepa ITEP-024 (LC-MS)**

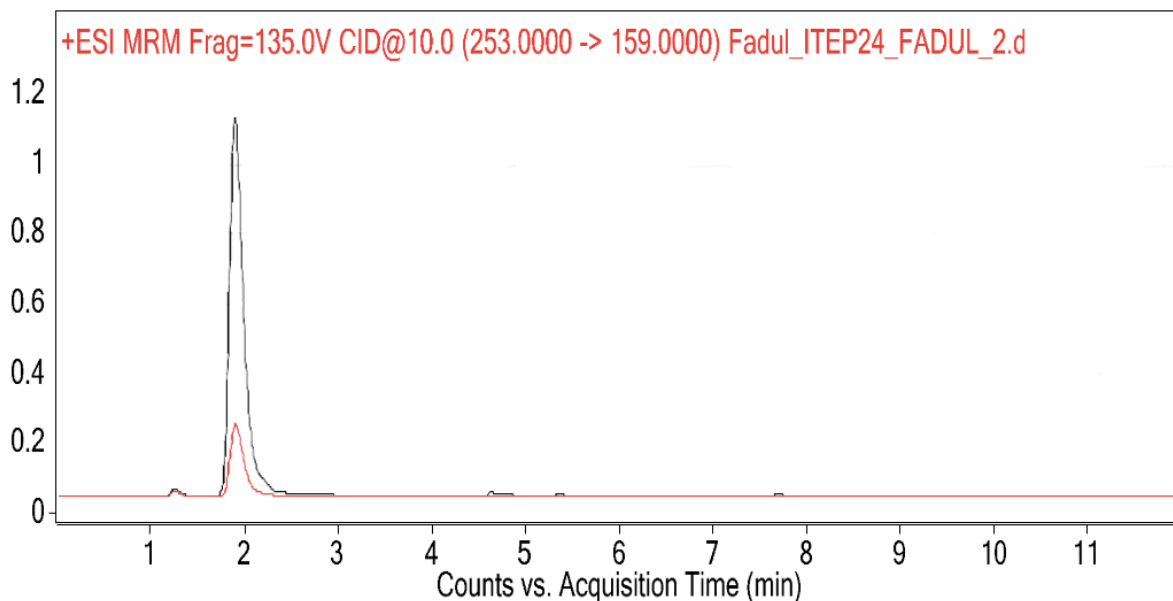
Os cromatogramas a, b e c na Figura 15 apresentam o padrão de guanitoxina em LC-MS:



(a)



(b)



(c)

Figura 15. Os cromatogramas (a), (b) e (c) representam a detecção de guanitoxina na biomassa da cepa Itep-024 em LC-MS no modo MRM (+ESI) e transições de  $m/z$  253>58  $[M+H]^+$  e  $m/z$  253>159  $[M+H]^+$ .

Nota-se que o tempo de retenção estimado é de 1 minuto e 50 segundos nas três amostras. As análises feitas em MS/MS modo positivo  $[M + H]^+$  do monitoramento de reações múltiplas (MRM) permitiram determinar os produtos iônicos da fragmentação deste composto como ocorrendo em  $m/z$  253 > 58 (picos menores de cor rosa, azul e vermelha respectivamente) e  $m/z$  253 > 159 (picos maiores de cor laranja, verde e preta respectivamente). A massa teórica calculada da guanitoxina é  $m/z$  253.106, valor muito próximo ao determinado nas análises (253). A proporção da intensidade entre os picos do íon-produto fragmentado e do íon-precursor protonado foram as mesmas nas três amostras analisadas. Todos estes parâmetros permitem indicar que o composto identificado nas amostras corresponde ao espectro da guanitoxina.

A guanitoxina, ((S)-5-((dimethylamino)methyl)-2-iminoimidazolidin-1-yl methyl hydrogen phosphate -  $C_7H_{17}N_4O_4P$ ), é uma toxina organofosfatada de ação neurotóxica produzida por cianobactérias (PRUGH *et al.*, 2017; FIORE *et al.*, 2020). Ela foi identificada e descrita na linhagem *Sphaerospermopsis torques-reginae* Itep-024 isolada de um reservatório no nordeste brasileiro (MOLICA *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2020; FERNANDES *et al.*, 2021).

A detecção e descrição da GNT foi detalhada extensamente (FERNANDES, 2021), possuindo padrões cromatográficos seguros baseados em seu tempo de retenção (rt), sua fragmentação e sua carga-massa ( $m/z$ ). A seguir segue o cromatograma de um padrão de guanitoxina:

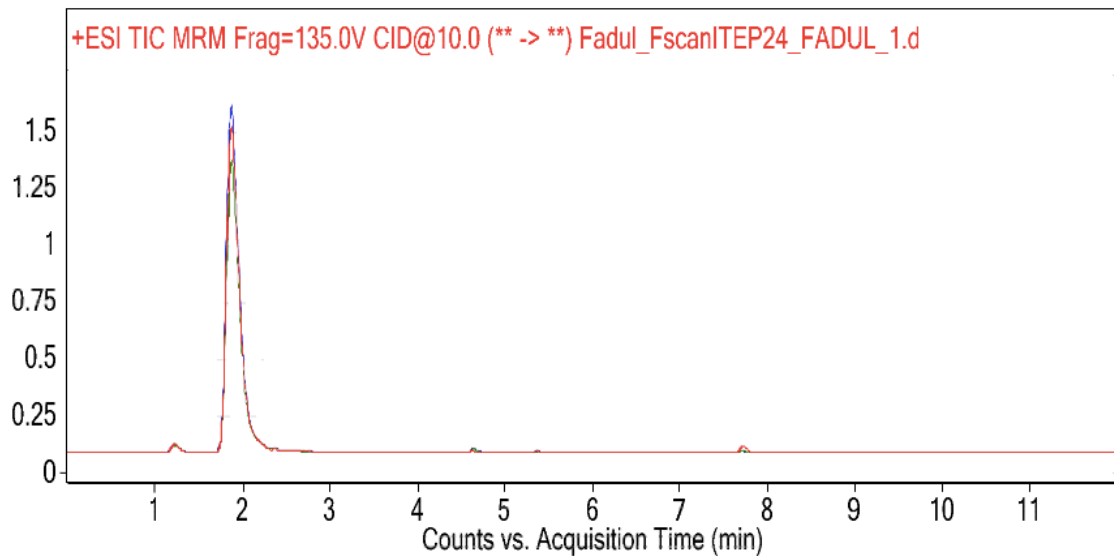
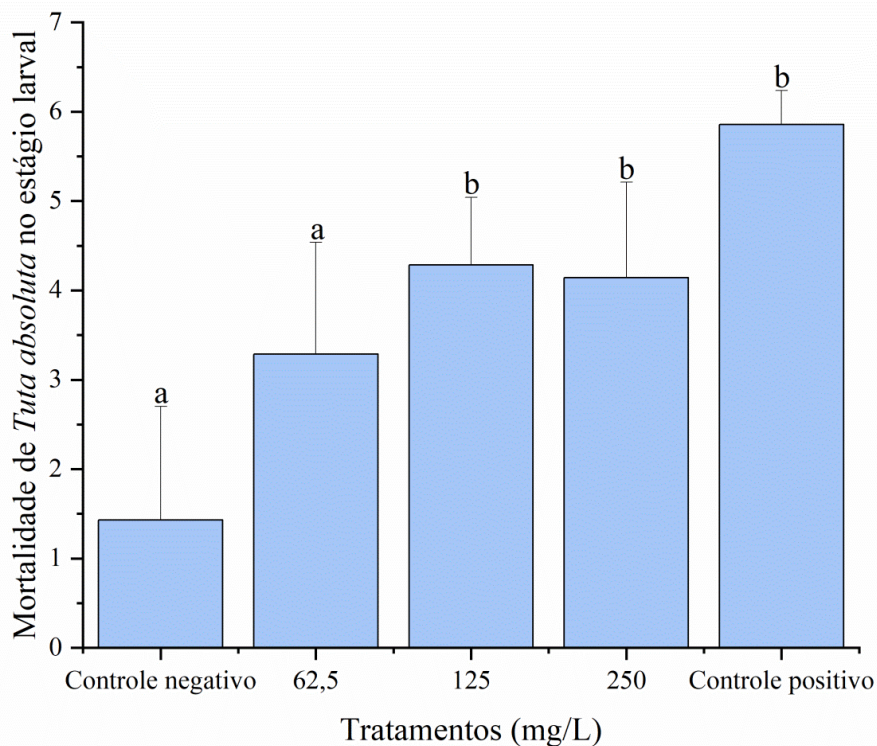


Figura 16. Cromatograma representando detecção de padrão de guanitoxina da cepa ITEP-024 por LC-MS no modo MRM (+ESI) e transições de  $m/z$  253>58  $[M+H]^+$  e  $m/z$  253>159  $[M+H]^+$ .



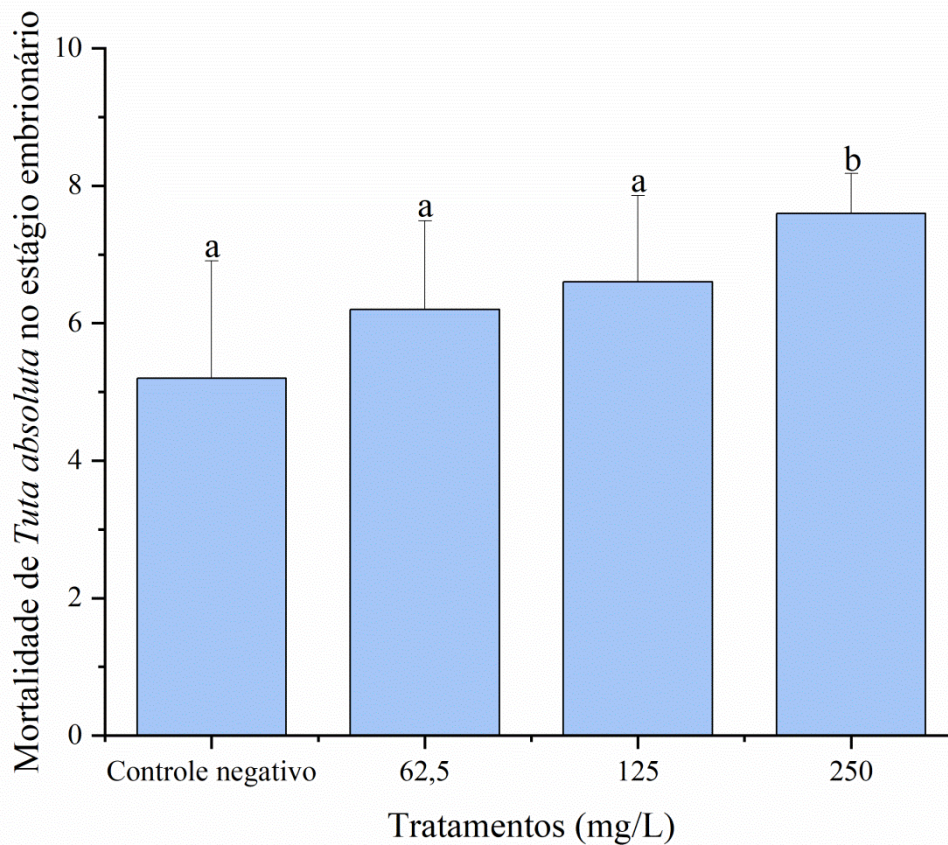
### 6.3 Avaliação do potencial inseticida dos extratos aquosos da cepa ITEP-024

Figura 17. Exposição aguda do extrato bruto liofilizado da cepa ITEP-024 em diferentes concentrações, após 48 horas, em *T. absoluta* no estágio larval.



Legenda: Controle negativo (água ultrapura); T1 = 62,5 mg/L; T2 = 125 mg/L e T3 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 e Controle positivo (malation), (n = 5) aplicados em microtomateiro (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM) com *T. absoluta* no estágio larval. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis One Way e pós-teste de Dunnett). O resultado da diferença significativa foi de  $p \leq 0,001$ .

Figura 18. Exposição aguda do extrato bruto liofilizado da cepa ITEP-024 em diferentes concentrações, após 48 horas, em *T. absoluta* no estágio embrionário (ovos).



Legenda: Controle negativo (água ultrapura); T1 = 62,5 mg/L; T2 = 125 mg/L e T3 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 e Controle negativo (água) (n = 4) aplicados em microtomateiro (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM) com *T. absoluta* no estágio embrionário (ovos). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas em relação ao grupo controle (ANOVA One-way e pós-teste de Dunnett). O resultado da diferença significativa foi de  $p = 0,028$ .

Os resultados da avaliação do potencial inseticida dos extratos aquosos da cepa ITEP-024 em larvas de *T. absoluta* foram significativos para as duas maiores concentrações (125 mg/L e 250mg/L). Já para a avaliação dos extratos testados em ovos de *T. absoluta*, o resultado foi significativo apenas para a maior concentração (250mg/L).

Variações no efeito da guanitoxina sobre animais que, em função da sua concentração, podem ser prejudiciais, já foram referidas na literatura. Como

exemplo, o estudo de Mahmood e Carmichael (1986) que testou a farmacologia da GNT em camundongos, ratos e tecidos de frangos e sapos para entender seu mecanismo de ação. Outro estudo de Mahmood e Carmichael (1987) testou diferentes doses de GNT em ratos. Estudos mais recentes como o de Santos e colaboradores (2019) testaram o uso de espécie de baratas como modelo alternativo para o monitoramento da atividade da GNT em ambientes aquáticos bem como compararam os efeitos neurotóxicos da GNT com o organofosforado sintético, triclorfon. Outro estudo realizado em organismos vivos foi o de Passos e colaboradores (2022) que investigou a mutagenicidade da cepa ITEP-024 em peixes em concentrações de relevância ambiental. Todos os estudos relatados apresentaram resultados que indicam o potencial neurotóxico/mutagênico da GNT em diversos animais.

Todavia é a primeira vez que um bioensaio é realizado para testar seu potencial inseticida. Alguns estudos já compararam os efeitos desta neurotoxina com outros organofosforados sintéticos como o estudo de Cook e colaboradores (1988) que comparou os efeitos da GNT com o paraoxon, fisostigmina e piridostigmina na atividade cerebral de camundongos. Os animais testados com GNT apresentaram salivação excessiva, tremores e dispneia. Parris e colaboradores (2000) concluíram em seu estudo que a atividade da colinesterase na presença do extrato contendo a espécie *Anabaena flos-aquae*, produtora de GNT, foi semelhante aos resultados obtidos com diclorvos e carbaril, dois pesticidas inibidores da colinesterase (tabela 1). Desta forma, os resultados obtidos corroboram com o que já foi descrito na literatura.

É bem relatado na literatura que a molécula de GNT é capaz de causar inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) de modo irreversível (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986; COOK, W. O. *et al.*, 1989b; COOK *et al.*, 1991). Isso faz com que esta enzima não degrade o neurotransmissor acetilcolina e este se acumule na junção neuromuscular, causando uma hiperestimulação colinérgica (figura 6) (SILVA, 2012; SANTOS, 2020).

Considerando que o mecanismo de ação da GNT é o mesmo observado em organofosforados e carbamatos, esta molécula apresenta um potencial biotecnológico para o desenvolvimento de insumos agrícolas e até mesmo medicamentos (RODRIGUEZ, 2006; SILVA, 2012; SCIACCA *et al.*, 2018).

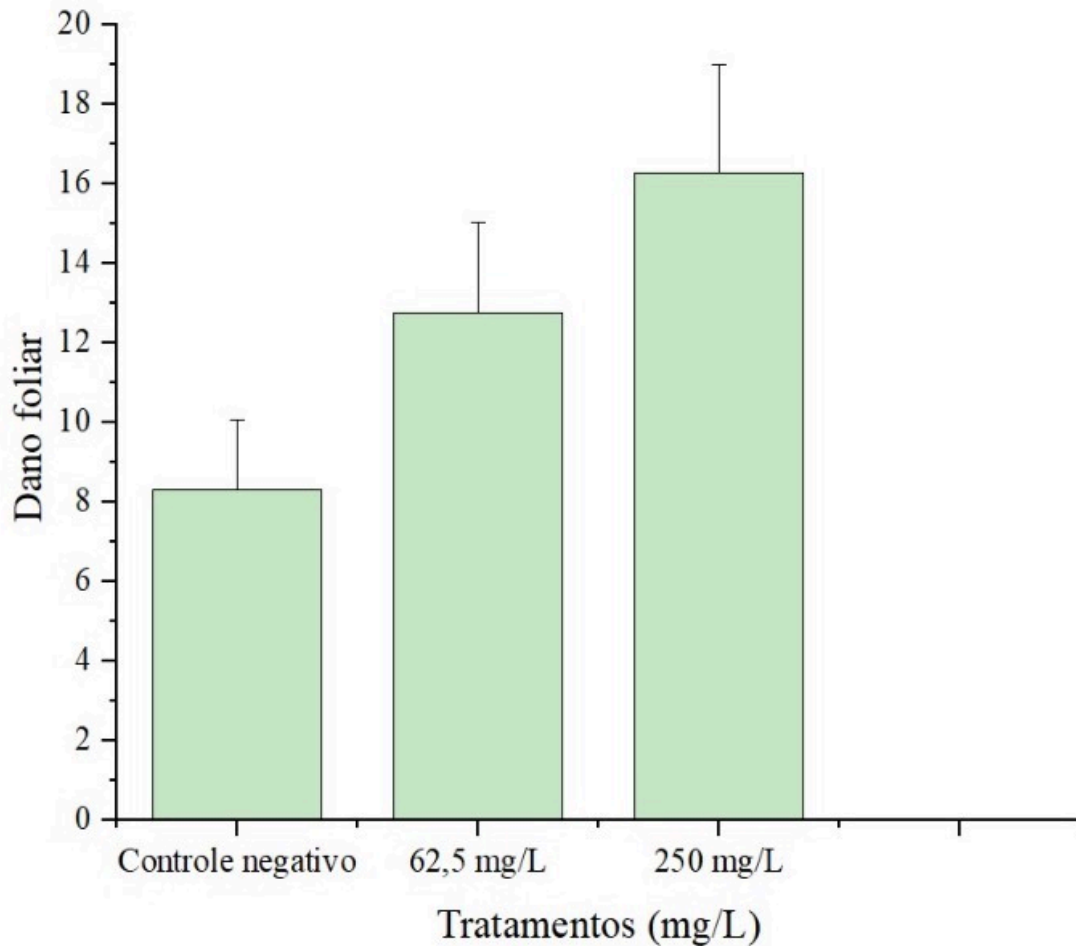
A GNT é a cianotoxina de água doce mais potente já relatada. Estudos mostram que em ratos, sua dose letal (LD) foi de 60 mg/kg, e sua dose letal mediana (LD50) variou entre 40-60 µg/kg (CARMICHAEL & GORHAM, 1978; MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986).

Diante do exposto, sugere-se que o extrato contendo guanitoxina, nas duas maiores concentrações para a fase larval e na maior concentração para os ovos de *T. absoluta*, foram capazes de causar alterações vitais nos insetos, porém não se pode afirmar que os efeitos tóxicos causados em *T. absoluta* foram atribuídos somente à toxina já que os extratos possuem outros metabólitos como as micosporinas, anabenopeptinas, spumiginas e namalides (GERALDES *et al.*, 2020).

Apesar disso, o estudo de Passos e colaboradores (2023) mostram um forte indício que o extrato metanólico da cepa ITEP-024 testado em *Daphnia similis* (Crustacea: Cladocera) não é tóxico. A análise em LC-MS/MS detectou GNT apenas no extrato aquoso, o que pode explicar a toxicidade evidenciada neste tipo de extrato (polar).

#### 6.4 Avaliação de dano foliar do micro-tomateiro causado pela *Tuta absoluta* exposta a extratos aquosos da cepa ITEP-024

Figura 19. Análise de dano foliar do micro-tomateiro (*L. esculentum*) causado por *T. absoluta* em estágio larval (L3/4) após exposição por 48h a extratos aquosos da cepa ITEP-024 em diferentes concentrações.



Legenda: Foi utilizado controle negativo (água ultrapura) e extratos aquosos da cepa ITEP-024 nas concentrações de 62,5mg/L e 250 mg/L. Para esta análise, foi utilizada média mais erro padrão (desvio padrão/raiz quadrada do número amostral - 41 folhas).

Os resultados mostram que o dano foliar mais evidenciado ocorreu na maior concentração do extrato (250mg/L), seguida da menor concentração (62,5mg/L), e por último, no controle negativo (água ultrapura).

É possível que devido à toxicidade do extrato polar, o maior dano foliar tenha ocorrido nas maiores concentrações, apesar do menor número de larvas ter sido

encontrado nestes resultados (maior mortalidade). Como já discutido, até então, somente no extrato polar foi possível detectar a presença da GNT (Passos *et al.*, 2023).

Por não haver um padrão analítico para a identificação da GNT (FERNANDES *et al.*, 2021), sua purificação e isolamento ainda não são possíveis. Nesse sentido, é necessário um avanço nas técnicas para isolamento desta importante neurotoxina.

Já o possível dano foliar causado pela *T. absoluta*, também pode ter ocorrido devido lesões identificadas em todos os tratamentos nas folhas do micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM), característica desse tipo de herbívoro mastigador, apresentando mordida de formato irregular (CHERIF & VERHEGGEN, 2019).

*T. absoluta* (Meyrick) (*Lepidoptera: Gelechiidae*), também conhecida como traça-do-tomateiro, é um inseto resistente e que pode causar perdas de até 100% nas produções de tomate (SOUZA *et al.*, 1983). As larvas consomem o mesófilo do tomateiro, podendo danificar frutos, flores e folhas (KRECHEMER & FOERSTER, 2015).

O controle da espécie tem sido feito com uso de diversos inseticidas, causando efeitos indesejados no ambiente, além de causar resistência de diversas pragas (SINGH *et al.*, 2018). O manejo integrado de pragas (MIP) ainda é a melhor estratégia para minimizar os problemas relatados (CHHETRI, 2018). Como ainda não há uma resolutiva para a problemática, a busca de compostos com potencial inseticida produzidos por microrganismos representa uma área promissora.

O presente estudo, além de reforçar o potencial tóxico da molécula de guanitoxina, contribui com informações sem precedentes sobre seu potencial inseticida testado de forma inédita por bioensaio com insetos da espécie *Tuta absoluta*, uma peste de relevância para a agricultura no Brasil e no mundo. Ainda são necessários mais estudos a respeito da interação desta espécie de inseto com os extratos contendo GNT.



## 7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o extrato da cepa ITEP-024 da espécie *S. torques-reginae* afetou tanto a sobrevivência das larvas (nas duas maiores concentrações) de modo significativo quanto a eclosão de ovos de *T. absoluta* na maior concentração ambientalmente relevante testada (250 mg/ml). Além disso, foi evidenciado o maior dano foliar na maior concentração do extrato, seguida da menor concentração testada, e por último, no controle negativo. Deste modo, este trabalho contribuiu com dados sem precedentes a respeito do potencial inseticida desta cepa produtora de GNT. E apesar de não podermos afirmar que foi o efeito da guanitoxina de modo isolado que ocasionou as mortes no bioensaio, há indícios que o extrato metanólico da cepa ITEP-024 não é tóxico, reforçando ainda mais que o extrato aquoso possui o composto que resultou nas mortes de *T. absoluta*.





## REFERÊNCIAS

- ALAGAWANY, Mahmoud; TAHAB, Ayman E.; NORELDIN, Ahmed; EL-TARABILY, Khaled A.; EL-HACK, Mohamed E. Abd. **Nutritional applications of species of Spirulina and Chlorella in farmed fish: A review.** Aquaculture Volume 542, 15 September 2021, 736841.
- ALOIZOU, Athina-Maria; SIOKAS, Vasileios; VOGIATZI, Christina; PERISTERI, Eleni; DOCEA, Anca Oana; PETRAKIS, Demetrios; PROVATAS, Antonios; FOLIA, Vasiliki; CHALKIA, Charikleia; VINCETI, Marco; WILKS, Martin; IZOTOV, Boris N.; TSATSAKIS, Aristidis; BOGDANOS, Dimitrios P.; DARDIOTIS, Efthimios. **Pesticides, cognitive functions and dementia: A review.** Toxicology Letters Volume 326, 15 June 2020, Pages 31-51. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.03.005>.
- AL-SAMMAK, Maitham Ahmed; HOAGLAND, Kile D.; SNOW, Daniel D.; CASSADA, David. **Methods for simultaneous detection of the cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin-a in environmental samples.** Toxicon, v. 76, p. 316-325, 2013. [doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.10.015](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.10.015).
- ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) - Relatório de Atividades de 2007.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso: 29/06/2022.
- BAJONERO, J.G; PARRA, J.R.P. **Selection and Suitability of an Artificial Diet for Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) Based on Physical and Chemical Characteristics.** Journal of insect Science. Volume 17, Issue 1, January 2017, 13, <https://doi.org/10.1093/jisesa/iew105>
- BAKER, Judith A.; ENTSCH, Barrie; NEILAN, Brett A.; McKay, David B. **Monitoring Changing Toxicity of a Cyanobacterial Bloom by Molecular Methods.** Applied and Environmental Microbiology. Vol. 68, No. 12. 2002. [doi.org/10.1128/AEM.68.12.6070-6076.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6070-6076.2002).
- BALDO, Anieli. **Identificação de ribonuclease potencialmente associada a degradação de dupla fita de RNA (dsRNA) em Tuta absoluta (Meyrick) e a eficiência no silenciamento gênico induzido pelo RNA de interferência (RNAi).** Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 2020.
- BARBOSA, Taíssa dos Santos. **Cianobactérias tóxicas e processos de remoção.** Monografia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2009.
- BARROS, Piedade; GUILHERMINO, Lucia; FIDALGO, Maria Leonor; SOARES, Amadeu. **Effects of Anabaena flos-aquae and microcystis aeruginosa on acetylcholinesterase activity of daphnia pulicaria.** Harmful algae. 1998.

BECKER, Vanessa; ILHARA, Priscila; YUNES, João Sarkis; HUSZAR, Vera Lúcia M. **Occurrence of anatoxin-a(s) during a bloom of *Anabaena crassa* in a water-supply reservoir in southern Brazil.** Journal of Applied Phycology. 22, 235-241. 2010.

BENTO, Flávia de Moura Manuel. **Silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi) em traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick), utilizando bactérias expressando dupla fita de RNA (dsRNA).** Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 2017.

BERRY, John P.; GANTAR, Miroslav; PEREZ, Mario H.; BERRY, Gerald; NORIEGA, Fernando G. **Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides.** Marine Drugs. 6 (2), 117-146. 2008.

BÍBLIA ONLINE. Exodus:7:20. Disponível em: [https://www.biblioon.com/versiculo/exodo\\_7\\_20/](https://www.biblioon.com/versiculo/exodo_7_20/). Data de acesso: 05 de Maio de 2022.

BLAKEFIELD, Mary K.; HARRIS, Denny. **Delay of cell differentiation in *Anabaena aequalis* caused by UV-B radiation and the role of photoreactivation and excision repair.** Photochemistry and Photobiology. 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05023.x>

BÔAS, Geni Litvin Villas; BRANCO, Marina Castelo; DE MEDEIROS, Maria Alice. **Manejo integrado da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) em sistema de produção integrada de tomate indústria (PITI).** Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2009.

BONEN; L. & DOOLITTLE, W. F. **On the prokaryotic nature of red algal chloroplasts.** PNAS. Vol. 72. No. 6. 1975. doi.org/10.1073/pnas.72.6.2310

BONEN; L. & DOOLITTLE, W. F. **Partial sequences of 16S rRNA and the phylogeny of blue-green algae and chloroplasts.** Nature volume 261, pages669–673 (1976). <https://doi.org/10.1038/261669a0>

BOMBARDI, Larissa Mies. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia.** – São Paulo: FFLCH – USP. 2017. 296p.

BORTOLI, Stella. **Investigação da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de cianobactérias.** Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 2011.

BORTOLI, Stella; PINTO, Ernani. **Cianotoxinas: características gerais, histórico, legislação e métodos de análises.** Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 2015.

BOSAK, Tanja; KNOLL, Andrew H.; PETROFF, Alexander P.. **The Meaning of Stromatolites.** Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 2013. 41:21–44.

BRAIBANTE, Mara Elisa Fortes; ZAPPE, Janessa Aline. **A Química dos Agrotóxicos**. Química Nova na escola. Vol. 34, N° 1, p. 10-15, fevereiro 2012.

BRASIL. **Decreto N° 4074, de 4 de janeiro de 2002**. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/d4074.htm#:~:text=O%20registro%20de%20novo%20produto,registrados%20para%20o%20mesmo%20fim.>](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm#:~:text=O%20registro%20de%20novo%20produto,registrados%20para%20o%20mesmo%20fim.>). Acesso: 6 de Julho de 2021.

BRÊDA-ALVES, Fernanda; FERNANDES, Valéria de Oliveira; CHIA, Mathias Ahii. **Understanding the environmental roles of herbicides on cyanobacteria, cyanotoxins, and cyanoHABs**. Aquatic Ecology. Volume 55, pages 347–361. 2021.

BRUNHEROTTO, Rogério; VENDRAMIM, José Djair. **Bioatividade de Extratos Aquosos de Melia azedarach L. Sobre o Desenvolvimento de Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em Tomateiro**. Proteção de Plantas. Neotrop. entomol. 30(3). Set 2001. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000300019>.

CAMARGO, Roberto A.; BARBOSA, Guilherme O.; POSSIGNOLO, Isabella Presotto; PERES, Lazaro E. P.; LAM, Eric; LIMA, Joni E.; FIGUEIRA, Antonio; MARQUES-SOUZA, Henrique. **RNA interference as a gene silencing tool to control Tuta absoluta in tomato (Solanum lycopersicum)**. PeerJ 4:e2673. 2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.2673>.

CARSON, Rachel. **Primavera Silenciosa**. Portico. S o Paulo. 1962.

CARMICHAEL, Wayne W.; AZEVEDO, Sandra M.F.O.; NA, Ji Si; MOLICA, Renato J. R.; JOCHIMSEN, Elise M.; LAU, Sharon; RINEHART, Kenneth L.; SHAW, Glen R.; EAGLESHAM, Geoff K.. **Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins**. Environmental Health Perspectives. Volume 109. Number 7. July 2001.

CARMICHAEL, Wayne. **Cyanobacterial secondary metabolites-the cyanotoxins**. The Journal of applied bacteriology. 1992.

CARMICHAEL, Wayne W.; GORHAM, Paul R. **Anatoxins from clones of Anabaena flos-aquae isolated from lakes of western Canada**. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 1978.

CARMICHAEL, Wayne W. **Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs”**. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal Volume 7, 2001 - Issue 5.

CARMICHAEL, Wayne. **The toxins of Cyanobacteria**. Scientific American; v.270 n.1, v.78-86, 1994.

CARMICHAEL, Wayne. **Toxic Microcystis and the environment**. Toxic Microcystis. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo. 1996.

CARVALHO; Miguel Mundstock Xavier de; NODARI, Eunice Sueli; NODARI; Rubens Onofre. **“Defensivos” ou “agrotóxicos”?** **História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002.** História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro. v.24, n.1, jan.-mar. 2017, p.75-91.

CASSAL, Vivian Brusius; DE AZEVEDO, Letícia Fátima; FERREIRA, Roger Prestes; DA SILVA, Danúbio Gonçalves; SIMÃO, Rogers Silva. **Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública.** Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental. V. 18, N.1, APR., 2014.

CASSIER-CHAUVAT, Corinne; BLANC-GARIN, Victoire; CHAUVAT, Franck. **Genetic, Genomics, and Responses to Stresses in Cyanobacteria: Biotechnological Implications.** Genes 2021, 12(4), 500; <https://doi.org/10.3390/genes12040500>

CASTRO, Maria Luiza Marcico Publio. **Regulamentação e uso de produtos à base de agentes biológicos para o controle de doenças de plantas e pragas no Brasil.** Informe me Agropecuário, Belo Horizonte, 2013.

CHATZIEFTHIMIOU AD, Richer R, ROWLES H, POWELL JT, METCALF JS. **Cyanotoxins as a potential cause of dog poisonings in desert environments.** Vet Rec. 2014. doi: 10.1136/vr.g3176.

CHERIF, Asma; VERHEGGEN, François. **A review of Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) host plants and their impact on management strategies.** Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2019. 23(4), 270-278.

CHHETRI, Lal Bahadur. **Tomato Leafminer (Tuta absoluta) an emerging agricultural pest: Control and management strategies: A Review.** World Scientific News 114 (2018) 30-43.

CHLIPALA, George E.; M.O., Shunyan; ORJALA, Jimmy. **Chemodiversity in Freshwater and Terrestrial Cyanobacteria – A Source for Drug Discovery.** Current Drug Targets, 2011, 12, 1654-1673.

CHONUDOMKUL, Duenrut; YONGMANITCHAI, Wichien; THEERAGOOL, Gunjana; KAWACHI, Masanobu; KASAI, Fumie; KAYA, Kunimitsu; WATANABE, Makoto M. **Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of Cylindrospermopsis raciborskii (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan.** FEMS Microbiology Ecology, Volume 48, Issue 3, June 2004, Pages 345–355, <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.02.014>.

CHORUS, Ingrid; WELKER, Martin. **Toxic Cyanobacteria in Water.** 2nd edition. CRC Press, Boca Raton (FL), on behalf of the World Health Organization, Geneva, CH. 2021.

CIRÉS, Samuel; BALLOT, Andreas. **A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming Aphanizomenon spp. and related species within the Nostocales (cyanobacteria).** Harmful Algae Volume 54, April 2016, Pages 21-43.

CLAUDI, Riccardo; ALEI, Eleonora; Battistuzzi, MARIANO; COCOLA, Lorenzo; ERCULIANI, Marco Sergio; POZZER, Anna Caterina; SALASNICH, Bernardo; SIMIONATO, Diana; SQUICCIARINI, Vito; POLETTO, Luca; LA ROCCA, Nicoletta. **Super-Earths, M Dwarfs, and Photosynthetic Organisms: Habitability in the Lab.** *Life* 2021, 11(1), 10; <https://doi.org/10.3390/life11010010>

CODD, G.A.; LINDSAY, J.; YOUNG, F.M.; Morrison, L.F.; METCALF, J.S. (2005b). **Harmful cyanobacteria.** In: Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM (eds) *Harmful cyanobacteria*, vol 3. Aquatic Ecology Series, pp 1–23. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3022-3\\_1](https://doi.org/10.1007/1-4020-3022-3_1)

CODD, Geoffrey A.; METCALF, James S.; WARD, Clive J.; BEATTIE, Kenneth A.; BELL, Steven G.; KAYA, Kunimitsu; POON, Grace K. **Analysis of Cyanobacterial Toxins by Physicochemical and Biochemical Methods.** *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, Volume 84, Issue 5, 1 September 2001, Pages 1626–1635, <https://doi.org/10.1093/jaoac/84.5.1626>

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.** *Toxicol.* V. 26. Issue 8, 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 *Anabaena flos-aquae*: Studies of ducks, swine, mice and a steer.** *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1989a.

COOK, William O., DELLINGER, J.A., SINGH, S.S., DAHLEM, A.M., CARMICHAEL, W.W., BEASLEY, V.R., 1989b. **Regional brain cholinesterase activity in rats injected intraperitoneally with anatoxin-a(s) or paraoxon.** *Toxicol. Lett.* 49, 29–34. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(89\)90097-0](https://doi.org/10.1016/0378-4274(89)90097-0)

COOK, W.O., IWAMOTO, G.A., SCHAEFFER, D.J., CARMICHAEL, W.W., BEASLEY, V.R., 1990. **Pathophysiologic Effects of Anatoxin-a (s) in Anaesthetized Rats: The Influence of Atropine and Artificial Respiration.** *Pharmacol. Toxicol.* 67, 151–155.

COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HARLIN, K.S.; BEASLEY, V.R.; HOOSER, S.B.; HASCHEK, W.M.; CARMICHAEL, 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.* 1991.

COSTA, R.B. Carrington; PIMENTEL, J.; REBELO, A.; GONÇALVES, J. Souto; COSTA, J. Janeiro. **Intoxicações agudas por compostos organofosforados.** *Acta Médica Portuguesa*. 1988; 4/5/6: 291-295.

CUNHA, Isabel; BILTES, Rita; SALES, MGF; VASCONCELOS, Vitor. **Aptamer-Based Biosensors to Detect Aquatic Phycotoxins and Cyanotoxins**. *Sensors* 2018, 18(7), 2367; <https://doi.org/10.3390/s18072367>.

DICH, Jan; ZAHM, Sheila Hoar; HANBERG, Annika; ADAMI, Hans-Olov. **Pesticides and cancer**. *Cancer Causes & Control* volume 8, pages420–443 (1997).

DÖRR FA, 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*. 2010 Jan;55(1):92-9. doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.017.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R.M., 1961. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity**. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

FARROKH, Parisa; SHEIKHPOUR, Mojgan; KASAEIAN, Alibakhsh; ASADI, Hassan; BAVANDI, Roya. **Cyanobacteria as an eco-friendly resource for biofuel production: A critical review**. *Biotechnology progress*. Volume 35. Issue 5. 2019 e2835. DOI: 10.1002/btpr.2835.

FILHO, Michereff; GUIMARÃES, Jorge Anderson; MOURA, Alexandre Pinho. **A traça do tomateiro**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2013. 31 p. - (Documentos / Embrapa Hortaliças, ISSN 1415-2312; 140).

FRANCIS, George. **Poisonous Australian Lake**. *Nature*. 18, pages11–12 (1878).

FERNANDES, Kelly Afonsina. **Métodos de extração, estabilidade e biodisponibilidade da guanitoxina em cultivos de *Sphaerospermopsis torques-reginae***. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 2020.

FERNANDES, Kelly A; DÖRR, Felipe Augusto; PINTO, Ernani. **Stability Analyses by HPLC-MS of Guanitoxin Isolated from *Sphaerospermopsis torques-reginae***. *J. Braz. Chem. Soc.* 32 (8) • Aug 2021 • <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210053>

FIORE, Marli Fátima; LIMA, Stella Thomazde; CARMICHAEL, Wayne W.; McKinnie, Shaun M.K.; CHEKAN, Jonathan R.; MOORE, Bradley S. **Guanitoxin, re-naming a cyanobacterial organophosphate toxin**. *Harmful Algae*. Volume 92, February 2020. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101737>.

Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira / Brasil. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5 edição. Brasília: Anvisa, 2010.

FOSSIER, P.; TAUC, L.; BAUX, G. Side effects of phosphorylated acetylcholinesterase reactivators on neuronal membrane and synaptic transmission. *Pflugers Arch* . 1983 Jan;396(1):8-14. doi: 10.1007/BF00584691.

FOURNIER, G.P.; MOORE, K.R.; RANGEL, L.T.; PAYETTE, J.G.; MOMPER, L.; BOSAK. **The Archean origin of oxygenic photosynthesis and extant cyanobacterial lineages.** Proc Biol Sci . 2021 Sep 29;288(1959):20210675. doi: 10.1098/rspb.2021.0675.

GADEMANN, Karl; PORTMANN, Cyril. **Secondary Metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities.** Current Organic Chemistry, 2008, 12, 326-341.

GAGET, V.; LAU, M.; SENDALL, B.; FROSCIO, S.; & HUMPAGE, A. R. (2017). **Cyanotoxins: which detection technique for an optimum risk assessment?** Water research, 118, 227-238. doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.025.

GERALDES, Vanessa; MEDEIROS, Livia Soman de; LIMA, Stella T.; ALVARENGA, Danillo Oliveira; GACESA, Ranko; LONG, Paul F.; FIORE, Marli Fátima; PINTO, Ernani. **Genetic and biochemical evidence for redundant pathways leading to mycosporine-like amino acid biosynthesis in the cyanobacterium Sphaerospermopsis torques-reginae ITEP-024.** Algae. Volume 35 (2); 2020. DOI: <https://doi.org/10.4490/algae.2020.35.5.19>

GERALDES, Vanessa Sofia Mendes. **Estratégias para identificação e quantificação de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) em cianobactérias e outros organismos para aplicação em cosmética e farmacêutica.** Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 2019.

GILL, H. K., GARG, H. **Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies.** In: Larramendy, M. L. , Soloneski, S. , editors. Pesticides - Toxic Aspects [Internet]. London: IntechOpen; 2014.

GOBBO, S. R. **Uso do DDT: um perigo eminente para a saúde humana. Projeto Qualidade da água.** 2016. Disponível em: <<http://www.mpf.mp.br/atuacaotematica/ccr4/dados-daatuacao/projetos/qualidade-da-agua/artigos-cientificos>> Acesso em: 05 de ago. de 2021.

GOODCHILD-MICHELMAN; I.M.; CHURCH, G.M; SCHUBERT, M.G. Light and carbon: **Synthetic biology toward new cyanobacteria-based living biomaterials.** Materials Today Bio Volume 19, April 2023, 100583. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100583>

GROSSMAN, A. R. **A molecular understanding of completary chromatic adaptation.** Photosynthesis Research. n. 1-3. 76: 207-215. 2003.

Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos: **Uma Abordagem sobre os Ensaios Físicos e Químicos.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2ª edição, revista – Brasília: Anvisa, 2008.. Acesso: <[http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/material/guia\\_cosmetico.pdf](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/material/guia_cosmetico.pdf)>. Data: 28/06/21.



HARADA, Kenoichi; OGAWA, Kiyoshi; KIMURA, Yukio, MURAT, Hideaki; SUZUKI, Makoto. **Microcystins from Anabaena flos-aquae NRC 525-17**. Chem. Res. Toxicol. 1991.

HEARD, Andy W.; BEKKER, Andrey; KOVALICK, Alex; TSIKOS, Harilaos; IRELAND, Thomas; DAUPHAS, Nicolas. **Oxygen production and rapid iron oxidation in stromatolites immediately predating the Great Oxidation Event**. Earth and Planetary Science Letters Volume 582, 15 March 2022, 117416.

HENRIKSEN, P., CARMICHAEL, W.W., JISI, A., 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 content of poisoned birds**. Toxicon 35, 901–913. 1997. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00190-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00190-0)

HONDA, R.Y. **Estudos taxonômicos e de desenvolvimento in vitro de Microcystis spp. (Cyanobacteria) isoladas de corpos d'água do estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado Instituto de Botânica, São Paulo. 2005.

HUGENHOLTZ, Philip; PACE, Norman R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**. Volume 14, Issue 6, June 1996, Pages 190-197.

HUPFFER, Haide Maria; ENGELMANN, Wilson; WEYERMÜLLER, André Rafael. **Os desafios jurídico-ambientais do uso de agrotóxicos**. São Leopoldo: Casa leiria, 2019.

HYDE, E.G., CARMICHAEL, W.W. **Anatoxin-A(S), a naturally occurring organophosphate, is an irreversible active site-directed inhibitor of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7)**. J. Biochem. Toxicol. 6, 195–201. 1991. <https://doi.org/10.1002/jbt.2570060305>

Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Agrotóxico**. Ministério da Saúde. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/en/node/1909>>. Data de acesso: 6 de julho de 2021.

JACINAVICIUS, Fernanda Rios; JÚNIOR, Watson Arantes Gama; AZEVEDO, Maria Teresa De Paiva; SANT'ANNA, Célia Leite. **Manual Para Cultivo De Cianobactérias**. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo Instituto de Botânica - Núcleo de Pesquisa em Ficologia. 2013.

JUNIOR, Trazilbo José de Paula; VENZON, Madelaine; TEIXEIRA, Hudson; BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo Augusto Boechat; VILELLA, Francys Mara Ferreira;

KAEBERNICK, Melanie; NEILAN, Brett A. **Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production**. FEMS Microbiology Ecology, Volume 35, Issue 1, March 2001, Pages 1–9, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00782.x>

KRECHEMER, Flavia da Silva; FOERSTER, Luis Amilton. *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): Thermal requirements and effect of temperature on development, survival, reproduction and longevity. *Eur. J. Entomol.* 112 (4): 658-663, 2015 | DOI: 10.14411/eje.2015.103.

KAMEL, Freya; HOPPIN, Jane A. **Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease.** *Environmental Health Perspectives.* Vol. 112, No. 9. 2004. <https://doi.org/10.1289/ehp.7135>.

KASS, Hanne; HENRIKSEN, Peter. **Saxitoxins (PSP toxins) in Danish lakes.** *Water Research* Volume 34, Issue 7, 1. 2000.

KAUSHIK, Rajni; BALASUBRAMANIAN, Rajasekhar. **Methods and Approaches Used for Detection of Cyanotoxins in Environmental Samples: A Review.** *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* Volume 43, 2013 - Issue 13. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.644224>

KINOSHITA, Kazumi. **Efeito da pré-cloração sobre a integridade celular e remoção de toxinas de *Micricystis aeruginosa*.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 2015.

KOMÁREK, J. **Sobre las cianofíceas de Cuba. Especies planctónicas que forman florecimientos de las aguas.** *Acta Botánica Cubana.* v. 19, p. 1-30, 1984.

KOMÁREK, Jiri. **Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept).** *Phytoplankton.* Review paper. *Hydrobiologia* (2010) 639:245–259 DOI 10.1007/s10750-009-0031-3.

KRUYER, Nicholas S.; REALFF, Matthew J.; SUN, Wenting; GENZALE, Caroline L.; PERALTA-YAHYA, Pamela. **Designing the bioproduction of Martian rocket propellant via a biotechnology-enabled in situ resource utilization strategy.** *Nature Communications* volume 12, Article number: 6166. 2021.

LIMA, Igor Barbosa; BOECHAT, Iola; GÜCKER, Björn. **Glyphosate in Brazil: use, aquatic contamination, environmental effects, and health hazards.** *Caderno de Geografia* 31(1):90-115. 2021. 10.5752/p.2318-2962.2021v31nesp1p90.

LIMA, Stella T.; ALVARENGA, Danilo O.; ETCHEGARAY, Augusto; FEWER, David P.; JOKELA, Jouni; VARANI, Alessandro M.; SANZ, Miriam; DÖRR, Felipe A.; PINTO, Ernani; SIVONEN, Kaarina; FIORE, Marli F. **Genetic Organization of Anabaenopeptin and Spumigin Biosynthetic Gene Clusters in the Cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITP-024.** *ACS Chem. Biol.* 2017, 12, 3, 769–778. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00948>.

LIMA, Stella T.; FALLON, Timothy R.; CORDOZA, Jennifer L.; CHEKAN, Jonathan R.; DELBAJE, Endrews; HOPIAVUORI, Austin R.; ALVARENGA, Danillo O.; WOOD, Steffaney M.; LUHAYAYA, Hanna; BAUMGARTNER, Jackson T.; DÖRR, Felipe A.; ETCHEGARAY, Augusto; PINTO, Ernani; MCKINNIE, Shaun M. K.; FIORE, Marli F.; MOORE, Bradley S. **Biosynthesis of Guanitoxin Enables Global Environmental Detection in Freshwater Cyanobacteria.** J. Am. Chem. Soc. 2022. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c01424>.

LOMBARDI, Simone Pacheco. **Estudo funcional de um locus de regeneração (Rg1) vindo de Solanum peruvianum, uma espécie selvagem relacionada ao tomateiro.** Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 2008.

LOPES, Carla Vanessa Alves; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti. **Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática.** Saúde debate. 2018.

LUDWICZUK, A. SKALICKA-WOZNIAK, K. GEORGIEV, M.I. **Terpenoids.** Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies 2017, Pages 233-266.

MAHMOOD, Nik A.; CARMICHAEL, Wayne W. **The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17.** Toxicon. V. 24. Issue 5. 1986.

MAHMOOD, N.A., CARMICHAEL, W.W., 1987. **Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17.** Toxicon 25, 1221–1227. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90140-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90140-1)

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. 49, 500–503. 1988.

MANDAL, Sikha; RATH, Jnanendra. **Extremophilic Cyanobacteria for Novel Drug Development.** Vol. 7. Springer, Berlin. 2014

MANKIEWICZ-BOCZEK, Joanna; IZYDORCZYK, Katarzyna; ROMANOWSKA-DUDA, Zdzisława; JURCZAK, Tomasz; STEFANIAK, Karolina; KOKOCINSKI, Mikolaj. **Detection and monitoring toxigenicity of cyanobacteria by application of molecular methods.** Environmental Toxicology. 2006. [doi.org/10.1002/tox.20200](https://doi.org/10.1002/tox.20200).

MARGULIS, Lynn; SAGAN, Dorion. **Microcosmos: four billion years of evolution from our microbial ancestors.** 1986. New York: Summit Books.

MARQUES, L. **Capitalismo e colapso ambiental.** Campinas: Editora da Unicamp, 2015.

MARX, K. **O capital.** S o Paulo: Nova Cultural, 1985.

METCALF, J.S.; R. RICHER, P.A. COX, G.A. Codd, **Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health.** Science of The Total Environment. 2012.

METCALF, James S.; BANACK, Sandra Anne; POWELL, James T.; TYMM, Fiona J. M.; MURCH, Susan J.; BRAND, Larry E.; COX, Paul Alan. **Public health responses to toxic cyanobacterial blooms: perspectives from the 2016 Florida event.** Water Policy. V. 20. Issue 5. 2018.

METCALF, James S.; CODD, Geoffrey A. **Co-Occurrence of Cyanobacteria and Cyanotoxins with Other Environmental Health Hazards: Impacts and Implications.** Toxins 2020, 12(10), 629; <https://doi.org/10.3390/toxins12100629>

MOLICA, Renato J.R.; OLIVEIRA, Eduardo J.A.; CARVALHO, Paulo V.V.C.; COSTA, Anapaula N.S.F.; CUNHA, Maristela C.C.; MELO, Gustavo L.; AZEVEDO, Sandra M.F.O. **Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply.** Harmful Algae V. 4. Issue 4. 2005.

MONSERRAT, José María; YUNES, Joao Sarkis; BIANCHINI, Adalto. **Effects of Anabaena spiroides (cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species.** Environmental Toxicology and Chemistry. V. 20. Issue 6. 2001.

MOREIRA, Cristiana; RAMOS, Vitor; AZEVEDO, Joana; VASCONCELOS, Vitor. **Methods to detect cyanobacteria and their toxins in the environment.** Applied Microbiology and Biotechnology. Volume 98, pages 8073–8082 (2014). DOI 0.1007/s00253-014-5951-9.

MOREIRA, Leonardo Fernandes; DE OLIVEIRA, João Sabino; DE ARAÚJO, José Geraldo Fernandes; BRAGA, Geraldo Magela. **Impacto ambiental e administração de problemas toxicológicos na utilização de inseticidas agrícolas.** 1996.

NASCIMENTO, Luciano; MELNYK, Anastasiia. **A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde.** Revista Mangaio Acadêmico, V. 1. N.1. 2016.

NICHOLSON, B. C.; BURCH, M. D. **Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines.** Canberra: Commonwealth of Australia, 2001.

ODOKUMA, L.O.; ISIRIMA, J.C. **Distribution of cyanotoxins in aquatic environments in the Niger Delta.** African Journal of Biotechnology. Issue V. 6. N. 20. 2007.

OKUYAMA, Julia Hiromi Hori; GALVÃO, Taís Freire; SILVA, Marcus Tolentino; Grupo Datatox. **Intoxicações e fatores associados ao óbito por agrotóxicos: estudo caso controle, Brasil, 2017.** Rev. bras. epidemiol. 23. 2020. <https://doi.org/10.1590/1980-549720200024>.

ONODERA, Hideyuki; OSHIMA, Yasukatsu; HENRIKSEN, Peter; YASUMOT, Takeshio. **Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish Lakes.** *Toxicon*. V. 35. Issue 11. 1997.

PARK, Jeong Ah; SEO, Yoseph; SOHN, Hiesang; PARK, Chulhwan; MIN, Junhong; LEE, Taek. **Recent Trends in Biosensors Based on Electrochemical and Optical Techniques for Cyanobacterial Neurotoxin Detection.** *BioChip Journal* (2022). doi.org/10.1007/s13206-022-00054-3.

PAMPOLINI, Flavia; RODRIGUES, Thais B.; LEELESH, Ramya S.; KAWASHIMA, Tomokazu; RIESKE, Lynne K. **Confocal microscopy provides visual evidence and confirms the feasibility of dsRNA delivery to emerald ash borer through plant tissues.** *Journal of Pest Science* volume 93, pages 1143–1153 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01230-w>

PARRIS, Jennifer T.; WAYNE, W.; Carmichael; Susan B. Jones. **In vitro inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain Cholinesterase activity by anatoxin-a(s), a cyanobacterial neurotoxin: a comparison with dichlorvos and carbaryl.** *SIL Proceedings*. V. 27. Issue 5. 2000.

PARRÓN, Tesifón; REQUENA, Mar; HERNÁNDEZ, Antonio F.; ALARCÓN, Raquel. **Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems.** *Toxicology Letters* Volume 230, Issue 2, 15 October 2014, Pages 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.11.009>.

PASSOS, L.S.P., GOMES, L.C., PEREIRA, T. M., SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; DAL PONT, G., OSTRENSKY, A.; PINTO, E. **Response of *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) exposed to a guanitoxin-producing cyanobacterial strain using multiple biomarkers.** *Science of The Total Environment*. Volume 835, 20 August 2022, 155471. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155471.

PASSOS, Larissa Souza; JACINAVICIUS, Fernanda Rios; GERALDES, Vanessa; DE FREITAS, Paloma Nathane Nunes; DA SILVA, Gabriela Helena; DE ALMEIDA, Éryka Costa; ALVES, Angélica Priscila do Carmo; ORLANDO, Tamira Maria; CEROZI, Brunno da Silva; MARTINEZ, Diego Stefani Teodoro; PINTO, Ernani. **Ecotoxicological assessment of guanitoxin-producing cyanobacteria in *Danio rerio* and *Daphnia similis*.** *Chemosphere* Volume 332, August 2023, 138846. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138846

PAULINO-LIMA, Ivan Gláucio; LAGE, Claudia de Alencar Santos. **Astrobiologia: definição, aplicações, perspectivas e panorama brasileiro.** *Bull Soc Astron Bras*. 29. N. 1, 14-21. 2010.

PEARSON, Leanne A. & NEILAN, Brett A. **The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk.** *Current Opinion in Biotechnology* Volume 19, Issue 3, June 2008, Pages 281-288. doi.org/10.1016/j.copbio.2008.03.002.

PERCIVAL, Steven L.; WILLIAMS, David W. **Cyanobacteria**. In: PERCIVAL, Steven et al. *Microbiology of Waterborne Diseases*. 2. Ed. London: Elsevier Ltd, Cap 5.p.696. 2014.

PRASANNA, R.; SOOD, A.; JAISWAL, P.; NAYAK, S.; GUPTA, V.; CHAUDHARY, V.; JOSHI, M.; NATARAJAN, C. **Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds**. *Appl Biochem Microbiol*. 46 (2): 133-47. 2010.

PRUGH, Amber M.; COLE, Stephanie D.; GLAROS, Trevor; ANGELINI, Daniel j. **Effects of organophosphates on the regulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation**. *Chem Biol Interact* . 2017 Mar 25;266:38-46. doi: 10.1016/j.cbi.2017.01.020. Epub 2017 Feb 4.

RAJANIEMI, Pirjo; HROUZEK, Pavel; KAŠTOVSKÁ, Klára; WILLAME, Raphaël; RANTALA, Anne; HOFFMANN, Lucien; KOMÁREK, Jiří; SIVONEN, Kaarina. **Phylogenetic and morphological evaluation of the genera Anabaena, Aphanizomenon, Trichormus and Nostoc (Nostocales, Cyanobacteria)**. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Volume 55, Issue 1. 2005. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63276-0>

RASBAND, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.

RASTOGI, Rajesh.P; SINHA, Rajeshwar.P; INCHSROENSAKDI, Aran. **The cyanotoxin-microcystins: current overview**. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. V. 13. 2014.

REVIERS, Bruno. **Biologia e filogenia das algas**. Capítulo 1. Editora artmed. 1ª edição. São Paulo. 2018.

RIBAS, Priscila Pauly; MATSUMURA, Aida Teresinha Santos. **A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente**. *Revista Liberato*. V. 10. N. 14. 2009.

RIPPKA, Rosmarie., DERUELLES, Josette., WATERBURY, John., HERDMAN, Michael.; STANIER, Roger. Y. **Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria**. *Journal of General Microbiology*. 1979.

RODRIGUES, Eduardo Henrique Costa; DE-CARLI, Bruno Paes; VICENTIN, Aline Martins; POMPÊO, Marcelo Luiz Martins; CARLOS, Viviane Moschini. **Cianobactérias e cianotoxinas em ambientes aquáticos: uma breve revisão sobre os principais métodos de detecção, remoção e seus impactos sobre a saúde humana**. *Boletim do laboratório de hidrobiologia*, 31(1):1-18. 2021.

RODRIGUEZ, Vania; MOURA, Sidnei; PINTO, Ernani; PEREIRA, Claudio M. P.; BRAGA. **Aspectos toxicológicos e químicos da Anatoxina-a e seus análogos**. *Divulgação. Química Nova*. 2006.

RODRIGUEZ, Vania; MORI, Bruno; DÖRR, Felipe A.; BELO, Cháriston A. Dal; COLEPICOLA, Pio; PINTO, Ernani. **Effects of a cyanobacterial extract containing-anatoxin-a(s) on the cardiac rhythm of *Leurolestes circunvagans*.** Articles • Rev. bras. farmacogn. 22 (4). Aug 2012. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000073>.

Royal Society of Chemistry. **ChemSpider. Search and share chemistry. Guanitoxin.** <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.102921.html>>. Disponível em: 16/05/2022.

SALMASO, Nico; VASSELON, Valentin., et al. **DNA sequence and taxonomic gap analyses to quantify the coverage of aquatic cyanobacteria and eukaryotic microalgae in reference databases: Results of a survey in the Alpine region.** Science of The Total Environment Volume 834, 15 August 2022, 155175.

SÁNCHEZ-BARACALDO, Patricia; CARDONA, Tanai. **On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria.** New Phytologist. Volume 225, Issue 4. 2020. <https://doi.org/10.1111/nph.16249>.

SANTOS, Alessandra Antunes. **Efeito reativador de oximas frente à inibição da enzima acetilcolinesterase cerebral induzida por malation e malaoxon.** Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Bioquímica. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

SANTOS, Nathalia Freitas; CONTRERA, Luciana; TESTON, Elen Ferraz; KAWAKAME, Patricia Moita Garcia; REIS, Laura Elis Aguero; AMARILHA, Kelven Jones de Oliveira. Evidências dos efeitos neurotóxicos por exposição ao agrotóxico: uma revisão integrativa. **Brazilian Journal of Development.** Vol 6, No 12 (2020). DOI:10.34117/bjdv6n12-640

SANTOS, D.S., ROSA, M.E., ZANATTA, A.P., OLIVEIRA, R.S., DE ALMEIDA, C.G.M., LEAL, A.P., SANZ, M., FERNANDES, K.A., DE SOUZA, V.Q., de Assis, D.R., 2019. **Neurotoxic effects of sublethal concentrations of cyanobacterial extract containing anatoxin-a (s) on *Nauphoeta cinerea* cockroaches.** Ecotoxicol. Environ. Saf. 171, 138–145.

SANSEVERINO, Isabella; ANTÓNIO, Diana Conduto; LOOS, Robert; LETTIERI, Teresa. **Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection.** JRC Technical Reports. 2017. EUR 28624; doi:10.2760/36186

SANZ, Miriam; DÖRR, Felipe Augusto; PINTO, Ernani. **First report of spumigin production by the toxic *Sphaerospermopsis torques-reginae* cyanobacterium.** Toxicon. 108 (2015) 15-18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.019>.

SANZ, Miriam; SALINAS, Roberto Kopke; PINTO, Ernani. **Namalides B and C and Spumigins K–N from the Cultured Freshwater Cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae*.** J. Nat. Prod. 2017, 80, 9, 2492–2501. 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00370>.

SAVALL, Anne; BONEBERG, Allyson; FIDÉLIS, Eduarda Monteiro; PINTON, Simone; ROOS, Daniel Henrique. **Oximas e seu papel na reativação da ache pela intoxicação aguda por organofosforados**. v. 10 n. 2 (2018): Anais do 10º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNIPAMPA :Salão de Pesquisa-Pôster.

SCHIRRMEISTER, Bettina E.; DE VOS, Jurriaan M.; ANTONELLI, Alexandre; BAGHERI, Homayoun C. **Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event**. PNAS. January 29, 2013.vol. 110. No. 5|1791–1796. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209927110>

SCHIRRMEISTER, Bettina E.; GUGGER, Muriel; DONOGHUE, Philip C. J. **Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils**. Palaeontology, Vol. 58, Part 5, 2015, pp. 769–785. <https://doi.org/10.1111/pala.12178>

SCIACCA, G.; REGGIO, E.; MOSTILE, G.; NICOLETTI, A.; DRAGO, F.; SALOMONE, S.; ZAPPIA, M. **Clinical and CN-SFEMG evaluation of neostigmine test in myasthenia gravis**. Neurol Sci 39, 341–345 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10072-017-3194-0>

SHIELS, Katie; BROWNE, Norma; DONOVAN, Fiona; MURRAY, Patrick; SAHA, Sushanta Kumar. **Molecular Characterization of Twenty-Five Marine Cyanobacteria Isolated from Coastal Regions of Ireland**. Biology 2019, 8(3), 59; <https://doi.org/10.3390/biology8030059>.

SILVA, Luiz Felipe Barros. **Uma análise marxista da agricultura capitalista: em busca de uma solução**. Brasília, v. 23, n. 48, janeiro a junho de 2021 Artigos temáticos / Thematic articles DOI: 10.26512/sersocial.v23i48.33841.

SILVA, Kaline Catiely Campos. **Caracterização da Acetilcolinesterase cerebral de tucunaré, Cichla ocellaris (BLOCH & SCHNEIDER, 1801): efeito de íons e pesticidas organofosforados e carbamatos sobre sua atividade**. Recife, 2012. 78 f.: Dissertação (mestrado) - UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2012.

SINGH, Nirbhay Kumar; DHAR, Dolly Wattal; TABASSUM, Rizwana. **The role of Cyanobacteria in crop protection**. Biological Sciences. 86 (1): 1-8. 2016.

SINGH, Sarat; SHARMA, Ranji; PARWEEN, Talat; PATANJALI, P.K. **Pesticide contamination and human risk factor**. Modern Age Environmental Problems and their Remediation. 2018.

SMARDA, Jan; SMAJS, David; KOMRSKA, Jiri; Krzyzanek, Vladislav. **S-layers on cell walls of cyanobacteria**. Micron 33 (2002) 257-277.

SOUZA, J. C. de.; NACIF, A. de P.; SALGADO, L. O. **Traça do tomateiro histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1983. 15p.



SOUZA, Wallace Rafael de. **Potencial de cianobactérias cultivadas em meio suplementado com vinhaça para produção de biodiesel**. 2018. Dissertação de Mestrado. CENA. Universidade de São Paulo. 2018.

SOUZA, Larissa Costa de. Silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) em traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick): abordagens de entrega do dsRNA. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 2022.

STANIER, R. Y; COHEN-BARIZE, G. **Phototrophic prokaryotes**. The cyanobacteria Annual Reviews of Microbiology. 1977. 31: 225-274.

SVIRČEV, Z.; LALIĆ, D., BOJADŽIJA SAVIĆ, G. et al. **Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings**. Arch Toxicol 93, 2429–2481 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>

TILLET, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; VON DOHREN, H.; BORNER, T.; NEILAN, B. A. **Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system**. Chemistry & Biology, v. 7, n. 10, p. 753-764, 2000.

TOMITANI, Akiko; KNOLL, Andrew. H; CAVANAUGH, Colleen M.; OHNO, Terufumi. **The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006.

URBANEJA, A.; VERCHER, R.; NAVARRO V.; PORCUNA JL.; GARCÍA MARÍA F. **La polilla del tomate, *Tuta absoluta***. *Phytoma Esp.* 194:16-23. 2007.

VAN APELDOORN, Marian E.; VAN EGMOND, Hans P.; SPEIJERS, Gerrit J. A.; BAKKER, Guido J. I. **Toxins of cyanobacteria**. Molecular Nutrition Food Research. 2007.

VALENZUELA, Patricia M.; MATUS, M. Soledad; ARAYA, Gabriela I.; PARIS, Enrique. **Environmental pediatrics: an emerging issue**. *Jornal de Pediatria*. 2011. 0021-7557/11/87-02/89

VENDRAMIM, José Djair; THOMAZINI, Ariane Paes de Barros Werckmeister. **Traça *Tuta absoluta* (Meyrick) em cultivares de tomateiro tratadas com extratos aquosos de *Trichilia pallida* Swartz**. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 58(3). Set 2001. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000300025>.

VERMAAS, Wim Fj. **Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria**. Encyclopedia of life sciences. 2001. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001670>

VOGIAZI, Vasileia; DE LA CRUZ, Armah; MISHRA, SIDDARTH; SHANOV, VESSELIN; HEINEMAN, William R.; DIONYSIOU, Dionysios D. **A Comprehensive Review: Development of Electrochemical Biosensors for Detection of Cyanotoxins in Freshwater**. *ACS Sens.* 2019, 4, 1151–1173. [10.1021/acssensors.9b00376](https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00376).

WERNER, V.R., LAUGHINGHOUSE IV, H.D., FIORE, M.F., SANT'ANNA, C.L., HOFF, C., SANTOS, K.R S., NEUHAUS, E.B., MOLICA, R.J.R., HONDA, R.Y., ECHENIQUE, R.O., 2012. **Morphological and molecular studies of *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria, Nostocales) from South American water blooms.** *Phycologia* 51, 228–238. <https://doi.org/10.2216/11-32.1>

WILLÉN, Torbjörn; MATTSSON, Roland. **Water-blooming and toxin-producing cyanobacteria in Swedish fresh and brackish waters, 1981-1995.** *Hydrobiologia*. 1997.

YANG, Ziheng; RANNALA, Bruce. **Molecular phylogenetics: principles and practice.** *Nature Reviews Genetics*. Volume 13, pages 303–314 (2012).

YARPUZ-BOZDOGAN, Nigar. **The importance of personal protective equipment in pesticide applications in agriculture.** *Current Opinion in Environmental Science & Health* Volume 4, August 2018, Pages 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.02.001>.

YUNES, J. S.; CUNHA, N. T.; BARROS, L. P; PROENÇA, L. A. O.; MONSERRAT, J. M. **Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazilian Freshwaters.** *Comments on Toxicology*. V.9. 2003.

ZABLEN, L.B.; KISSIL, M.S.; WOESE, C.R.; BUETOW, D.E. **Phylogenetic origin of the chloroplast and prokaryotic nature of its ribosomal RNA.** *PNAS*. Vol. 72 | No. 6. 1975.



## ANEXO

Tabela 3. Exposição aguda por 48 horas ao extrato bruto liofilizado da cepa ITEP-024 em três diferentes concentrações (62,5 mg/L, 125mg/L e 250mg/L), controle negativo (água ultrapura), controle positivo (malathion 500 Ce), aplicados em microtomateiro (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM) com *Tuta absoluta* no estágio larval (L1).

Repetições	Tratamentos																			
	Água ultrapura			62,5mg/L			125 mg/L			250 mg/L			Malathion 500 Ce							
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C					
1 <sup>a</sup>	X	1	1	1	X	0	1	0	X	0	0	0	X	0	1	1	X	0	0	0
	Y	1	1	1	Y	1	1	0	Y	1	0	1	Y	0	0	0	Y	0	0	0
2 <sup>a</sup>	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C					
	X	1	1	0	X	0	1	1	X	1	0	0	X	0	0	0	X	0	0	0
	Y	0	1	0	Y	1	0	1	Y	0	0	0	Y	0	0	1	Y	0	0	0
3 <sup>a</sup>	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C					
	X	1	1	0	X	1	1	1	X	0	1	0	X	0	0	0	X	0	0	0
	Y	1	0	0	Y	0	0	0	Y	1	0	0	Y	0	0	0	Y	0	0	0
4 <sup>a</sup>	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C					
	X	1	1	1	X	1	0	1	X	0	0	0	X	1	1	0	X	0	0	0
	Y	1	1	0	Y	0	1	1	Y	1	0	0	Y	0	0	0	Y	0	0	0
5 <sup>a</sup>	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C					
	X	1	1	1	X	0	0	1	X	1	0	0	X	0	0	0	X	0	0	0
	Y	1	1	1	Y	0	0	0	Y	0	0	0	Y	1	0	1	Y	0	0	0
6 <sup>a</sup>	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C					
	X	1	1	0	X	0	0	0	X	1	0	0	X	1	1	0	X	0	0	0
	Y	1	1	0	Y	0	1	0	Y	0	0	1	Y	0	1	0	Y	0	0	0
7 <sup>a</sup>	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C					
	X	1	1	1	X	0	0	0	X	0	1	0	X	1	0	0	X	0	0	0
	Y	1	1	0	Y	1	1	1	Y	1	0	1	Y	0	1	1	Y	1	0	0

Legenda: A, B e C representam os 3 folíolos do lado direito (X) e esquerdo (Y) de cada planta. Utilizou-se 1 para insetos encontrados vivos em cada folíolo e 0 para aqueles que foram encontrados mortos em cada folíolo.

Tabela 4. Exposição aguda por 48 horas ao extrato bruto liofilizado da cepa ITEP-024 em três diferentes concentrações (62,5 mg/L, 125mg/L e 250mg/L) e controle negativo (água ultrapura), aplicados em micro placas com *Tuta absoluta* no estágio embrionário (ovos) para análise de eclosão.

Repetições	Tratamentos			
	Água ultrapura	250mg/L	125 mg/L	62,5mg mg/L
1 <sup>a</sup>	5	1	3	4
2 <sup>a</sup>	4	2	3	5
3 <sup>a</sup>	5	3	2	3
4 <sup>a</sup>	5	5	4	4
5 <sup>a</sup>	5	1	5	3

Legenda: Os valores representam o número de ovos eclodidos, com variação de 0 à 10, sendo 0 nenhuma eclosão observada e 10 todos os ovos eclodidos.