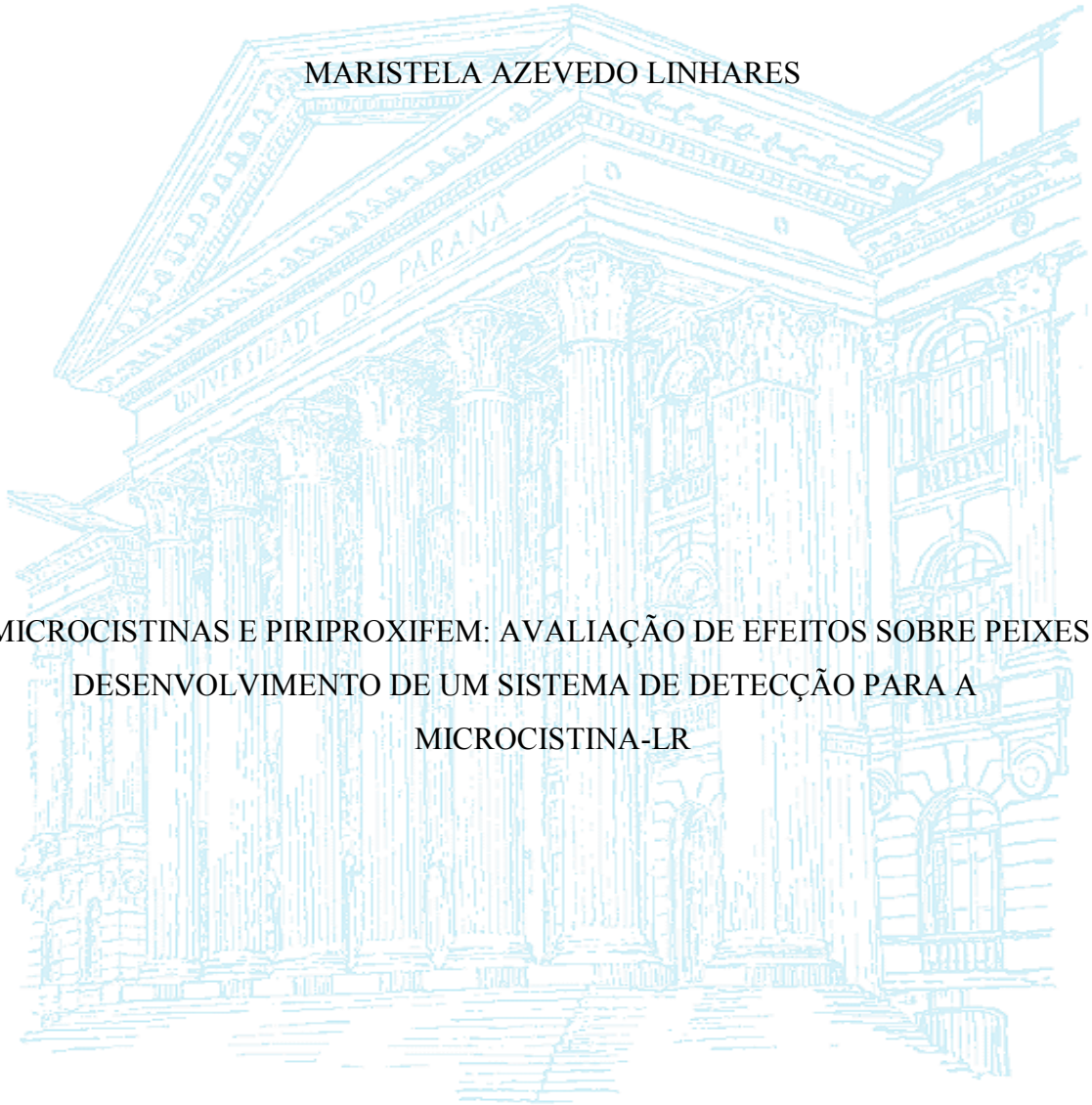
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARISTELA AZEVEDO LINHARES



MICROCISTINAS E PIRIPROXIFEM: AVALIAÇÃO DE EFEITOS SOBRE PEIXES E DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE DETECÇÃO PARA A MICROCISTINA-LR

CURITIBA

2018

MARISTELA AZEVEDO LINHARES

MICROCISTINAS E PIRIPROXIFEM: AVALIAÇÃO DE EFEITOS SOBRE PEIXES E DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE DETECÇÃO PARA A MICROCISTINA-LR

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Co-orientador: Dr. Alexandre Dias Tavares Costa

CURITIBA
2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Linhares, Maristela Azevedo
Microcistinas e Piriproxifem : avaliação de efeitos sobre peixes e desenvolvimento de um sistema de detecção para a microcistina-LR. / Maristela Azevedo Linhares . – Curitiba, 2018.
180 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Co-orientador: Alexandre Dias Tavares Costa

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Pesticidas 2. Toxinas 3. Desreguladores endócrinos 4. Biomarcadores 5. Técnicas biossensoriais I. Título II. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira, 1960- III. Costa, Alexandre Dias Tavares IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 615.907

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MARISTELA AZEVEDO LINHARES** intitulada: **Microcistinas e Piriproxifem - avaliação de efeitos sobre peixes e desenvolvimento de um sistema de detecção para a microcistina - LR**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de Fevereiro de 2018.

CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO
Presidente da Banca Examinadora

JULIO CESAR RODRIGUES DE AZEVEDO
Avaliador Externo

MARCOS LUIZ PESSATTI
Avaliador Externo

LIA SUMIE NAKAO
Avaliador Interno

LUIZ HUMBERTO MARCOLINO JUNIOR
Avaliador Externo

Para minha família.

Por todo o seu apoio, amor e compreensão durante as minhas jornadas acadêmicas;

por terem sempre me ajudado a deixar florescer o meu amor pela ciência.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, qualquer que seja Sua forma ou natureza, por ter me concedido disposição, motivação e principalmente sabedoria para realizar tão complexo trabalho.

Ao Prof. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro e ao Dr. Alexandre Dias Tavares Costa, pelas sábias e sempre válidas contribuições de orientação e por acreditarem na minha capacidade em desenvolver este tema.

Agradeço ao Prof. Francisco Filipak Neto por suas grandes contribuições neste trabalho.

Agradeço aos meus familiares, em particular ao meu marido Robson, pelo apoio nos momentos em que mais precisei ter foco nas longas jornadas de estudo e por entenderem as eventuais oscilações de humor, que são consequência de tal estado de concentração, e sempre oferecerem ouvidos e ombros acolhedores.

Agradeço aos amigos e colegas solidários nesta grande jornada. Agradeço imensamente à Nilce Mary Folle, minha querida companheira de bancada, de coletas e debates sobre biologia e sobre a vida. Agradeço também a amizade e toda ajuda de Letícia T. Medeiros, Patricia Manuitt, Tugstênio Lima, Satar Gemusse, Angie Souza, Flávia Yamamoto, Izabella Brito, Magda Costa e Mariane Peres Pereira! Sou eternamente grata a vocês!

Agradeço aos amigos e colegas do Tecpar, em especial à Eliane Joakimson, grande amiga, que assumiu muitas das minhas atividades para que eu pudesse realizar esse sonho. Igualmente, agradeço a Kelly Joakimson, que foi meu braço direito nas atividades do Tecpar. Sem voces duas, todo esse trabalho não teria sido possível.

Agradeço ainda à Sirlene Figueiredo, minha querida amiga que sempre rezou e torceu por mim. Agradeço a torcida da Carmen, do Rafa, do Guimarães e toda ajuda que obtive dos colegas do Tecpar durante esses anos.

Agradeço ainda, ao Tecpar pela liberação para a realização deste trabalho, à Universidade Federal do Paraná, ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná, à Fundação Carlos Chagas, ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, à Psicicultura Panamá e à Fundação 25 de julho, por terem aberto as portas para mim.

Agradeço a todos que se dispuseram a me ajudar de alguma forma!

Agradeço aos membros da banca pela disposição em avaliar este trabalho e oferecer sugestões pertinentes.

E, finalmente, mas não menos importante, às pequenas “pessoas felinas” Margot, Maitê, Aimée, Ariel e Lívia (em doce memória), pelo carinho simples e puro e por conseguirem elevar meu ânimo, mesmo nos momentos mais complicados, com seus miados, trejeitos e fofura.

RESUMO

Este trabalho reúne dados sobre a avaliação de baixos níveis de exposição da toxina microcistina-LR (MC-LR) e do pesticida piriproxifem (Py) em peixes juvenis ou em estágios iniciais de desenvolvimento. É apresentada também uma avaliação para o desenvolvimento de um sistema para a detecção de MC-LR. No primeiro capítulo são apresentados e discutidos os resultados dos efeitos isolados de ambas as moléculas através de experimento subcrônico (60 dias) sobre a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). No Capítulo II, os resultados referem-se aos estudos dos efeitos de misturas entre os dois compostos sobre os estágios iniciais de desenvolvimento em jundiá *Rhamdia quelen*, com exposição até 96 h pós-fertilização dos ovos, seguido da aplicação de um modelo matemático para previsão da densidade populacional em longo prazo. No capítulo III são apresentadas algumas estratégias para o desenvolvimento de um sistema biossensor para a detecção de MC-LR, com a utilização de aptâmeros em técnicas com microplaca e ensaios eletroquímicos – voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). O trabalho desenvolvido é justificado pela crescente ocorrência de microcistinas em reservatórios e mananciais, e pelo uso recente do piriproxifem no controle do vetor *Aedes aegypti*, transmissor de algumas enfermidades como a Dengue, Chikungunya, Zika virus e potencialmente da Febre Amarela. No Capítulo I, após exposição trófica a 6 aplicações de microcistina-LR (MC-LR) (extrato algal ou padrão comercial) (0.04, 0.4 e 4 $\mu g.kg^{-1}.dia^{-1}$) ou exposição hídrica ao piriproxifem (0,3 e 2 $\mu g.L^{-1}$), os resultados indicaram que os animais nessas concentrações não são afetados quanto ao seu padrão geral de saúde. No entanto, quando expostos ao extrato algal foi detectado um aumento significativo na expressão da proteína vitelogenina (vtg) em machos e uma variação menor nos níveis de atividade da acetilcolinesterase no músculo, nos animais expostos à maior dose do padrão da MC-LR. No Capítulo II foi avaliada a exposição isolada e conjunta sobre os estágios iniciais do desenvolvimento de *R. quelen* expostos ao extrato algal (1, 10 e 100 $\mu g.L^{-1}$) e piriproxifem (0,10 a 2,44 $\mu g.L^{-1}$). Os resultados indicaram redução da taxa de sobrevivência e deformidades para os grupos de 10 $\mu g.L^{-1}$ de MC-LR e 0,10 $\mu g.L^{-1}$ de Py bem como para algumas das combinações consideradas. Houve ainda previsão de redução populacional através do modelo matemático destacando efeitos de sinergismo e antagonismo com as misturas. Finalmente, no Capítulo III, os testes em microplacas não se mostraram viáveis (baixa fluorescência e formato sanduíche inadequado para a detecção da MC-LR) e nos testes eletroquímicos, após vários ajustes nos protocolos e uma alteração na constituição dos dispositivos, os resultados se mostraram promissores, mas estudos posteriores são necessários com o intuito de confirmar esses resultados. Em conjunto, os dados apresentados nesse estudo foram evidentes ao destacar que os efeitos em níveis baixos de exposição à MC-LR e piriproxifem dependem do estágio do ciclo de vida da espécie. O protótipo de sistema de detecção ainda precisa ser aprimorado e validado, mas promete ser um biossensor sensível e específico, barato, reciclável e com potencial de ser aplicado em campo.

Palavras-Chave: Microcistina-LR. Piriproxifem. Desregulação Endócrina. Biomarcadores. Biossensor. *Oreochromus niloticus. Rhamdia quelen.*

ABSTRACT

This work assembles data on the evaluation of low levels of exposure of microcystin-LR toxin (MC-LR) and pesticide pyriproxyfen (Py) in juvenile fish or in early stages of development. An evaluation is also presented for the development of a system for the detection of MC-LR. In the first chapter the results of the isolated effects of both molecules through subchronic experiment (60 days) on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) are presented and discussed. In Chapter II, the results refer to the studies of the effects of mixtures between the two compounds on the initial stages of development in jundiá *Rhamdia quelen*, with exposure up to 96 h after fertilization of the eggs, followed by the application of a mathematical model for prediction population density in the long term. In chapter III some strategies for the development of a biosensor system for the detection of MC-LR are presented, with the use of aptamers in techniques with microplate and electrochemical tests - cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The work developed is justified by the increasing occurrence of microcystins in reservoirs and springs, and by the recent use of pyriproxyfen in the control of the *Aedes aegypti* vector, which transmits some diseases such as Dengue, Chikungunya, Zika virus and potentially Yellow Fever. In Chapter I, after trophic exposure to 6 applications of microcystin-LR (MC-LR) (algal extract or commercial standard) (0.04, 0.4 and 4 μg $kg^{-1}dia^{-1}$) or water exposure to pyriproxyfen (0.3 and 2 μg L^{-1}), the results indicated that animals at these concentrations are unaffected as to their overall health pattern. However, when exposed to algal extract, a significant increase in vitelogenin (vtg) protein expression was detected in males and a lower variation in the levels of acetylcholinesterase activity in the muscle, in the animals exposed to the higher dose of the MC-LR standard. In Chapter II, the isolated and joint exposure on the initial stages of development of R. quelen exposed to the algal extract (1, 10 and 100 μg L^{-1}) and pyriproxyfen (0.10 to 2.44 μg L^{-1}). The results indicated reduction of survival rate and deformities for the 10 μg.L^{-1} MC-LR and 0.10 μg L^{-1} groups of Py as well as for some of the combinations considered. There was also prediction of population reduction through the mathematical model highlighting effects of synergism and antagonism with the mixtures. Finally, in Chapter III, the microplate tests were not viable (low fluorescence and inadequate sandwich format for the detection of MC-LR) and in the electrochemical tests, after several adjustments in the protocols and a change in the constitution of the devices, the results were showed promising, but further studies are needed to confirm these results. Taken together, the data presented in this study were evident in highlighting that the effects on low levels of exposure to MC-LR and pyriproxyfen depend on the stage of the life cycle of the species. The prototype detection system still needs to be improved and validated, but it promises to be a sensitive, specific, inexpensive, recyclable biosensor with the potential to be applied in the field.

Keywords: Microcystin-LR. Pyriproxyfen. Endocrine Disruption. Biomarkers. Biosensor. *Oreochromus niloticus*, *Rhamdia quelen*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da microcistina-LR. Fonte: Mayumi et al., 2006. **20**

Figura 2. Estrutura molecular do piriproxifem. Fonte: sullivan, 2000. **21**

Figura 3. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758). Perciformes:Cichlidae. Fonte: <http://ffish.asia/?p=none&o=ss&id=394>. **37**

Figura 4. Diagrama esquemático da montagem dos tanques para o experimento de exposição trófica de *O. niloticus* à microcistina-LR. C= controle; E= extrato algal; Pu= toxina purificada. 1= dose de 0,04 µg kg^{-1} dia^{-1}; 2 = dose de 0,4 µg kg^{-1} dia^{-1} e 3 = dose de 4 µg kg^{-1} dia^{-1}. **38**

Figura 5. Diagrama esquemático da montagem dos tanques para o experimento de exposição hídrica de *O. niloticus* ao piriproxifem (sumilarv®). Duas concentrações foram utilizadas: P1= 10 µg L^{-1} e P2= 100 µg L^{-1}. Os valores entre parênteses correspondem aos valores máximos encontrados (em µg L^{-1}) de concentração do piriproxifem medidos nas soluções dos tanques. **39**

Figura 6. Diagrama esquemático da preparação das placas de 96 poços para o experimento de exposição hídrica de embriões/larvas de *Rhamdia quelen* à microcistina-LR e ao piriproxifem (sumilarv®) por 96 horas pós fertilização. Cada poço representa 96 poços de uma placa. Foram preparadas quatro placas por tratamento. C=controle. M= microcistina-LR (MC-LR); m seguido dos números 1, 2 e 3, representam, respectivamente, as concentrações de 1 µgL^{-1}, 10 µgL^{-1} e 100 µgL^{-1} de MC-LR. P= piriproxifem. P seguido de 1 e 2, correspondem a concentrações calculadas de 10 µg L^{-1} e 100 µg L^{-1}, respectivamente. Os valores entre parênteses correspondem aos valores reais (em µgL^{-1}) de concentração do piriproxifem medidos nas soluções de contaminação das placas. **49**

Figura 7. Jundiá (*Rhamdia quelen*) (Quoy & Gaimard, 1824). Siluriformes, Heptapteridae50. Fonte: http://www.fishbase.se/summary/23351. **50**

Figura 8. Sequência de eventos para a fertilização artificial de ovos de jundiás. Inicialmente foram selecionados exemplares adultos e saudáveis, de ambos os sexos. A= as fêmeas foram tratadas com duas injeções de extrato hipofisário de carpa (C*yprinus carpio*), com intervalo de 8 h. B= após atingir o momento da desova, as fêmeas e machos (c) tiveram seus ventres pressionados, sendo os gametas liberados e misturados em repiciente de plástico com o auxílio de uma espátula (não mostrado). Após a mistura, os gametas foram hidratados embalados para transporte (não mostrado) **51**

CAPÍTULO I

Figure 1. Immunodetection of vitellogenin in plasma of *O. niloticus* after exposure to microcystin-LR by SDS_PAGE (a) and Western Blot (b and c). Codes: E1= algal extract at 0.04 µgL^{-1}.day^{-1}MC-LR, E2= 0.4 µgL^{-1} MC-LR.day^{-1} and E3 = 4 µgL^{-1} day^{-1} MC-LR. P1, p2 and p3 represent the sames doses above, but for purifiedstandard microcistin-LR. F represents females, m, males, c, control group, m= marker. The number after f or m represents the animal identification. *= positivity for vitellogenin. Arrows indicate molecular weight region of two bandss of vitellogenin (around 120 kda). SDS-PAGE was stained with coomassie blue and the result for presence of vitellogenic was confirmed by Western Blot. **79**

CAPÍTULO II

Figure 1. Percentage of hatching in embryos of *Rhamdia quelen* exposed to 1 μg L^{-1} (M1), 10 μgL^{-1} (M2), 100 μgL^{-1} (M3) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 μgL^{-1} (P1) and 0.84 μg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixtures of both chemicals (P1M1, P2M1, etc) at 28 hpf (hours post-fertilization). Exposure started 8 hpf so that at 28 hpf embryos had been exposed for 20 h. N=4. Kruskal-Wallis followed by Dunns Post-test. *p<0.05 and **p<0.01 for comparison to the control. **99**

Figure 2. Percentage of survival of embryos/larvae of *Rhamdia quelen* exposed to 1 μgL^{-1} (M1), 10 μg L^{-1} (M2), 100 μg L^{-1} (M 3) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 μg L^{-1} (P1) and 0.84 μg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixture of both chemicals (P1M1, P2M1, etc) at 28, 48, 72 and 96 hpf (hours post-fertilization). Exposure started 8 hpf so that the period of exposure is hpf – 8 (e.g. 28 hpf → 20 h of exposure). N=96-192. Kaplan-Meier analysis followed by Log-rank (Mantel coxx test). A was adjusted by bonferroni method to correct for multiple comparisons (p value threshold = 0.002). * indicates difference in comparison to the control; # indicates difference in comparison to the isolated pollutants. **101**

Figure 3. Median of deformities index of embryos/larvae of *Rhamdia quelen* exposed to 1 μgL^{-1} (M1), 10 μg L^{-1} (M2), 100 μg L^{-1} (M 3) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 μg L^{-1} (P1) and 0.84 μg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixture of both chemicals (P1M1, P2M1, etc) at 48, 72 and 96 hpf (hours post-fertilization). Exposure started 8 hpf so that at 28 hpf embryos had been exposed for 20 h. N=17-38. Kruskal-Wallis followed by Dunns Post-test. * indicates difference in comparison to the control; # indicates difference in comparison to the isolated pollutants. Deformity index was calculated as indicated in 2.4 section of M&M. **102**

Figure 4. Median of deformities index of embryos/larvae of *Rhamdia quelen* exposed to 1 μgL^{-1} (M1), 10 μg L^{-1} (M2), 100 μg L^{-1} (M 3) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 μg L^{-1} (P1) and 0.84 μg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixture of both chemicals (P1M1, P2M1, etc) at 48, 72 and 96 hpf (hours post-fertilization). N=17-38. Exposure started 8 hpf so that at 28 hpf embryos had been exposed for 20 h. Kruskal-Wallis followed by Dunns Post-test. P<0.05. A- indicates difference in comparison to the 48 hpf and same group; b- indicates difference in comparison to the 72 hpf and same group. Deformity index was calculated as indicated in 2.4 section of M&M. **103**

Figure 5. Temporal evolution of relative population density when the impacted of exposition to microcystin and pyriproxyfen is propagated for other life stages of *Rhamdia quelen*. The pictures show the exposure groups (a = microcystins, b = pyriproxyfen, c= P1M mixtures, d= p2M mixtures) when juveniles and adults are proportionally impacted as the embryo-larval stage. The populations achieve its asymptotic behavior before 20 generations. M1: 1 μg L^{-1}, M2: 10 μgLl^{-1}, M3: 100 μg L^{-1}, P1 = 0.17 μg L^{-1} and P2 = 1.85 μg L^{-1}. **104**

Figure 6. Predicted *Rhamdia quelen* average of relative population density over 100 years of exposure to 1 μg L^{-1} (M1), 10 μg L^{-1} (M2), 100 μg Ll^{-1} (M3) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 μg L^{-1} (P1) and 0.84 μg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixture of both chemicals (P1M1, P2M1, etc). Data are showed in media ±sd. N= 100. Statistical analyses were made by Kruskal-Wallis followed by Dunns Post-test. * indicates difference in comparison to the control; # indicates difference in comparison to the both isolated pollutants. **105**

Figure 7. Deformities observed in *Rhamdia quelen* after exposure to microcystin (1, 10 e 100 μg L^{-1}) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 μg L^{-1} (P1) and 0.84 μg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixture of both chemicals (P1M1, P2M1, etc). A. Control group 96 hpf. Observe the presence of barbells (arrowhead), eye (arrow) and vitelinic sac (vt). B. Larvae exposed to P2 72 hpf. The absence of eyes (arrow), thorax dysfunction (arrowhead) and pericardial oedema (ce) are observed. C. Larvae exposed to P1 72 hpf. The arrow indicates the head size alteration, the arrowhead the barbells atrophy including the pericardial oedema (ce). D. Control group 48 hpf. Observe the barbells and

head under development. E. Larvae exposed to M3-72 hpf. The absence of barbells and thorax dysfunction (arrowhead) are observed. F. Larvae exposed to P2 72 hpf. The arrow shows thorax dysfunction while the arrowhead shows the absence of barbells, month and head size alteration. The pericardial oedema is also present (ce). Scale bar = 250 µm. **.....105**

CAPÍTULO III

Figura 1. Estrutura secundária predita dos aptâmeros de fita simples de DNA AN6 e RC6 desenvolvidos por Ng et al. (2012) e utilizados neste trabalho. As letras A, T, C e G correspondem aos nucleotídeos adenina, timina, citosina e guanina, respectivamente. Fonte:www.aptagen.com **..118**

Figura 2. Representação esquemática das etapas realizadas para a detecção de microcistina pós etapa de funcionalização da superfície. O número 1 representa lavagens em tampão ou água, dependendo do ensaio, 2 representa incubações com EDC e/ou EDC/HNS e 3, as etapas de bloqueio da superfície.* sem necessidade de funcionalização prévia da superfície. ** realizado somente para os testes em microplaca. **.....119**

Figura 3. Representação esquemática dos aptâmeros aminados derivados do aptâmero AN6 (AN6-01, AN6-02, AN6-03) e tiolado (AN6-SS). Os espaçadores são hidrocarbonetos alcanos de 06 a 12 carbonos. **.....123**

Figura 4. Representação esquemática dos oligonucleotídeos utilizados (oligo dT e C15AN6F)**.....124**

Figura 5. Diagrama esquemático da ligação das biomoléculas sobre a superfície do chip de ouro para o ensaio de SPR. **.....128**

Figura 6. Diagramas esquemáticos das ligações de biomoléculas sobre o fundo das microplacas. A) para testes com dois aptâmeros; b) testes com placa sensibilizada por microcistina-LR-ovalbumina. I- revelação por aptâmero fluorescente e II- relevação por anticorpo marcado com fosfatase. C) testes híbridos com aptâmeros e anticorpos. I- revelação por aptâmero fluorescente e II – revelação por anticorpo marcado com fosfatase ou peroxidase. **.....130**

Figura 7. A) Dispositivo de ouro construído em papel sulfite já preparado para as análises voltamétricas; b) análise eletroquímica sendo realizada em uma gota de solução de oxi-redução ferri/ferro. Seta: eletrodo de trabalho - ponto de imobilização da amostra e leituras eletroquímicas -; #: ponto de ligação do potenciostato; *: eletrodo auxiliar (fio de platina); * *: eletrodo de referência (calomelano). **.....131**

Figura 8. Diagrama esquemático das ligações de biomoléculas sobre o eletrodo de trabalho do dispositivo eletroquímico em plataforma de papel. Os tracejados indicam a separação entre formas alternativas das ligações das biomoléculas. I) ligações através da imobilização de oligonucleotídeos de timina aminados (oligos dT) e detecção por aptâmero; II) detecção por imobilização de aptâmero aminado em superfície funcionalizada com ácido mercaptopropiônico (mpa); III) detecção por aptâmero tiolado e IV) detecção por anticorpo comercial, através de imobilização do anticorpo por funcionalização da superfície por albumina. **.....131**

Figura 9. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA). Géis A e B: verificação da ligação entre 0,50 µM do aptâmero AN6A1 ou AN6A2 com 0,25 µM do oligo dT nas condições de temperatura A, B, C e D – gel A) condições A e C; gel B) condições B e D. Géis C e D: verificação de ligação em condições equimolares de 0,25 µM do aptâmero AN6A1, AN6A2, RC6F1 e RC6F2 ao oligo dT, na presença ou ausência de microcistina e nas condições de temperatura A e D – gel C) AN6A1 E/OU RC6F1; gel D) aN6A2 e/ou RC6F2. Corante: SYBR GOLD. As condições de temperatura estão descritas no item material e métodos. * - nos poços sem indicação de condição, os aptâmeros foram somente desnaturados a 90ºc por 5 min e esfriados à temperatura ambiente. **.....135**

Figura 10. Elipsidade dos aptâmeros contendo cauda poli-A obtidas em dicroísmo circular antes e após incubação com microcistina por 45 min. A: aptâmero AN6A1; B: aptâmero AN6A2; C: RC6A1 e D: RC6A2. Todas as interações foram realizadas em concentrações equimolares de 1 μM em tampão de ligação. **.....137**

Figura 11. Elipsidade dos aptâmeros an6 aminados em dicroísmo circular antes e após incubação com microcistina por tempos inferiores a 5 min e após 20 min de interação. A: aptâmero an6-01; b: aptâmero an6-02; c: an6-03. Todas as interações foram realizadas em concentrações equimolares de 0,5 μm em tampão de ligação. **.....138**

Figura 12. Avaliação das placas Costar Corning DNA Bind™ e NUNC Immobilizer amino™ para revelação por fluorescência. A: aptâmero AN6-02 e C15AN6F em concentrações equimolares de 0-500 nM – em azul e em vermelho: após a adição de MC-LR (0,1-10 nM) a 500 nM de AN6-02 +C15AN6F na placa Corning; B: mesmos grupos de A, porém, com 0-1000 nM de aptâmero e oligo-FAM – em azul e em vermelho: após a adição de MC-LR (0,1-10 nM) a 1000 nM AN6-02 +C15AN6F na placa NUNC. **.....140**

Figura 13. Dispositivo 4 - a) leituras em voltametria cíclica em sonda 5mM ferri/ferro com 0,5 M KCl. Após 1 varredura (5 ciclos) – em azul; após 2 varreduras (10 ciclos) - em laranja; sonda pós 4 dias de secagem – em verde. B) após 4 dias, leituras realizadas em sonda (mesma acima), em verde; em tampão fosfato 20 Mm pH 7.4 com 2 mM ferri/ferro com 0,2 M KCl (tampão 20 mM em azul claro); em tampão fosfato 30 mM pH 7.4 com 3 mM ferri/ferro com 0,3 M KCl (tampão 30 mM em roxo); em tampão fosfato 50 Mm pH 7.4 com 5 mm ferri/ferro com 0,5 M KCl (tampão 50 mM em azul claro).**.....142**

Figura 14. Influência da imobilização das moléculas e aquecimento dos eletrodos ou aptâmeros. Em verde: eletrodo controle, sem oligo dT, sem aptâmero (apt) e com tampão PBS aquecido; em azul: eletrodo com oligo, aptâmero sem processo de aquecimento; em vermelho: eletrodo com oligo e aptâmero aquecido; em roxo: eletrodo com oligo dT e aptâmero aquecidos sobre chapa quente a 50º C. E: potencial elétrico aplicado; I: corrente elétrica gerada no sistema; SCE: eletrodo calomelano (eletrodo de referência). **.....143**

Figura 15. Diagrama de Nyquist (gráfico Z" vs. Z') para o dispositivo 2. Em azul: após MPA por 1,5 h; em vermelho: 5μM do aptâmero RC6-01 por 40 min; em verde: após microcistina em tampão TL por 30 min (10 μM ou ppb); em preto: nova leitura após a secagem do eletrodo. A sonda redox utilizada foi ferri/ferro 5 mM em 0,5Mm KCl. Cada medida foi obtida em potencial aplicado. Z'(Ω): componente real da impedância; -Z"(Ω): componente imaginária da impedância. **.....144**

Figura 16. Diagrama de Nyquist (gráfico Z" vs. Z') para o dispositivo 3. Em azul: antes da modificação do eletrodo; em vermelho: após 5 μM aptâmero RCrc6 tiolado por 40 min; em verde: após o bloqueio com BSA (0,1%) por 30 min; em roxo: tampão de ligação incubado por 40 min; em preto: 10 μM (ppb) em tampão TL por 20 min. A sonda redox utilizada foi ferri/ferro 5 mM em 0,5 M KCl. Cada medida foi obtida em potencial aplicado. Z'(Ω): componente real da impedância; -Z"(Ω): componente imaginária da impedância.**.....145**

Figura 17. Dispositivo 4 - a) leituras em voltametria cíclica em tampão 10 mM fosfato, 1 mM ferri/ferro e 0,1 M KCl: em verde: após 10 mM MPA; em azul: após 2 μg do anticorpo MC10E7; em roxo: PBST; em vermelho: 250 μg L^{-1} de MC-LR. B) leituras em voltametria cíclica em tampão 20 mM fosfato, 2 mM ferri/ferro e 0,2 M KCl: em verde: após 10 mM MPA; em azul: após 2 μg do anticorpo MC10E7; em roxo: PBST; em vermelho: 250 μg L^{-1} de MC-LR. **.....147**

Figura 18. Diagrama de nyquist (gráfico Z" vs. Z') para o dispositivo 2. Em vermelho: aptâmero 5 μM de AN6 tiolado; em azul: após 20 μgL^{-} de MC-LR por 30 min. A sonda redox utilizada foi ferri/ferro 5 mM em 0,5 M KCl. Cada medida foi obtida em potencial aplicado. **.....149**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Categoria de deformidade observada em *R. quelen* após exposição a microcistina-LR e piriproxifem e escore de deformidades para a severidade 52

CAPÍTULO I

Table 1. Biological parameters from *O. niloticus* after oral and subchronically exposure to microcystin-LR 77

Table 2. Biological values from *O. niloticus* after waterborne and subchronically exposure to Pyriproxyfen 78

Table 3. Frequencies of positive male fish of *O. niloticus* for vitellogenin analysis in western blot. 79

CAPÍTULO II

Table 1. Percentage of survival of *R. quelen* embryo-larval exposed to different concentrations of pollutants after 96 hours pos fertilization and data used for mathematical model appplication..... 100

CAPÍTULO III

Tabela 1. Sequências de aptâmeros selecionados (destacados em vermelho) ligados aos seus iniciadores (em preto). A cauda poli–a é representada por polyA20 e a marcação por fluorescência por FAM..... 126

Tabela 2. Resumo dos principais protocolos testados em microplaca com aptâmeros e revelação por fluorescência: 132

Tabela 3. Resumo dos principais ensaios eletroquímicos realizados..... 133

LISTA DE SIGLAS

AAIA	- Aptamer-antibody ummuneassay
ALISA	- Aptamer –Linked Immobilized Sorbent Assay
ANOVA	- One-way analysis of variance
CAS	- Chemical Abstract Service
CCD	- Cromatografia de Camada Delgada
CD	- Circular Dichroism
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Resolução
CLAP	- Cromatografia Líquida de Alta Pressão
CNPEM	- Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CSA	- Centro de Tecnologia em Saúde e Meio Ambiente
CV	- Cyclic voltametry
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
ED	- Endocrine disruptor
EIS	- Espectroscopia de impedância
ELISA	- Enzyme-Linked Immunosorbent assay
ELS	- Early life stages
EMSA	- Eletrophoratic mobility shift assay
ERO	- Espécie reativa de oxigênio
FFT	- Fast Fourier transform
HSI	- Hepatosomatic index
IGS	- Índice gonadossomático
IHS	- Índice hepatossomático
LNNANO	- Laboratório Nacional de Nanotecnologia
PCR	- Reação de cadeia polimerase
SDRURAL	- Secretaria de Desenvolvimento Rural de Joinville, SC
SELEX	- Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment
SPR	- Ressonância plasmônica de superfície
TDI	- Tolerable daily intake
TECPAR	- Instituto de Tecnologia do Paraná
UHPLC	- Ultra High Performance Liquid Chromatograph
WHO	- World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

1.1 JUSTIFICATIVA 31
1.2 OBJETIVOS GERAIS 32
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32
1.4 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO 33

2 MATERIAL E MÉTODOS 34

2.1 CULTIVO DE *Microcystis aeruginosa* E EXTRAÇÃO DE MICROCISTINAS 34
2.2 QUANTIFICAÇÃO DA MICROCISTINA-LR 34
2.3 QUANTIFICAÇÃO DO PIRIPROXIFEM 36
2.4 CAPÍTULO I 37
2.4.1 Coleta, manutenção e contaminação dos animais 37
2.4.1.1 Desenho experimental para exposição de indivíduos juvenis à microcistina 37
2.4.1.2 Desenho experimental para exposição de indivíduos juvenis ao Piriproxifem 39
2.4.2 Coleta do material biológico 40
2.4.3 Processamento inicial das amostras 40
2.4.4 Análises Biológicas 41
2.4.4.1 Determinação da concentração de hemoglobina 41
2.4.4.2 Índices Biométricos 41
2.4.4.3 Processamento do material para análise em microscopia de luz 42
2.4.4.4 Homogeneização dos tecidos – fígado, cérebro e músculo 42
2.4.4.5 Quantificação de proteínas 43
2.4.4.6 Parâmetros bioquímicos para análise de estresse oxidativo 43
2.4.4.7 Parâmetros bioquímicos para análise de neurotoxicidade 45
2.4.4.8 Parâmetros moleculares 45
2.5 CAPÍTULO II 48
2.5.1 Desenho experimental para os estudos com os estágios iniciais de desenvolvimento 48
2.5.2 Procedimento de fertilização dos ovos e exposição aos contaminantes 49
2.5.3 Modelagem Matemática dos dados de sobrevivência 52
2.6 CAPÍTULO III 53
2.6.1 Métodos testados para utilização no desenvolvimento de um biosensor para microcistina 53
2.6.1.1 Interações moleculares 53
2.6.1.2 Ensaios para detecção de microcistinas 55
2.6.1.3 Testes eletroquímicos 60
2.6.1.4 Montagem do Biossensor 62

CAPÍTULO I

Microcystin-lr revealed endocrine disruption effects in *Oreochromis niloticus* (linnaeus, 1758) orally exposed to realistic doses of cyanobacteria extract and purified standard 67

ABSTRACT 68

1 INTRODUCTION 69

2 MATERIALS AND METHODS 70

2.1 MICROCYSTIN 70
2.2 PYRIPROXYFEN 71
2.3 MAINTENANCE AND EXPOSURE OF FISH 72

2.4 BIOLOGICAL SAMPLING 73
2.5 PROCESSING OF BIOLOGICAL MATERIAL 73
2.6 STATISTICAL ANALYSIS 75

3 RESULTS 75

4 DISCUSSION 80

5 CONCLUSION 84

CAPÍTULO II

Microcystin and pyriproxyfen are toxic to early stages of development in *Rhamdia quelen*: An experimental and modelling study 90

ABSTRACT 91

1 INTRODUCTION 92

2 MATERIALS AND METHODS 93

2.1 MICROCYSTIN 93
2.2 PYRIPROXYFEN 94
2.3 TEST SOLUTIONS OF MICROCYSTIN, PYRIPROXYFEN AND THEIR ASSOCIATION 94
2.4 PROCEDURES FOR EGGS FERTILIZATION AND EXPOSURE 95
2.5 STATISTICAL PROCEDURES 96

3 RESULTS 97

3.1 CHEMICAL ANALYSIS OF MICROCYSTIN AND PYRIPROXYFEN 97
3.2 HATCHING RATE ANALYSIS 97
3.3 SURVIVAL RATE ANALYSIS 97
3.4 MORPHOLOGICAL DEFORMITIES ANALYSIS 98
3.5 MATHEMATICAL MODEL APPLICATION TO EVALUATE THE CHRONIC EXPOSURE OF *R. quelen* TO MICROCYSTIN AND PYRIPROXYFEN 98

4 DISCUSSION 106

4.1 MICROCYSTIN AND PYRIPROXYFEN AFFECTED HATCHING OF *R. quelen* EMBRYOS 106
4.2 MICROCYSTIN AND PYRIPROXYFEN AFFECTED SURVIVAL OF *R. quelen* LARVAE 107
4.3 MORPHOLOGICAL DEFORMITIES ARE MORE FREQUENT AT THE FIRST HOURS OF DEVELOPMENT 108
4.4 MATHEMATICAL MODEL REVEALED A RISK OF EXTINCTION TO THE SPECIES *R. quelen* AFTER MICROCYSTIN AND PYRIPROXYFEN EXPOSURE TO POST-FERTILIZED EGGS 109

5 CONCLUSIONS 109

CAPÍTULO III

Aplicação de métodos para o desenvolvimento de um sistema para a detecção de microcistina-LR 115

RESUMO 115

1 INTRODUÇÃO 116
1.1 ENSAIOS PARA VERIFICAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES 117
1.2 ENSAIOS PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS 119
1.3 OBJETIVOS 122
1.3.1 Objetivo geral 122
1.3.2 Objetivos específicos 122
2 MATERIAIS E MÉTODOS 123
2.1 AQUISIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS 123
2.2 ENSAIOS PARA VERIFICAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES 124
2.3 ENSAIOS PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS 128
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 134
3.1 ENSAIOS PARA VERIFICAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES 134
3.2 ENSAIOS PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS 139
4 CONCLUSÃO 149
DISCUSSÃO GERAL 154
CONCLUSÕES GERAIS 159
REFERÊNCIAS 160

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural vital, mas o crescimento das populações humanas e das atividades antrópicas como processos agrícolas, industriais e de produção animal geram muitos tipos de efluentes que, sem tratamento adequado, alcançam os corpos de água (Figueiredo et al., 2004). Assim, são despejados nas águas uma grande variedade de contaminantes e nutrientes – principalmente nitrogênio e fósforo, contribuindo para a intensificação dos processos de eutrofização. Dessa forma, a quantidade de organismos produtores primários (fotossintetizantes) se sobressai, iniciando-se um desequilíbrio tanto nas comunidades fitoplanctônicas como faunísticas (Fernandes et al., 2009; Ferrão-Filho et al., 2009; Puddick et al, 2014; EPA, 2015; Saraf et al., 2018).

Dentre os produtores primários, destacam-se as cianobactérias, que, ao se reproduzirem em grande quantidade, podem gerar as florações. Nas últimas duas décadas, os processos de eutrofização e florações tem se intensificado, possivelmente por influência do aquecimento global (Paerl et a., 2011, O'neil et al., 2012). As cianobactérias são organismos fotossintetizantes bastante antigos, com registro fóssil de cerca de 3,5 bilhões de anos, e adaptadas para tolerar variações físicas e químicas sazonais e bruscas, bem como, a poluição no ambiente em que vivem (Neilan et al., 2013). Muitas espécies de cianobactérias são produtoras de toxinas. Dessa forma, os seres humanos e outros animais podem se contaminar com cianotoxinas por via dérmica, oral – através do alimento e água, inalatória e intravenosa (Ueno et al., 1996; Chorus & Bartram, 1999; Magalhães et al., 2001; Azevedo et al., 2002; Molica et al., 2005; Ibelings & Chorus, 2007; Gomes et al., 2009; Gianuzzi et al., 2011; Ng et al., 2012). Além disso, acredita-se que os animais aquáticos sejam os que sofrem os efeitos mais severos, uma vez que ficam expostos às toxinas de forma crônica durante as florações (Saraf et al., 2008).

Há relatos de florações de cianobactérias tóxicas em vários países (Paerl et al., 2011), incluindo o Brasil (Molica et al., 2005; Sant´Anna et al., 2008; Dörr et al., 2010; Castro & Moser, 2012). No Brasil, 32 espécies de cianobactérias tóxicas foram identificadas até 2008, destacando-se como mais amplamente distribuídas as espécies *Microcystis aeruginosa*, produtora de microcistinas e *Cylindrospermopsis raciborskii*, produtora de saxitonas (Sant´Anna et al., 2008).

No Paraná, florações de *Microcystis aeruginosa* foram observadas no reservatório do Iraí, localizado na Região Metropolitana de Curitiba (Zablonsky, 2012) e nos reservatórios do

rio Iguaçu de Foz de Areia e Salto Segredo (Adloff et al., 2018); por outro lado, *Cylindrospermopsis raciborskii* foi encontrada no reservatório de Alagados, na região de Ponta Grossa (Clemente et al., 2010). As cianotoxinas são bastante diversificadas quanto à sua estrutura química e geralmente são classificadas de acordo com seus efeitos tóxicos em mamíferos. São elas: hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsinas), neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-as, homoanatoxina-a e saxitoxina) e dermatoxinas (lipossacarídeos, lingbiatoxina-a e aplisiatoxinas) (Figueiredo et al., 2004).

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias está relacionado à presença de hepatotoxinas em corpos d'água. As hepatotoxinas atuam principalmente sobre células hepáticas, onde desorganizam microfilamentos de actina do citoesqueleto, resultando na destruição das células hepáticas por falta de suporte, levando todo o tecido à necrose e hemorragia intra-hepática, o que acarreta em morte do animal em poucas horas em doses agudas (Metcalf e Codd, 2004). Além de atuarem no fígado, as hepatotoxinas podem se acumular em outros órgãos como rins, estômago, pulmão, cérebro, gônadas e coração (Wang et al., 2008).

A microcistina é uma hepatotoxina composta por um heptapeptídeo cíclico com mais de 100 isoformas com toxicidades diferentes (Puddick et al, 2014), sendo produzida por vários gêneros de cianobactérias, entre eles, *Microcystis* e *Anabaena* (Wiegand & Pflugmacher, 2005, Sant'Anna et al., 2008). Segundo Hilborn et al., (2005) a microcistina é uma cianotoxina bastante potente e amplamente distribuída, ocorrendo em todo o planeta. Esta cianotoxina, assim como a nodularia, é um potente inibidor de proteínas fosfatases 1 (PP1) e 2 A (PP2A) (Carmichael, 1992) e se destaca por sua capacidade de causar intoxicações agudas, podendo levar animais vertebrados, incluindo o homem, à morte por severos danos hepáticos (Carmichael, 1992; Azevedo et al.,2002; Wiegand & Pflugmacher, 2005; Malbrouck & Kestemont, 2006).

A microcistina-LR (MC-LR) é a isoforma mais comum e mais tóxica dentre as microcistinas (Fig. 1), possuindo leucina e arginina nas posições 2 e 4, respectivamente. A dose letal para 50% de indivíduos expostos (LD50) para camundongos é bastante baixa, aproximadamente 60 $\mu g\ L^{-1}$ (WHO, 1999), considerada de alta toxicidade.

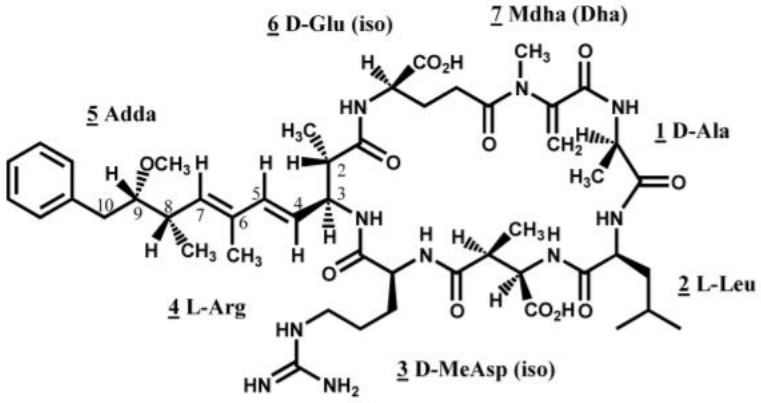


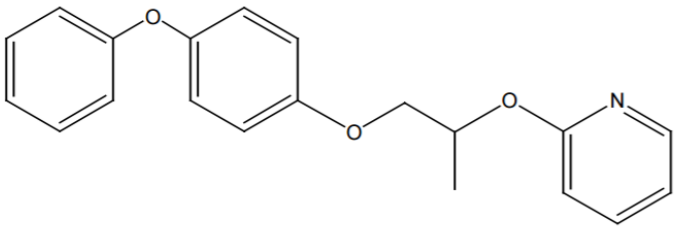
Figura 1. Estrutura molecular da microcistina-LR. Fonte: Mayumi et al., 2006.

Diversos efeitos da MC-LR têm sido relatados sobre peixes: danos no sistema antioxidante, alterações histopatológicas no fígado, gônadas, brânquias, sistema gastrointestinal, desregulação endócrina, na osmorregulação, bioacumulação em órgãos como fígado, músculo e vísceras (Carbis et al.,1996; Magalhães et al., 2001; Malbrouck and Kestmont, 2006; Poste et al., 2011; Kist et al., 2012; Pavagadhi and Balasubramanian, 2013; Qiao et al. 2013; Su et al. 2016; Abdel-Latif and Khashaba, 2017). Contudo, poucos trabalhos avaliaram a exposição por via trófica ou por imersão de peixes de forma subcrônica a baixas concentrações (Trinchet et al., 2011; Su et al., 2016).

Estágios iniciais de desenvolvimento em peixes ("early life stages", ELS) são considerados mais sensíveis que os estágios juvenis e adultos a contaminantes ambientais, provavelmente devido à alta taxa metabólica, sistema imune imaturo, espessura da pele, maior razão de superfície área-volume e movimentação restrita na coluna da água (Malbrouck & Kestemont, 2006; Saraf et al., 2018). Em relação à microcistina, efeitos mais severos foram realmente encontrados mais em ELS do que estágios mais avançados de desenvolvimento. Estes efeitos são atribuídos à desregulação de proteínas críticas para a regulação do desenvolvimento, como proteínas fosfatases PP1 e 2A, caderinas e ß cateninas (Wang et al., 2005). Como efeitos mais aparentes, observou-se atraso ou adiantamento na eclosão dos ovos, aumento da mortalidade e más formações – redução de tamanho da cabeça, edema pericárdico, edema ocular ou ausência de olhos, aumento da curvatura da cauda ou ausência de sistema digestivo (Liu et al., 2002; Huynh-Delerme et al., 2005; Wang et al., 2005; Malbrouck

and Kestemont, 2006; Saraf et al., 2018). No entanto, poucos estudos são encontrados referentes ao efeito de poluentes ou substâncias tóxicas em peixes endêmicos da América do Sul.

Outra substância estudada nesta tese foi o piriproxifem. O piriproxifem (Py) - 2-[1-metil-2-(4-fenoxifenifenoxifeni)etoxi]piridina apresenta fórmula química $C_{20}H_{19}NO_3$ e pertence ao grupo químico éter piridiloxipropílico; sua estrutura molecular encontra-se na Figura 2.



pyriproxyfen
2-[1-methyl-2-(4-phenoxyphenoxy)ethoxy]pyridine

Figura 2. Estrutura molecular do piriproxifem. Fonte: Sullivan, 2000.

O piriproxifem é um inseticida de amplo espectro, análogo ao hormônio juvenil (JH-*"juvenil hormone"*) de insetos. Por seu efeito mimético ao JH, afeta a reprodução, morfogênese e embriogênese dos insetos e impede o desenvolvimento da ninfa/larva em adulto por inibir o desenvolvimento das características adultas como asas, maturação dos órgãos reprodutivos e genitália externa. Dessa forma, a pupa falha em emergir como adulto e morre (Invest & Lucas, 2008). Além disso, as fêmeas que entram em contato com o produto produzem ovos inviáveis e reduzem sua postura. Este inseticida é utilizado na agricultura no combate de insetos pragas em grãos – como a soja - e hortaliças, no combate a pulgas em animais doméstico e, mais recentemente, tem sido utilizado no combate de mosquitos vetores de doenças em corpos d'água, incluindo água de consumo humano no Brasil (WHO, 2008, Adapar, 2016; Brasil, 2016).

Para este último tipo de tratamento, o produto é comercializado como Sumilarv® 0,5 G pela empresa Sumimoto Chemical. Este produto contém 0,5% (g/g) de princípio ativo de piriproxifem e areia de origem vulcânica (tipo pedra pomes), a qual permite a lenta liberação do piriproxifem na água (Brasil, 2014). Além disso, o piriproxifem tem baixa solubilidade em água e alto coeficiente logarítmico de partição octanol-água, o que sugere que é improvável que ele permaneça em solução na dose máxima empregada (WHO, 2008).

Segundo as orientações de uso do Sumilarv® 0,5 G pelo fabricante e recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) a concentração a ser utilizada em reservatórios de água de consumo humano para o controle de vetores é de 10 μg L^{-1} (WHO, 2008). Uma vez administrado neste tipo de água, nova aplicação deverá ser feita após 2 meses, já que o produto é liberado lentamente do granulado (DIVE, 2014). Para água suja e poluída a empresa Sumimoto Chemical recomenda as doses de 20 μg L^{-1} e 50 μg L^{-1} respectivamente (Sumivector, 2016). Em lagos aeróbicos o tempo de meia-vida do piriproxifem é de 16 a 21 dias, enquanto em solos sob condições aeróbicas, o produto se degrada dentro de 6,4 a 36 dias (WHO, 2008).

A eficácia do piriproxifem sobre mosquitos como o *Aedes aegypti, Culex e Anopheles* é altíssima: a LC50 (concentração letal a 50% dos indivíduos) para *Aedes aegypti* é de 0,012 μg L^{-1}, ao passo que para *Culex quinquefasciatus* a LC90 (concentração letal a 90% dos indivíduos) é de 1,1 μg L^{-1}. Já para o *Anopheles spp.,* a aplicação única de 10 μg L^{-1} de piriproxifem em ninhos em rios no Sri Lanka reduziu a população adulta deste inseto em mais de 70 % por 190 dias; no mesmo período, a incidência de febre amarela reduziu em cerca de 70 % (Yapabandara et al., 2004). As doses utilizadas em campo variando de 10 a 50 μg L^{-1} de piriproxifem visam atingir uma completa inibição da emergência de adultos (ou seja, a formação de indivíduos adultos completos) e prolongar a duração do efeito desse produto (Invest & Lucas, 2008).

A concentração máxima recomendada de piriproxifem para a água de consumo (10 μg L^{-1}) corresponde a menos de 1% da TDI (ingestão diária tolerável) para um homem adulto de 60 kg, consumindo 2 L de água por dia. A TDI, por sua vez, é de 0 - 100 μg kg^{-1} e foi estabelecida como 1% da NOEL (dose sem efeitos adversos) de 10 mg kg^{-1} para cães machos através de 2 estudos crônicos de 1 ano (WHO, 2008). Para mamíferos, o Encontro Conjunto FAO/WHO em Resíduos de Pesticidas ("JMPR", "*Joint FAO/WHO meeting on Pesticides Residues*") de 1999, com base em vários estudos, concluiu que o piriproxifem não é carcinogênico ou genotóxico e que efeitos tóxicos do produto, como aumento no peso do fígado, alterações morfológicas nos rins, redução no número de eritrócitos e hiperlipidemia são encontrados em doses muito elevadas, dependendo da espécie e sexo. A LD50 oral (dose oral letal a 50%) para camundongos e ratos foi superior a 5000 mg kg^{-1} (FAO/WHO, 1999).

Desta forma, segundo a literatura, o piriproxifem atende aos critérios-chave para um efetivo larvicida de insetos: baixa toxicidade a mamíferos, baixo impacto no meio ambiente, atividade de amplo espectro contra todas as espécies de mosquitos alvo e um longo tempo de duração de efeito, o que reduz a frequência de aplicação (Invest & Lucas, 2008). Contudo, o

piriproxifem pode também afetar outras espécies de insetos benéficas ao meio ambiente, como as abelhas *Apis melifera* (Chen et al., 2016) e outros artrópodes, como crustáceos – caranguejos, camarões e *Daphnia spp*. (McKenney, 2005, WHOPES, 2001).

Com relação às dáfnias, a *Daphnia pulex*, considerada a mais sensível, apresentou recuperação a níveis normais de sua taxa reprodutiva após 7 dias de depuração (Miyamoto et al., 1993). Baseando-se nestas informações e na informação sobre ausência de efeitos/presença de poucos efeitos em diversos grupos de invertebrados, o relatório 4° WHOPES (4^{th} WHO *Pesticide Evaluation Scheme*, 2001) concluiu que o produto não afeta adversamente a grande maioria dos invertebrados e peixes. Entretanto, ainda faltam estudos sobre reversibilidade de efeitos para várias espécies animais e há pouquíssimos estudos avaliando a toxicidade para peixes. Na maioria dos estudos com peixes, há somente o relato da LC50 (concentração letal a 50% dos indivíduos) para algumas espécies, sendo que a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é o peixe mais susceptível: LC50 de 325 $\mu g\ L^{-1}$ para exposição por 96 h e de 90 $\mu g\ L^{-1}$ para exposição por 21 dias (Sullivan, 2000).

Poucos estudos também foram realizados para avaliação do efeito do piriproxifem sobre os estágios iniciais de desenvolvimento ("early life stages", ELS) de peixes. Destes, todos foram realizados para *Danio rerio* e, apenas um utilizou as concentrações recomendadas de piriproxifem para aplicação em água de consumo humano.

Considerando que o piriproxifem pode ser utilizado no Brasil em água de consumo humano para o combate a mosquitos vetores de doenças, como também, pode ser utilizado como princípio ativo de pesticida na agricultura (Brasil, 2016), torna-se relevante avaliar o possível efeito que este contaminante teria sobre ELS de espécies nativas da região do Brasil. Além disso, não foram encontrados estudos que avaliassem o possível efeito sinérgico da mistura do piriproxifem a outros contaminantes sobre espécies de animais aquáticos, como as microcistinas, que potencialmente poderia ocorrer simultaneamente no ambiente.

Os biomarcadores compreendem qualquer resposta biológica, como alterações bioquímicas, hematológicas, genéticas, celulares ou teciduais, que indique a exposição ou efeito de contaminantes sobre os organismos. Através do uso dos biomarcadores é possível avaliar a saúde dos organismos de um ambiente e, por consequência, predizer os riscos a que estes organismos podem estar sujeitos em longo prazo, permitindo assim, que medidas de mitigação para comprometimento ambiental severo sejam tomadas de forma precoce (Van der Oost et al., 2003).

Biomarcadores bioquímicos: compreendem respostas bioquímicas rápidas, como alterações na atividade da enzima acetilcolinesterase, em enzimas de biotransformação e

enzimas antioxidantes, levando a variações fisiológicas frente à exposição de contaminantes. Dessa forma, são considerados biomarcadores bastante responsivos para avaliação geral da saúde dos animais a agentes estressores (Van der Oost et al., 2003).

Um parâmetro hematológico, como o nível de hemoglobina, pode ser informativo sobre a saúde geral do animal durante uma exposição. Além disso, pode ser sensível a alguns tipos de contaminantes como o chumbo e cádmio, que interferem na produção do grupamento heme, essencial para a formação de hemoglobina e de citocromos, como o citocromo P450 (Van der Oost et al., 2003).

A atividade da enzima acetilcolinesterase pode indicar a ocorrência de efeitos neurotóxicos tanto no cérebro quanto no músculo. Esta enzima atua na fenda sináptica, realizando a hidrólise de acetilcolina (AChE) em colina e acetato, contribuindo para a correta transmissão de impulsos nervosos, coordenação motora e memória (Colovic et al., 2013). Vários autores relatam o efeito de inibição desta enzima após a administração de agrotóxicos organofosforados, carbamatos e metais, (Guiloski et al., 2013). Em relação à microcistinas, Kist et al (2012) observaram aumento de atividade desta enzima após exposição hídrica de *Danio rerio* a 100 μg L^{-1} de MC-LR por 24h. Para o piriproxifem, relatos de redução da atividade desta enzima foi observada por Maharajan et al. (2018) após exposição de *D. rerio* a 1,66 μg mL^{-1} por 96 h.

As enzimas de biotransformação são enzimas que participam na metabolização de moléculas lipofílicas de modo a torná-las mais hidrofílicas para a sua eliminação via excreção renal. Estas enzimas situam-se principalmente no fígado e os processos de biotransformação ocorrem em duas fases: fase I e fase II, as quais são independentes entre si. Assim, dependendo da lipossolubilidade da molécula em biotransformação, poderão ocorrer ambas as fases, somente a fase I ou somente a fase II. Vale ressaltar que a metabolização de moléculas pode gerar moléculas mais reativas (mais tóxicas) que o composto parental devido à sua bioativação durante a fase I. Na fase I ocorrem as reações de oxidação, redução e hidrólise por enzimas monooxigenases microsomais (MO). Nesta fase, destacam-se as isoenzimas CYPs 1, 2 e 3 do citocromo P450 para os processos de biotransformação de xenobióticos (compostos químicos exógenos ao organismo) (Van der Oost et al., 2003).

Na fase II da biotransformação ocorrem reações de conjugação dos metabólitos da fase I ou da molécula parental à molécula de glutationa.

O metabolismo normal de moléculas de oxigênio molecular (O_2) nos organismos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), os quais compreendem: ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($HO^{\bullet}$) (Pisoschi e Pop, 2015). Estas

moléculas podem ser prejudiciais às células, especialmente o radical hidroxil, que é um potente agente oxidante, podendo inativar enzimas, causar danos em lipídios e em DNA e, por consequência, levar à morte celular (Van der Oost et al., 2003).

Contudo, para garantir a homeostase celular, os organismos desenvolveram o sistema antioxidante, que reduz as EROs, previnem e reparam dando em lipídeos oxidados e mantem o status redox de moléculas importantes para a redução de EROs, como a glutationa reduzida (GSH) (Van der Oost et al., 2003; Pisoschi e Pop, 2015).

A exposição a agentes químicos podem acarretar em estresse oxidativo, aumentando os níveis de EROs nas células e causando desequilíbrio redox. Este estresse ocorre quando o sistema antioxidante não consegue compensar os níveis de EROs geradas (Pisoschi e Pop, 2015), ocorrendo desequilíbrios no sistema. Desta forma, enzimas e outras moléculas do sistema de defesa antioxidante têm sido utilizadas como biomarcadores para a avaliação de estresse oxidativo.

As principais enzimas do sistema antioxidante compreendem: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GP_X). Além delas, compostos não enzimáticos, como a glutationa reduzida (GSH), proteínas como ferritinas, transferinas, albuminas e moléculas como ácido úrico, coenzima Q e ácido lipóico participam do sistema (Pisoschi e Pop, 2015).

A SOD é uma metaloenzima que degrada o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) através da reação de dismutação, formando oxigênio e peróxido de hidrogênio, H_2O_2. Este peróxido, por sua vez, embora pouco reativo, tem a capacidade de atravessar membranas biológicas, podendo ser convertido em radical hidroxila e, portanto, mais reativo, através da reação de Fenton (Winterbourn, 1995). A quebra do peróxido é realizada pela CAT dentro dos peroxissomos, formando oxigênio e água. Por outro lado, a GPx degrada H_2O_2 e outros tipos de peróxidos na presença de GSH e de forma extra-peroxissomal (Van der Oost et al., 2003).

Dentre os danos causados a biomoléculas devido à ocorrência de estresse oxidativo, tem-se, por exemplo, a lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (LPO) e a carbonilação de proteínas (PCO). A lipoperoxidação é um dos principais danos causados pelo estresse oxidativo. Neste caso, as EROs reagem com os fosfolipídios das membranas celulares, sequestrando elétrons e desestruturando as membranas, causando aumento de permeabilidade. De um modo mais intenso, a lipoperoxidação pode ocasionar a ruptura da membrana com consequente morte celular (Gutteridgee Halliwell 2000; Van der Oost et al, 2003; Pisoschi e Pop, 2015).

A carbonilação de proteínas compreende danos sobre cadeias laterais de proteínas. A carbonilação pode ser decorrente de oxidação protéica pela reação de grupamentos cetonas e aldeídos provenientes de reações com EROs. Este processo pode levar à mudanças conformacionais de proteínas, além da perda da função de algumas enzimas (Levine et al., 1994; Suzuki et al., 2010).

Biomarcadores morfológicos: os biomarcadores morfológicos compreendem a avaliação histopatológica de tecidos, que podem complementar a interpretação de outros biomarcadores, como as de estresse oxidativo, avaliação de danos em DNA e neurotoxicidade. Para estas análises, o fígado representa o principal órgão-alvo, devido à sua importância no metabolismo e excreção de xenobióticos (Mela et al., 2007). As alterações observadas no tecido podem tanto indicar danos reversíveis, como uma hemorragia, até danos irreversíveis, como a ocorrência de neoplasias e necrose (Bernet et al., 1999).

Amado e Monserrat, em sua revisão de 2010, hipotetizaram uma sequência de eventos que poderiam ocorrer no organismo animal após a exposição à microcistina, culminando em estresse oxidativo: a toxina entraria na célula via transportadores de membrana, chamados OATPs (polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos) que utilizam o GSH como trocador (microcistina entraria na célula e o GSH sairia). Com isso, ocorreria uma redução da concentração de GSH intracelular, reduzindo também as defesas antioxidantes. A microcistina ainda inibiria a enzima ATPsintase (que produz ATP) e causaria a hiperfosforilação de proteínas (de forma indireta) ao se ligar a proteínas fosfatases e impedir o seu funcionamento. Juntos, a hiperfosforilação e o estado pro-oxidativo da célula promoveriam a transcrição de genes de resposta antioxidante (GST, GPx e GCL- glutamato cisteína-ligase, importante na síntese de GSH). Contudo, a depleção de ATP aliada ao estado fosforilado das proteínas inibiriam GCL. A fosforilação ativaria a GST e GPx, mas os baixos níveis de GSH continuariam impedindo a biotransformação da microcistina (via sua conjugação com GSH, através da enzima GST). Dessa forma, a microcistina se acumularia no organismo e o processo de quebra de H_2O_2 por GPx continuaria comprometido. Ao final, a capacidade antioxidante da célula seria ainda mais inibida pela fosforilação (ao inibir outra família de proteínas de peroxidases, a Peroxidina 1, Prx). Todos estes eventos em conjunto acabariam alterando o estado redox das mitocôndrias celulares, que poderiam levar à liberação de citocromo c, responsável pela ativação da cascata de apoptose (morte celular programada).

Para o piriproxifem, em relação ao estresse oxidativo em vertebrados, foi observado que em estágios iniciais de desenvolvimento do peixe *Danio rerio,* a exposição a somente doses altas (1,66 $\mu g\ mL^{-1}$) indicaram elevado níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs),

lipoperoxidação (LPO) e ácido nítrico (NO), mas não houve alteração nas enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT, GST e GPx). Também em altas doses foram observadas redução nos níveis de GSH e AChE (Maharajan et al., 2018).

Desreguladores endócrinos ("endocrine disruptor chemicals", ED), segundo a definição da WHO (2002), são "substâncias exógenas ou misturas que podem alterar as funções do sistema endócrino, causando efeitos adversos em organismos, proles e (sub) populações" (WHO; IPCS, 2002). Desta forma, o desregulador endócrino pode afetar processos normais de produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação – atuando como um agonista ou antagonista, e excreção de hormônios (Kavlock et al., 1996; Schug et al., 2011). Em decorrência dessa atuação dos desreguladores endócrinos, vários efeitos podem ser observados: alterações de comportamento, crescimento, desenvolvimento, no sistema imune e nas respostas a estresse, redução da fertilidade e reprodução, mudanças no padrão de dimorfismos sexuais. Ao comprometer muitos indivíduos de uma espécie, os desreguladores endócrinos podem ainda comprometer níveis mais altos de organização, causando alterações populacionais (Scholz e Mayer, 2008; Ankley e Johnson, 2004).

Uma grande variedade de contaminantes ambientais tem sido relatada como desreguladores endócrinos: bisfenol A (BPA), bifenilas policloradas (PCBs), organoclorados, organofosfatados, carbamatos, ftalatos, esteróides e fitoesteróides naturais, produtos farmacêuticos (como esteróides sintéticos), DDT, dioxinas e similares, plastificantes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Schug et al., 2011). Nos últimos anos, efeitos de desregulação endócrina também têm sido observados como consequência de exposição à toxinas de cianobactérias, como a microcistina-LR (Palikova et al., 2007; Qiao et al., 2013; Su et al., 2016).

Os desreguladores endócrinos podem atuar de forma mimética ou antagônica a vários hormônios de vertebrados, como hormônios do eixo hipotálamo-hipófise, hormônios tireoideanos, corticosteróides, androgênicos e estrogênicos (Scholz e Mayer, 2008), e ainda, atuar direta ou indiretamente sobre a ativação/inativação de genes para expressão destes hormônios (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Qiao et al., 2013).

Os efeitos dos EDs sobre os hormônios reprodutivos tem sido estudados por vários autores para avaliação de contaminantes ambientais, uma vez que alterações nestes hormônios podem afetar o desenvolvimento reprodutivo e diferenciação sexual dos animais, podendo comprometer a viabililidade populacional (Scholz e Mayer, 2008).

Segundo estes mesmos autores, os peixes são considerados organismos de risco à exposição aos EDs porque sua determinação sexual é bastante lábil, podendo ser alterada por

contato com hormônios sexuais durante o seu desenvolvimento e ainda, por estarem em contato direto com os contaminantes liberados nas águas devido às atividades antrópicas, como os desreguladores endócrinos (Scholz e Mayer, 2008).

Nesse sentido, a proteína vitelogenina (vtg) tem sido utilizada como um biomarcador para a verificação de atuação de efeito estrogênico ou anti-estrogênico por contaminantes ambientais, especialmente em peixes (Ankley e Johnson, 2004; Scholz e Mayer, 2008; Yamamoto et al., 2017). Esta proteína é expressa em fêmeas durante a época reprodutiva mediada pela presença do hormônio feminino 17-ß-estradiol (E2), enquanto que, nos machos, sua expressão é baixíssima, devido ao seu baixo nível desse hormônio (Ankley e Johnson, 2004). Dessa forma, um contaminante que ocasione a expressão evidente de vtg em machos será considerado um desregulador endócrino estrogênico, ao passo que um contaminante que reduza a expressão de vitelogenina nas fêmeas será considerado de efeito anti-estrogênico.

A vitelogenina é de suma importância para a manutenção das espécies ovíparas, pois trata-se de uma lipo-fosfo-glicoproteína precursora de proteínas de vitelo do ovo, que alimentarão o embrião (Specker, 1994). Uma desregulação na produção desta proteína, a longo prazo, poderá afetar a manutenção da população, tanto por redução do tamanho gonadal ou feminização dos machos, como por redução da fertilidade e de número de ovos das fêmeas (Arcand-Hoy e Benson, 2001).

O uso de espécies indicadoras de contaminação (bioindicadoras) é de grande importância em estudos ambientais, pois as análises químicas isoladas, embora muito importantes para indicar o nível de contaminação no ambiente, não fornecem dados sobre o real risco de exposição da biota ao contaminante. A entrada do contaminante no organismo depende de sua biodisponibilidade, forma de exposição, nível de contaminação e, ainda de tempo de exposição ao contaminante (Fent, 1996).

A tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie onívora de origem africana e amplamente distribuída na aquicultura mundial, devido à sua robustez, adaptando-se facilmente às condições de cultivo em tanques e por apresentar fácil manejo, dentre outros fatores (Fishbase.org, 2018). Por estes motivos, esta espécie tem sido amplamente utilizada como modelo biológico em estudos ecotoxicológicos para avaliar os riscos de exposição a diferentes contaminantes (Osman et al., 2012; Ates et al., 2016).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie onívora e nativa do Continente Sul Americano (Fishbase.org, 2018). No sul do Brasil, esta espécie tem sido utilizada em atividades de aquicultura, devido ao seu fácil manejo. Além disso, os processos de reprodução e desenvolvimento desta espécie estão bem conhecidos (Graeff et al., 2008; Rodrigues-

Galdino et al., 2010), permitindo a utilização de ovos embrionados nos estudos relacionados aos estágios iniciais de desenvolvimento desta espécie. Desta forma, vários trabalhos ecotoxicológicos tem sido realizado com esta espécie (Kreutz et al., 2008, Pimpão et al., 2013; Mela et al., 2013; Munõz et al., 2015), incluindo estudos com estágios iniciais de desenvolvimento (Brito et al., 2017).

Outro aspecto importante sobre os contaminantes é a sua detecção. Neste sentido, detectar e monitorar a microcistinas são de vital importância devido ao seu potencial tóxico reconhecido para várias espécies de animais – incluindo o homem - e seu histórico de ocorrência também em reservatórios de água de consumo humano durante as florações. Assim, a Organização Mundial de Saúde (WHO), estabeleceu a dose máxima permitida para consumo diário por humanos (ou TDI – "*tolerable daily intake*"), após diversos estudos com mamíferos, em 0,04 $\mu g\ kg^{-1}\ dia^{-1}$ (WHO, 1999). A partir deste valor e considerando que uma pessoa adulta de cerca de 60 kg consuma 2L de água por dia, a concentração máxima permissível para microcistinas em água de abastecimento humano foi estabelecida em 1 $\mu g\ L^{-1}$ (WHO, 1999). No Brasil, este valor encontra-se na Portaria 2914 do Ministério da Saúde (Brasil, 2011).

Para o atendimento às legislações mundiais sobre os níveis de microcistinas em água, vários tipos de ensaios vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos (Lin et al., 2013; Weller et al., 2013; Xiang et al., 2014; Eissa and Zourob, 2017). Porém, os principais ensaios realizados pelos laboratórios para avaliação das microcistinas em água são o teste imunoenzimático ELISA "*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*" e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou "*High performance liquid chromatography*") acoplada ao espectrômetro de massas. Entretanto, a técnica ELISA é bastante demorada e dispendiosa por depender de kits ou anticorpos importados, enquanto que a técnica de HPLC utiliza equipamentos caros e mão-de-obra altamente qualificada.

Em 2001 e em 2012 foram desenvolvidos aptâmeros para a detecção da microcistina, permitindo que novos ensaios fossem desenvolvidos para a detecção desta molécula (Nakamura, 2001; Ng et al., 2012). Aptâmeros são pequenas moléculas de ácidos nucleicos de fita simples ou polímeros de aminoácidos que reconhecem e se ligam com alta afinidade e seletividade a moléculas-alvo como se fossem anticorpos monoclonais, sendo por isso, conhecidos por "anticorpos químicos" (Song et al., 2012; Xi-Hui et al., 2013).

Para a construção dos aptâmeros utiliza-se a técnica de sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX - "*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*"). Esta técnica compreende a síntese de grandes bibliotecas - na ordem de 10^{15}

sequências randômicas de oligonucleotídeos de mesmo tamanho e contendo regiões iniciadoras para amplificação (uma grande biblioteca pode permitir a reação dos oligonucleotídeos com quase todos os tipos de moléculas presentes na natureza). Em seguida, a biblioteca é exposta ao ligante-alvo e aqueles oligonucleotídeos não ligados são separados, por exemplo, por cromatografia de afinidade. Os oligonucleotídeos ligados são separados das moléculas-alvo e amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR – "polymerase chain reaction"). A nova biblioteca é exposta novamente ao ligante-alvo, reiniciando o ciclo. Estes ciclos são repetidos por várias vezes enquanto que as condições estabelecidas para a separação do oligonucleotídeo ao ligante-alvo vão se tornando mais rígidas, de forma a selecionar, a cada ciclo, as sequências de maior afinidade pela molécula-alvo (Mairal et al., 2008). Cada sequência oligononucleotítica possui uma estrutura tridimensional única, permitindo a sua ligação específica a moléculas-alvo (Song et al., 2012), destacando, dentre outras, a ligação por pontes de hidrogênio e por interações hidrofóbicas (Citartan et al., 2012).

Os aptâmeros possuem algumas características desejáveis frente aos anticorpos tradicionais, como: estabilidade à temperatura ambiente, fácil produção ("*in vitro*"), baixo custo, quimicamente sintetizados sem variações de lote, baixa toxicidade e imunogenicidade, ligar a diversos tipos de moléculas-alvo (Homann & Göringer, 1999; Song et al., 2012), podem apresentar alta afinidade e especificidade e sua marcação não gera perda de afinidade, dentre outras (Mairal et al., 2008).

Os aptâmeros de DNA são considerados os mais estáveis e por isso, mais indicados para análises ambientais e de diagnóstico, podendo facilmente ser usados em campo (Vivekananda & Kiel, 2006). Os aptâmeros desenvolvidos para a microcistina nos anos de 2001 e 2012 são aptâmeros de DNA (Nakamura et al., 2001; Ng et al., 2012). Estes últimos autores desenvolveram aptâmeros com maior afinidade, sendo que sua aplicação em um biossensor (aptasensor) de ouro foi testada no mesmo trabalho, através da técnica eletroquímica de voltametria de onda quadrada. Neste trabalho, a linearidade estabelecida foi de 10 pM a 10 nM, com limite de detecção bem abaixo do limite estabelecido pela legislação (Ng et al., 2012). O mesmo grupo testou em 2014 a aplicação da mesma técnica eletroquímica para um eletrodo impresso de grafeno (Dropsens, referência 110GPH), utilizando um dos aptâmeros desenvolvidos no trabalho de 2012, AN6. Sob condições otimizadas, estes autores encontraram um limite de detecção de 1,9 pM e máximo de detecção de 10 μM de microcistina-LR. Além disso, recuperaram mais de 90% de microcistina-LR em água fortificada (contaminada artificialmente) com esta toxina e mais de 98% da toxina em músculo de peixe fortificado (Eissa et al., 2014).

Outros autores apresentaram resultados bastante promissores para um imunoensaio de aptâmero-anticorpo ("*aptamer-antibody immuneassay*", AAIA), desenvolvido em capilares de vidro e com detecção da microcistina por quimioluminescência em um sistema portátil (Xiang et al., 2014). Neste caso, o aptâmero RC6 (desenvolvido por Ng et al., 2012) foi o que apresentou melhores resultados, com detecção de MC-LR na faixa de 0,5– 4,0 μg L^{-1} e sensibilidade de 0,3 μg L^{-1}. Este sistema foi testado em amostras de lagos fortificadas com microcistina-LR, apresentando recuperações acima de 90% e tempo total de análise de 35 min.

Assim, de acordo com as características dos aptâmeros que os tornam vantajosos para ensaios e pelo sucesso de seu uso em biossensores eletroquímicos e nos testes imunoenzimáticos tipo AAIA para a microcistina, aliado à ocorrência de microcistinas em reservatórios de água para consumo humano no Brasil e ao alto custo, demanda de tempo ou necessidade de mão-de-obra qualificada para a realização das detecções desta toxina pelos métodos tradicionais, torna-se também relevante estudar algumas aplicações dos aptâmeros desenvolvidos a novos protótipos de detecção de microcistina-LR, com o objetivo de atingir um sistema sensível, barato e de fácil aplicação em território nacional.

1.1 JUSTIFICATIVA

Considerando a crescente tendência à eutrofização dos ambientes aquáticos e, consequentemente, ao aumento de florações de cianobactérias em reservatórios e corpos d´água, associados aos reconhecidos efeitos tóxicos – inclusive fatais - das cianotoxinas sobre a biota, faz-se necessário conhecer o papel de doses realísticas em peixes considerando diferentes estágios do ciclo de vida. Além disso, qualquer esforço que possibilite o controle na qualidade da água, como os biosesnsores de baixo custo e alta eficiência para a detecção de microcistinas constitui ações necessárias ao manejo de reservatórios e mananciais, principalmente naqueles utilizados para o abastecimento de populações humanas.

Em relação ao piriproxifem, embora este não apresente toxicidade relevante para mamíferos, os prévios relatos de sua toxicidade em peixes faz com que esforços sejam concentrados no seu real potencial tóxico, principalmente em um momento em que esse produto passa a ser cada vez mais utilizado. Os estudos em organismos não alvos, como em peixes, sob concentrações realísticas são de evidente importância, visto que constituem modelos bastante utilizados e que apresentam uma semelhança notória em termos celulares com vertebrados superiores, inclusive mamíferos.

1.2 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o efeito subcrônico da microcistina-LR e piriproxifem sobre a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e de seu possível efeito sinérgico sobre os estágios iniciais de desenvolvimento de *Rhamdia quelen*, bem como, avaliar métodos para o desenvolvimento de um sistema de detecção de microcistina-LR com base na aplicação de aptâmeros.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I:

- Avaliar o efeito subcrônico de doses realísticas de microcistina-LR administradas por via trófica na forma de extrato e padrão purificado em juvenis tilápia do Nilo (*O. niloticus*) através do uso de biomarcadores moleculares, bioquímicos e morfológicos.
- Avaliar o efeito subcrônico de concentrações realísticas de piriproxifem administradas por via hídrica em juvenis tilápias do Nilo (*O. niloticus*) através do uso de biomarcadores moleculares, bioquímicos e morfológicos.

Capítulo II:

- Avaliar o efeito da microcistina-LR na forma de extrato algal e do piriproxifem, de forma isolada e conjunta sob concentrações realísticas, nos estágios iniciais de desenvolvimento do jundiá (*Rhamdia quelen)*.
- Aplicar os resultados em um modelo matemático desenvolvido para a previsão de densidade populacional de *R. quelen* ao longo de 100 anos de exposição à microscistina e ao piriproxifem administrados isoladamente ou em misturas.

Capítulo III:

- Avaliar a interação de aptâmeros com oligonucleotídeos com regiões complementares em ensaio de mudança de mobilidade eletroforética sob diversas condições de temperatura de incubação;
- Avaliar a interação de aptâmeros com microcistinas e outros aptâmeros para a verificação da funcionalidade de um sistema sanduíche em ensaio de mudança de mobilidade eletroforética;
- Avaliar a interação de aptâmeros com microcistinas em ensaio de dicroísmo circular e ressonância plasmônica de superfícies;

- Avaliar a funcionalidade de um sistema em microplacas utilizando aptâmeros fluorescentes para a revelação do sinal – ensaio ALISA sanduíche;
- Avaliar a funcionalidade de um sistema em microplacas utilizando aptâmeros fluorescentes ou anticorpos conjugados à HRP ou fosfatase para a revelação do sinal – ensaio AAIA;
- Avaliar a funcionalidade de dispositivos de papel e ouro para análises eletroquímicas através de ensaios em voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica – estabilidade de sinal, conjugação de biomoléculas (aptâmeros ou anticorpos) e detecção de microcistinas.

1.4 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho está organizado em três capítulos, sendo os dois primeiros apresentados em forma de artigo científico e por terem sido submetidos à publicação (*Chemosphere* e *Ecotoxicology and Environmental Safety*, respectivamente). No primeiro capítulo foram estudados os efeitos de microcistina-LR provenientes de extrato algal e de padrão comercial purificado através de administração trófica ou do piriproxifem através de exposição hídrica sobre a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). No segundo capítulo ovos embrionados de jundiá (*Rhamdia quelen*) foram expostos por via hídrica a três concentrações de microcistina do extrato algal (1, 10 e 100 $\mu g\ L^{-1}$), a 2 concentrações de piriproxifem (mínimo de 0,10 e máximo de 2,44 $\mu g\ L^{-1}$) ou às combinações destas concentrações de contaminantes. No terceiro capítulo estão descritos os métodos utilizados e testados para discutir o desenvolvimento de um biossensor baseados em aptâmeros e/ou anticorpos para a detecção de microcistina-LR. Para aplicação de aptâmeros, primeiramente foram estudadas algumas interações moleculares que favorecessem a sua ligação a suportes - como ancoramento por um oligonucleotídeo de timinas – oligo dT - e as interações entre aptâmeros modificados (com caudas e *primers*) e microcistinas, a fim de definir os aptâmeros mais adequados. Para a detecção, foram utilizados ensaios em microplacas – ALISA ("*A*ptamer-*Linked Immobilized Sorbent Assay*") sanduíche e competitivo e AAIA ("*aptamer-antibody immunoassay*") sanduíches e competitivos, além de testes eletroquímicos de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância (EIS) em dispositivo de papel sulfite, desenvolvido pelo Laboratório de Dispositivos e Sistemas Funcionais do LNNANO (Laboratório Nacional de Nanotecnologia do CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais). Nesta parte do trabalho, os ensaios foram desenvolvidos no Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP e no Instituto Carlos Chagas – ICC, ambos em Curitiba.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DE *Microcystis aeruginosa* E EXTRAÇÃO DE MICROCISTINAS

O cultivo da cepa de *Microcystis aeruginosa* foi realizado no Centro de Tecnologia em Saúde e Meio Ambiente do Tecpar (CSA) – Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Para o cultivo, a cepa BB05- Barra Bonita – cedida pela Universidade de São Carlos - produtora da microcistina LR – foi realizado em meio ASM-1 modificado (Jacinavicius et al., 2013) sob condições de temperatura e intensidade luminosa controladas, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e aeração contínua. O crescimento das culturas foi acompanhado através de contagens de células em microscópio óptico e câmara de Newbauer. Ao atingir a concentração aproximada de 10^6 células mL^{-1}, as culturas foram interrompidas, centrifugadas a 3000 × g em 4 ºC for 15 min e o "pellet" celular foi liofilizado por 3 dias. Para a extração da toxina seguiu-se o Método H do trabalho de Silva-Stenico et al., (2009): 10 mL de água ultrapura foi adicionada a 0,1 g de células liofilizadas e a solução foi tratada em banho ultrassônico por 3 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 3000 × g at 4 ºC for 5 min e o sobrenadante foi separado. O pellet celular foi re-extraído mais duas vezes através do mesmo procedimento. Os sobrenadantes (extrato algal) foram combinados totalizando um volume de 30 mL e estocados em – 20 °C até o uso. Estes cultivos foram realizados principalmente para poder expor os animais-teste ao extrato algal, de forma a simular ao máximo, a exposição natural à qual os organismos estariam sujeitos em ambiente aquático; no caso do experimento com os peixes jovens, a exposição foi realizada ao extrato algal e à toxina purificada para comparação se haveria diferenças na toxicidade dentre as duas formas de apresentação da microcistina.

2.2 QUANTIFICAÇÃO DA MICROCISTINA-LR

A quantificação da microcistina nas soluções preparadas a partir do extrato algal, do padrão comercial e extratos de tecido animal foram realizadas no CSA-TECPAR.

As soluções aquosas das amostras foram analisadas segundo o método de Dahlmann et al (2003). Para as análises, as amostras foram filtradas em filtros PVDF 13 mm com 0,22 μm de diâmetro de poros e recolhidos diretamente em vial HPLC. A concentração da MC-LR foi determinada em um sistema LC-ESI-MS/MS consistindo de cromatógrafo a líquido (Accela UHPLC, Thermo Fisher Scientific e TSQ Vantage, Thermo Fisher Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolos API 4000 (Applied Biosystems, Foster City, CA)

com fonte de ionização eletrospray (ESI) operando no modo positivo. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Kromasil C-18 5 μm 150 x 4.6 mm (Akzo Nobel) aquecida a 40 ºC com duas fases móveis, (A) 10 % acetonitrila / 90 % H_2O e (B) 90 % acetonitrila / 10 % H_2O, ambas contendo 5mM acetato de amônio e 0,1 % ácido fórmico, com eluição em modo gradiente (0 min 65 % A; 0,5 min 65 % A; 5 min 10 % A; 5,5 min 10 % A; 5,6 min 65 % A; 11 min 65% A), fluxo de 0,8 $mL.min^{-1}$ e volume de injeção de 50 μL. MC-LR foi detectada em modo MRM utilizando-se a transição de 995,6–135,0 para quantificação e 995,6-213,1 para confirmação, com os seguintes parâmentros instrumentais: DP = 126 V, CE = 75 V, CXP = 12 V, EP = 10 V, IS = 4500 V, TEM = 550 ºC, CAD, CUR, GS1 e GS2 = 5, 15, 50 e 50 unidades arbitrárias, respectivamente. O limite de quantificação do método foi de 0,5 $ng.mL^{-1}$ nos extratos em tampão.

Para as amostras de tecido (fígado de peixe), a extração da microcistina foi realizada da seguinte forma: em tubo de centrífuga de 15 mL, transferiu-se 0,5 mL do extrato de tecido em tampão e 5 mL de H_2O. A mistura foi agitada em vórtex por 1 min e centrifugada 10 min a 6.500 min^{-1}. A solução sobrenadante foi integralmente transferida para cartucho de extração em fase sólida (SPE) C-18 (Strata-X 33 μm Polymeric Reversed Phase 500mg / 6mL, Phenomenex) condicionado previamente com 20 mL de metanol e 20 mL de H_2O, utilizando um sistema de vácuo para as eluições. O material adsorvido no SPE foi lavado com 20 mL de H_2O seguido de 20 mL de metanol 20 % em H_2O (descartados). A microcistina LR foi eluída com 40 mL de metanol 100 %, o eluato recolhido em frasco de 50 mL e evaporado a secura sob fluxo brando de N_2 em banho-maria a 35 ºC. A microcistina LR foi cuidadosamente redissolvida com 1,0 mL de mistura das fases móveis consistindo em 50:50 (Água ultrapura e 5mM de acetato de amônio em acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) e filtrada em filtros PVDF 13 mm com 0,22 μm de diâmetro de poros, recolhidos diretamente em vial HPLC. A concentração da MC-LR foi determinada em um sistema LC-ESI-MS/MS consistindo de cromatógrafo a líquido (Agilent 1100 Series, Palo Alto, CA) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolos API 4000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) com fonte de ionização eletrospray (ESI) operando no modo positivo. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Kromasil C-18 5 μm 150 x 4.6 mm (Akzo Nobel) aquecida a 40 ºC com duas fases móveis, (A) 10 % acetonitrila / 90 % H_2O e (B) 90 % acetonitrila / 10 % H_2O, ambas contendo 5mM acetato de amônio e 0,1 % ácido fórmico, com eluição em modo gradiente (0 min 65 % A; 0,5 min 65 % A; 5 min 10 % A; 5,5 min 10 % A; 5,6 min 65 % A; 11 min 65% A), fluxo de 0,8 $mL.min^{-1}$ e volume de injeção de 50 μL. MC-LR foi detectada em modo MRM utilizando-se a transição de 995,6–135,0 para quantificação e 995,6-213,1

para confirmação, com os seguintes parâmentros instrumentais: DP = 126 V, CE = 75 V, CXP = 12 V, EP = 10 V, IS = 4500 V, TEM = 550 ºC, CAD, CUR, GS1 e GS2 = 5, 15, 50 e 50 unidades arbitrárias, respectivamente. O limite de quantificação do método foi de 0,5 $ng.mL^{-1}$ nos extratos em tampão. Como padrão para a curva analítica, foram utilizados 5 mg L^{-1} de padrão de microcistinas RR, YR and LR (Fluka™).

2.3 QUANTIFICAÇÃO DO PIRIPROXIFEM

O produto Sumilarv™ da Sumimoto Chemical (Chemical Abstract Service [CAS] Registry Number 95737-68-1), composto por 0,5% de piriproxifem em areia vulcânica de liberação lenta foi obtido da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná – Regional de Paranaguá e diluído diretamente em água ultrapura ou água reconstituída para as contaminações. Para favorecer a liberação do princípio ativo do granulado, as soluções foram agitadas por 15 min em agitador magnético logo após o preparo. Para a análise do piriproxifem, foi utilizada cromatografia líquida acoplada a espectrometro de massas (*liquid chromatography/tandem mass spectrometer - Applied Biosystems* – API 4000) usando ionização via eletrospray. A injeção da amostra foi realizada de forma direta após filtração em membrana milipore® PVDF de 0,45 μm (EPA Method 538, com modificações - EPA, 2009). A separação cromatográfica foi feita usando uma coluna C18 de 4,6 x 150mm marca Kromasil (Akzo Nobel), aquecida a 40°C e duas fases móveis de (A) ácido fórmico 0,1% em água e (B) acetonitrila 0,1% ácido fórmico (0 min 100% A; 3 min 100% B; 12 min 100 %B; 13 min 100% A; 15 min 100%A), fluxo de 0,60 $mL.min^{-1}$ e volume de injeção de 20 μL. O piriproxifem foi detectado em modo MRM utilizando-se a transição de 322,20-96,20: DP = 36 V, CE = 21 V, CXP = 15 V para quantificação e 322,20-185,1 para confirmação, com os seguintes parâmetros instrumentais: DP = 36 V, CE = 29 V, CXP = 15 V. O limite de quantificação do método foi de 0,5 $ng.mL^{-1}$. As amostras foram analisadas por meio de comparação usando uma curva de calibração feita com soluções de 0,3; 1,0 ; 2,5 ; 5,0 e 10 ug/L de piriproxifem.

2.4 CAPÍTULO I

2.4.1 Coleta, manutenção e contaminação dos animais.

2.4.1.1 Desenho experimental para exposição de indivíduos juvenis à microcistina

Exemplares de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) juvenis (~ 20 g e 10 cm) (Figura 3) foram coletados na Piscicultura da Fundação 25 de Julho – Secretaria de Desenvolvimento Rural de Joinville (SDRURAL, SC) e trazidos para o Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR em Curitiba.

Figura 3. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758). Perciformes:Cichlidae. Fonte: <http://ffish.asia/?p=none&o=ss&id=394>.

Para o experimento, os animais foram aclimatados por 1 semana em 14 tanques de 100 L com 8 animais distribuídos aleatoriamente por tanque, sendo dois tanques por grupo experimental. Os grupos estabelecidos foram: controle (C), extrato algal de microcistina-LR bruto (sem filtração) nas doses de 0,04 (E1); 0,4 (E2) e 4 $\mu g\ kg^{-1}\ dia^{-1}$ (E3) e toxina purificada (padrão comercial) nas mesmas doses, 0,04 (Pu1); 0,4 (Pu2) e 4 $\mu g\ kg^{-1}\ dia^{-1}$ (Pu3), conforme Figura 4.

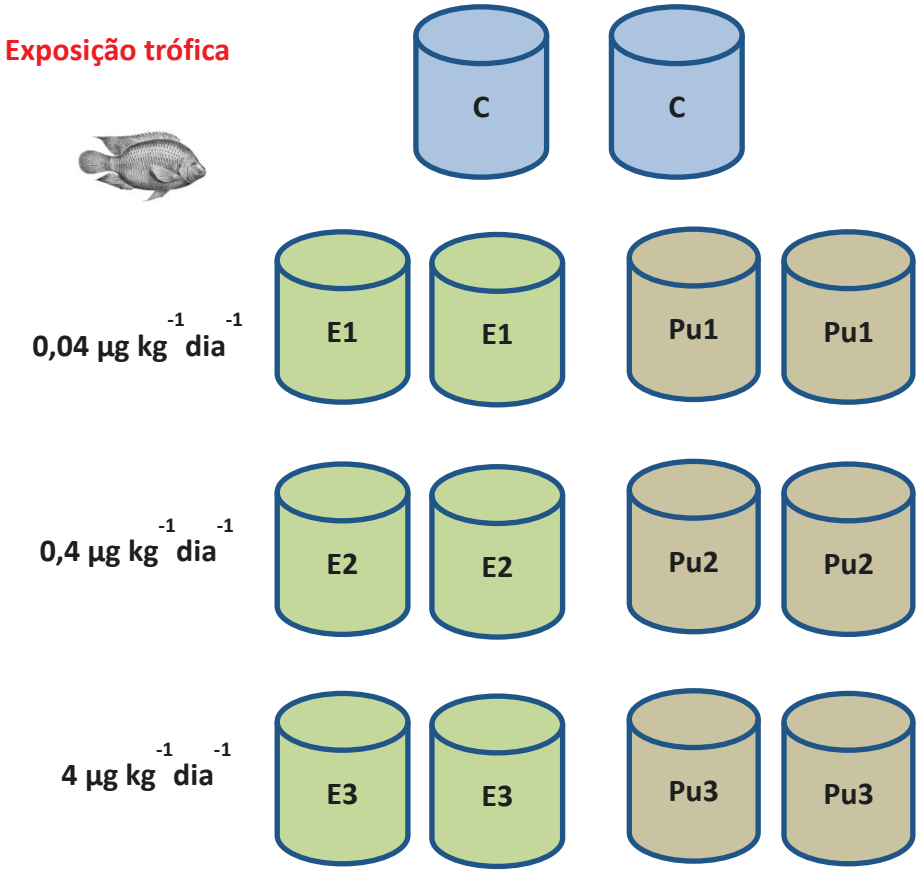


Figura 4. Diagrama esquemático da montagem dos tanques para o experimento de exposição trófica de *O. niloticus* à microcistina-LR. C= controle; E= extrato algal; Pu= toxina purificada. 1= dose de 0,04 µ= kg^{-1} dia^{-1}; 2 = dose de 0,4 µ 2 = $^{-1}$ dia^{-1} e 3 = dose de 4 µ 3 = $^{-1}$ dia^{-1}.

Para a manutenção dos animais, cada tanque recebeu água filtrada em filtro de carvão ativado e retenção de partículas e um sistema de filtração composto por bomba submersa para circulação de água (fluxo: 1000 L h^{-1}) e conjunto de elementos filtrantes - quartzite para filtração biológica, carvão ativado, zeolita para a remoção de compostos como amônia e nitrito e manta tipo Perlon™ para a filtração mecânica de resíduos de alimentos e fezes. O fundo dos tanques foi sifonado a cada dois dias para a remoção de fezes e detritos, sendo nesse momento trocada 25% da água. A temperatura foi mantida entre 25-30°C através de termostato e a alimentação foi realizada *"ad libidum"* diariamente.

Para a administração da toxina, uma solução concentrada de 10.000 µg L^{-1} – conforme Anexo 1 - foi diluída em água ultrapura em 3 concentrações: 4000, 400 e 40 µg L^{-1}; a partir destas soluções foram calculadas as respectivas doses (4, 0,4 e 0,04 µg kg^{-1} dia^{-1}). A administração das doses foi realizada por via trófica com cânula própria a cada 10 dias após anestesia com 120 mg mL^{-1} de MS222 (tricaína-metano-sulfonato) seguida de medição e

pesagem dos animais. Estas doses foram estabelecidas com base em concentrações possíveis de serem encontradas nos ambientes impactados e na dose diária aceitável para humanos (TDI - "*tolerable daily intake*"), de 0,04 µg kg^{-1} dia^{-1} e derivações desta dose em 10 e 100 vezes (de 0,4 µg e 4 µg kg^{-1} dia^{-1}, respectivamente). Através da TDI foi estabelecida a concentração à qual o ser humano poderia estar submetido diariamente de 1 µg L^{-1} (WHO, 1999). Dessa forma, as derivações acima representariam exposições a 10 e 100 µg L^{-1}, respectivamente, ambas realísticas para ambientes eutrofizados e com floração de cianobactérias. A concentração da solução de maior concentração (4000 µg L^{-1}) foi quantificada para confirmação das diluições.

2.4.1.2 Desenho experimental para exposição de indivíduos juvenis ao Piriproxifem

Machos jovens de *O. niloticus* (~ 95 g e 18 cm) foram coletados na Piscicultura Panamá em Paulo Lopes – SC e trazidos para o Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR em Curitiba. Os animais foram aclimatados por 1 mês em 3 tanques de 500 L com aproximadamente 15 indivíduos por tanque, sendo estabelecido 1 tanque por grupo: controle, 10 µg L^{-1} (P1) e 100 µg L^{-1} (P2) de princípio ativo, conforme Figura 5.

Cada tanque foi aquecido por 2 aquecedores com termostato e recebeu água filtrada e um sistema filtrante conforme o descrito acima. A sinfonagem do fundo dos tanques para a remoção de excretas e detritos foi realizada 1 vez por semana, com troca de 1/3 da água, sendo essa aquecida para a mesma temperatura dos tanques antes das trocas.

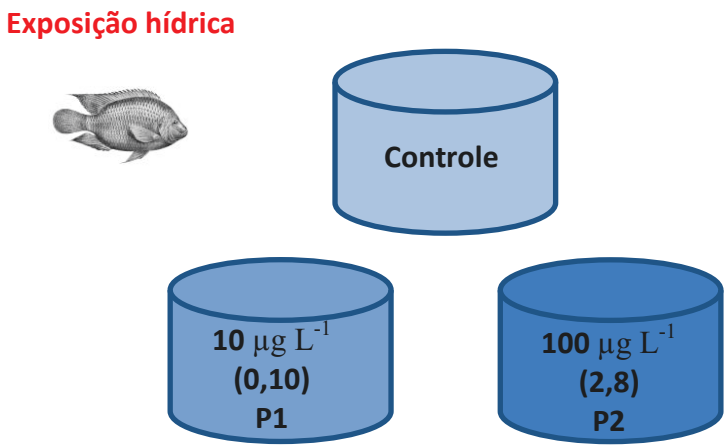


Figura 5. Diagrama esquemático da montagem dos tanques para o experimento de exposição hídrica de *O. niloticus* ao piriproxifem (Sumilarv®). Duas concentrações foram utilizadas: P1= 10 µg L^{-1} e P2= 100 µg L^{-1}. Os valores entre parênteses correspondem aos valores máximos encontrados (em µg L^{-1}) de concentração do piriproxifem medidos nas soluções dos tanques.

Para as contaminações com o piriproxifem, dois tanques receberam o produto Sumilarv™ uma vez por semana a cada troca parcial de água nas concentrações de 10 μg L^{-1} e 100 μg L^{-1}. Para favorecer a liberação do princípio ativo do granulado, o produto foi diluído em água ultrapura e agitado, conforme anteriormente descrito, antes de sua administração nos tanques. As contaminações subsequentes foram realizadas nas mesmas concentrações de 10 μg L^{-1} e 100 μg L^{-1}, porém, considerando o volume de reposição de 1/3 da água do tanque (100 L).

As concentrações utilizadas tem como base a concentração recomendada para utilização em água de reservatório doméstico e que se destina ao consumo humano (10 μg L^{-1}) e 10 vezes esta concentração. Esse valor poderia ser encontrado em caixas de água onde foi aplicado o produto para o volume final, caso houvesse escassez e consequentemente haveria diminuição do volume de água no reservatório. As concentrações reais de piriproxifem foram medidas em ambas as soluções testadas. A exposição aos diferentes contaminantes foi realizada por vias de administração diferente para simular a exposição pela ingestão de cianobactérias produtoras de microcistinas e a exposição ao piriproxifem presente diretamente na água.

2.4.2 Coleta do material biológico

O experimento com microcistina durou 60 dias com administração das doses a cada 10 dias, totalizando 6 doses, enquanto o experimento com piriproxifen durou 62 dias com 9 exposições. Para a coleta dos tecidos em ambos os experimentos, primeiramente os animais foram anestesiados com MS222 (120 mg mL^{-1}). Em seguida, cerca de 1 mL de sangue foi coletado por punção na veia caudal através de seringas e agulhas heparinizadas. Na sequência, os animais tiveram seus parâmetros biométricos (massa e comprimento total) aferidos e foram sacrificados pelo rompimento do cordão nervoso dorsal acima da coluna vertebral. Após este procedimento foram coletados os seguintes órgãos: cérebro, fígado, gônadas e músculo.

2.4.3 Processamento inicial das amostras

Uma alíquota do sangue total foi utilizada para quantificação da hemoglobina total. O restante do sangue foi centrifugado por 4000 x g, por 5 min e o plasma obtido foi colocado em tubos tipo Eppendorf e congelado. O fígado e as gônadas foram primeiro pesados e em seguida, um fragmento do fígado foi separado para microscopia de luz em cassetes

histológicos e fixado em Alfac. Após 16 h, este fixador por substituído por álcool 70% e armazenado sob refrigeração a 4°C até o seu processamento. Outro fragmento do fígado também foi separado para análises bioquímicas, assim como o músculo e cérebro, sendo imediatamente congeladas e mantidas em freezer -80 ºC até o seu processamento.

2.4.4 Análises Biológicas

2.4.4.1 Determinação da concentração de hemoglobina

Para determinação da hemoglobina (g dL^{-1}) foi utilizado o método da Cianometahemoblobina, no qual todos os eritrócitos são lisados e a hemoglobina é convertida à cianometahemoglobina após sua reação com a solução de Drabkin, que contém ferricianeto e cianeto de potássio. Para o ensaio, 10 µL de sangue total recém-coletado foi agitado em vórtex com 1 mL de solução de Drabkin. Após 10 min de incubação com esta solução à temperatura ambiente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro em 540 nm. Como padrão de Hemoglobina para a obtenção da equação da reta de regressão linear, utilizou-se sangue humano recém-dosado por laboratório de análises clínicas e diluído de forma serial.

2.4.4.2 Índices Biométricos

Cálculo do Fator de Condição: Esse índice é uma relação entre a massa do animal e seu comprimento, indicando a saúde global do organismo. Para o cálculo é utilizada a seguinte fórmula:

CF (%) = 100 x massa corporal (g)/(comprimento (cm))^3

Cálculo do Índice Gonadossomático (IGS): O IGS faz uma relação proporcional entre o peso das gônadas em relação à massa corporal, podendo indicar algum comprometimento do órgão e é calculado por através da seguinte fórmula:

IGS (%) = 100* massa gonadal/massa corporal

Cálculo do Índice Hepatossomático (IHS): O IHS faz uma relação proporcional entre o peso do fígado em relação à massa corporal, podendo indicar algum comprometimento do órgão e é calculado através da seguinte fórmula:

IHS (%) = 100* massa do fígadol/massa corporal

2.4.4.3 Processamento do material para análise em microscopia de luz

Para o processamento do fígado para análise histológica foi utilizado o protocolo padrão do laboratório, conforme Oliveira Ribeiro et al. (2012). Primeiramente, o material foi desidratado em uma bateria alcoólica crescente, seguido por diafanização em xilol e finalmente, inclusão em resina Paraplast Plus (Sigma®). A inclusão foi através do equipamento de processamento de tecido Micron® sendo posteriorment emblocado auxiliado pelo dispensador de resina Micron®. Em seguida os blocos foram trimados e os corte foram obtidos no micrótomo Leica Microtome®™ RM2145 com cortes de espessura de 5 µm e corados com hematoxilina-eosina. Ao final, os cortes foram preservados em laminas permanentes com resina Entellan™ e lamínula e analisadas em microscópio de luz convencional para avaliação das anormalidades histológicas.

2.4.4.4 Homogeneização dos tecidos – fígado, cérebro e músculo

As amostras de fígado, músculo e cérebro após descongeladas foram mantidas em gelo e homogeneizadas utilizando um minihomogeneizador manual, sendo o fígado homogeneizado em 500 µL de tampão tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6, PMSF 1 mM e o músculo e cérebro em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7.5, ambos gelados. Após a homogeneização, o volume foi completado para 1,5 mL e centrifugado a 12000 x g (20 min a 4°C) para precipitação de restos celulares. No caso do fígado foi necessária mais uma centrifugação após a remoção da camada de gordura no sobrenadante. O sobrenadante foi aliquotado em tubos tipo Eppendorf de acordo com o número de ensaios e armazenado a -80°C. Para a análise, as alíquotas foram descongeladas em gelo. Primeiramente, foram dosadas as proteínas totais, conforme método abaixo e a partir destes resultados, as concentrações de todas as amostras foram normalizadas para atender as exigências de cada ensaio, através de diluição em tampão de homogeneização. O sobrenadante do fígado foi utilizado para avaliação dos parâmetros relacionados com o estresse oxidativo – glutationa S-Transferase (GST), glutationa reduzida (GSH), catalase (CAT), lipoperoxidação (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO), enquanto que para o músculo e cérebro foi dosada a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).

2.4.4.5 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas totais do homogeneizado foi dosada utilizando-se o protocolo descrito por Bradford (1976). Este método baseia-se na mudança de cor do Coomassie Brilliant Blue G-250 de vermelho para azul após ligar-se a proteínas que contenham aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. O complexo formado proteínas-Coomassie Brilliant Blue G-250 possui um alto coeficiente de extinção e, por isso, possui alta sensibilidade para a quantificação de proteínas. Para os testes, o sobrenadante foi previamente diluído (1:20-50) em tampão de homogeneização e 10 µL deste foi adicionado a 250 µL do reagente de Bradford em microplacas de 96 poços utilizando o reagente de Bradford Bio-Rad Protein Assay da Bio-Rad Laboratories® e lidas a 595 nm no leitor de microplacas Synergy™ da Biotek® Instruments Inc. As análises foram realizadas em triplicata. Para a curva de calibração utilizou-se albumina de soro bovino (Sigma®) em concentrações conhecidas.

2.4.4.6 Parâmetros bioquímicos para análise de estresse oxidativo

Atividade da Glutationa-S-transferase (GST): a enzima GST catalisa a reação do substrato 1-cloro-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutationa reduzida (GSH), formando um tio éter que pode ser monitorado pelo incremento da absorbância a 340 nm. Para o ensaio, utilizou-se a glutationa reduzida e o CDNB (Acros Organics®) seguindo o protocolo de Keen et al. (1976) com modificações. Após a normalização do sobrenadante para 1 mg mL^{-1}, 20 µL deste foi adicionado em triplicata em microplaca de 96 poços, sendo utilizado como branco o mesmo volume do tampão de homogeneização. Em seguida, foi adicionado 180 µL do meio de reação (1.5 mM GSH, 2.0 mM CDNB em 0,1 M tampão fosfato, pH 6.5). A absorbância foi medida imediatamente por 300 s em intervalos de 30 s. A atividade da GST foi determinada no primeiro intervalo de 180 s cujo R^2~0.99. Para os cálculos, foi considerado o coeficiente de extinção molar do CDNB: 9,6 mM^{-1} cm^{-1}.

Concentração de Glutationa-Reduzida (GSH): esse método se baseia na precipitação de proteínas, seguido por reação de tióis não proteicos com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), gerando um produto que absorve luz a 415 nm, de acordo com o protocolo de (Sedlak e Lindsay, 1968). Para a precipitação de proteínas, adicionou-se 50 µL de 10% ácido tricloroacético (Sigma®) a 50 µL de sobrenadante não normalizado, sendo o tubo branco constituído por tampão de homogeneização. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 1000 x

g por 15 min em 4 °C e 50 µL do sobrenadante foi adicionado em triplicata em microplaca de 96 poços, recebendo em seguida, 230 µL de tris-base (0,4 M, pH 8.9) e 20 µL de 2,5 mM DTNB (Acros Organics) em 25% metanol (Merck®). Em paralelo, foi preparada uma solução de GSH (Sigma®) de concentração conhecida, que foi utilizada para a construção de uma curva-padrão de GSH (Acros Organics®) pela adição do tampão tris-base e de DTNB.

Atividade da Catalase (CAT): a enzima catalase degrada o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A reação pode ser quantificada através da redução da absorbância a 240 nm, segundo o método de Aebi (1984), com modificações. Para o ensaio, utilizou-se 100 µL de sobrenadante normalizado para 0,3 mg mL^{-1} em microplaca própria para medidas em espectro de ultravioleta. Em seguida, foi adicionado 150 µL de meio de reação composto por tampão 1 mM tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8.0 e 50 mM H_2O_2 e a absorbância foi lida imediatamente por 180 s com intervalo de 6 s. Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio: 40 M^{-1} cm^{-1}.

Peroxidação lipídica (LPO): o método se baseia na oxidação do Fe^{2+} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação de complexo Fe^{3+}-laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz em 550-570 nm (Jiang et al, 1991, 1992). Foi utilizado 200 µL de cada sobrenadante ainda congelado que recebeu a adição de 800 µL de meio de reação (0,1 mM laranja de xilenol (Acros Organics®), 25 mM H_2SO_4 (Merck®), 4,0 mM hidroxitoluneo butilado (BHT) (Acros Organics®) e 0,25 mM de sulfato ferroso amoniacal ($FeSO_4.NH_4$) (Vetec®) em metanol. Em seguida, os tubos foram agitados por inversão a cada 3 min durante 20 min e centrifugados em 9000 x g por 10 min. Então, 300 µL do sobrenadante foi adicionado em triplicata à microplacas de 96 poços e lidos em leitor de microplaca. Para o branco, utilizou-se tampão de homogeneização, tratado como o sobrenadante. Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio e hidroperóxido de cumeno ou butila: 4,3 10^4 M^{-1} cm^{-1}.

Carbonilação de proteínas: esse método se baseia na reação que ocorre entre a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com proteínas carboniladas do tipo aldeído e cetona originadas de danos oxidativos, formando dinitrofenil hidrazonas que são detectadas entre 358-370 nm (Levine et al., 1994). Carbonilas com grupos funcionais de ácidos carboxílicos, amidas e ésteres não reagem com o DNPH. Para o ensaio, 2 tubos de 200 µL do substrato normalizado para 2 mg mL^{-1} foram preparados de forma diferentes. O primeiro recebeu 500 µL (10 mM

DNPH (Acros Organics®) em HCl 2 M (Sigma®) e o segundo recebeu a mesma solução sem DNPH - tubo branco. Em seguida, os tubos foram misturados em vórtex e incubados a 37°C por 90 min. Na sequência, as proteínas foram precipitadas com 1 mL de 28% ácido tricloroacético e centrifugado a 9.000 x g por 10 min. As proteínas precipitadas foram lavadas com etanol/acetato de etila (1:1, Vetec®), misturadas em vórtex e centrifugadas. Este processo foi realizado 2-3 vezes até que a coloração da solução etano/acetato de etila fique transparente. Por fim, o precipitado foi ressuspendido em 6 M de hidrocloreto de guanidina (Sigma®) e novamente os tubos foram centrifugados a 9.000 x g por 5 min para a remoção de eventuais materiais não solúveis e finalmente pipetados na microplaca em triplicata. O conteúdo de carbonilas foi medido em leitor de placas em 360 nm. Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar das hidrazonas: 2,1 x 10^4 M^{-1} cm^{-1}

2.4.4.7 Parâmetros bioquímicos para análise de neurotoxicidade

Atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE): nesse método são avaliados o conteúdo de 2-nitrobenzoato-5-mercaptocolina (DTNB) e 5-tio-2-nitrobenzoato, os quais se originam a partir da reação entre a tiocolina – fomada pela hidrólise da acetilcolina devido à atividade da AChE – e o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). Os ensaios foram realizados segundo o protocolo de (Ellman et al., 1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998), como segue: 20 µL de sobrenadantes normalizados para 1 mg mL^{-1} do músculo ou cérebro foram adicionados em triplicata em microplaca e receberam 130 µL de solução de DTNB (0,75 mM DTNB (Sigma®) em metanol e tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7.5), protegido da luz. Na sequência, 50 µL de 9 mM iodeto de acetilcolina foi adicionado e a absorbância foi medida imediatamente em 405 nm por 420 s com intervalos de 30 s. Para o branco, foi utilizado o tampão de homogeneização (fosfato de potássio 0,1 M, pH 7.5). Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do 2-nitrobenzoato-5-mercaptoticolina: 13,6 x 10^3 M^{-1} cm^{-1}.

2.4.4.8 Parâmetros moleculares

Imunodetecção da Vitelogenina em Plasma:

Após a quantificação de proteínas plasmáticas pelo método de Bradford (1976), (diluição 1:25), as proteínas foram diluídas em tampão de amostra redutor contendo 2% lauril sulfato de sódio (SDS) e 0,05% ß-mercaptoetanol e desnaturadas a 100 °C por 5 min em

volume apropriado para 5 análises e em concentração de 1μg μL^{-1}. Após o preparo, 50 μg de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), composto por 5% de acrilamida (gel de empilhamento) e 8% (gel resolutivo), em duplicata. Na sequência foi realizada corrida eletroforética com aplicação de campo elétrico vertical para separação das proteínas, utilizando 15 mA de corrente constante por gel. As bandas de proteína presentes no primeiro gel foram coradas com *Coomassie brilliant blue* e as do segundo gel, transferidas para membrana de nitrocelulose usando um *Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell* (Bio-Rad™) em 100 V por 60 min em tampão de transferência para revelação pela técnica de *western blot*. Na sequência, as membranas foram bloqueadas com tampão TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20), adicionando de 5% de leite (desengordurado) em temperatura ambiente e lavadas 3 vezes por 5 min com tampão TBST. Então, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-vitelogenina do peixe *Geophagus brasiliensis* (Yamamoto et al., 2017) (1:20.000, preparado no laboratório) em 4°C por 16 h. Na sequência, as membranas foram lavadas 3 vezes em TBST, incubada com anticorpo de cabra anti-coelho conjugado com a enzima peroxidase de rábano "*horseradish peroxidase*" (HRP) (1:4000, Sigma Aldrich®) em temperatura ambiente por 60 min. Posteriormente as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST e realizada a revelação em filme autorradiográfico (Kodak™) usando volumes iguais de reagentes para revelação quimioluminescente (*Pierce chemiluminescent kit*, Thermo scientific®). Estas análises foram realizadas, no mínimo, duas vezes para as amostras de cada indivíduo macho, totalizando 51 amostras. Como controle positivo, foram utilizadas amostras de peixes fêmeas da mesma espécie.

Imunodetecção da microcistina-LR:

Para investigar a presença de adutos de microcistina e proteínas fosfatases por western blot em fígado e músculo dos animais expostos à microcistina foi utilizado um *"pool"* de amostras por grupo experimental e por tecido, totalizando 14 amostras. Como controles positivos foram incubados 240 μg de padrão de microcistina ou do extrato algal por kg de tecido (pesados previamente à homogeneização) a 24 °C e por 20 h. Esta dose corresponderia à soma das 6 doses administradas por gavagem aos animais na maior dose aplicada de microcistina aos peixes (4 μg kg^{-1} dia^{-1}) e considerando 10 dias de exposição por dose. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) e as concentrações de proteínas foram ajustadas para 2 μg μL^{-1} em tampão redutor como descrito acima e

desnaturado a 100 °C por 10 min. Os géis foram preparados em duplicata, utilizando 5% (empilhamento) e 12% (resolutivo) e foram aplicados 50 µg/poço das proteínas desnaturadas do fígado ou músculo. Os processos de corrida, coloração, incubações para a transferência e revelação foram realizados como descrito acima para a vitelogenina, exceto pelos anticorpos e diluições utilizadas. Como anticorpo primário (reagente com as proteínas da membrana) foi utilizado o anticorpo de camundongo anti-microcistina-LR (MC10E7, da Enzo Life Sciences) na diluição de 1:10.000 (conforme Woźny et al., 2016). Como anticorpo secundário (revelador da presença do anticorpo primário), foi utilizado o anticorpo de cabra anti-camundongo IgG conjugado com HRP (Sigma Aldrich®), na diluição de 1: 4000.

Ensaio ELISA competitivo para detecção da microcistina-LR em tecido:

O ensaio ELISA (ensaio de Imunoabsorção Enzimática, "*Enzyme-linked Immunosorbent assay*") foi realizado utilizando microplacas de 96 poços do tipo Maxisorb da Nunc™. Inicialmente os poços receberam 0,5 µg por poço de microcistina conjugada à ovalbumina (previamente conjugada) ou somente ovalbumina (controle negativo) e foram incubadas a 4 °C por 16 h. Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes com PBST (43 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl e 2,7 mM KCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4) e bloqueadas com 1% de leite desengordurado em PBST por 37°C por 1 h. As placas foram então lavadas 5 vezes com PBST e incubadas novamente a 37°C por 1 h. Na sequência foram lavadas 5 vezes para a remoção do PBST-leite e incubadas por mesmo período e temperatura com o anticorpo anti-microcistina MC10E7 (1:10.000) previamente incubado (37°C, 1h) em PBST com as amostras ou com concentrações diferentes de microcistina-LR para a curva de calibração (0: 0,005: 0,015, 0,045, 0,135, 0,270 e 0,405 ng mL^{-1} de MC-LR do padrão purificado).

Em relação às amostras, estas foram normalizadas antes dos ensaios para a concentração final de 100 µg/poço de proteínas do músculo e 5 µg/poço de proteínas do fígado. Após a incubação, a placa foi novamente lavada por 4 vezes com PBST e incubada com anticorpo de cabra anti-camundongo conjugado a HRP (Sigma®) na concentração de 1:4000 em PBST a 37°C por 1h. Finalmente, as placas foram lavadas 2 vezes com PBST e 2 vezes com PBS para a remoção do *tween* e incubadas com 5 mg de *o*-fenilenediamino(OPD) em 5 mL de 0,1 M tampão citrato fosfato, pH 5.0 e 5 µL de H_2O_2 por 30 min para a revelação de cor pela ação da peroxidase sobre a H_2O_2. A reação foi parada pela adição de 30 µL de 1M

H_2SO_4. Os resultados obtidos na amostra de fígado proveniente dos animais expostos à maior dose da toxina foram confirmados por análise cromatográfica, conforme anexo 2.

2.5 CAPÍTULO II

2.5.1 Desenho experimental para os estudos com os estágios iniciais de desenvolvimento

A solução concentrada de toxina algal de 10.000 µg L^{-1} – conforme Anexo 1 - foi diluída para 200 µg L^{-1} em água reconstituída (0,0065 g L^{-1} $CaCl_2$, 0,1335 g L^{-1} $MgSO_4$, 0,0004 g L^{-1} KCl, 0,0105 g L^{-1} $NaHCO_3$) previamente filtrada em 0,45 µm. Esta solução estoque foi diluída posteriormente para as concentrações finais de uso da microcistina: 1 µg L^{-1} (M1), 10 µg L^{-1} (M2) e 100 µg L^{-1} (M3) em água reconstituída. Estes valores foram escolhidos porque 1 µg L^{-1} (= 1ppb, M1) é o limite máximo aceitável de microcistinas em água de consumo humano, segundo a legislação brasileira (Brasil, 2011) e pela WHO (1999), enquanto que 100 µg L^{-1} (M3) é um valor de toxinas que pode ocorrer em florações de cianobactérias. O maior valor atingido registrado de microcistinas em ambientes eutrofizados até o momento foi de 25.000 µg L^{-1} (WHO, 1999).

O produto Sumilarv™ da Sumimoto Chemical (Chemical Abstract Service [CAS] Registry Number 95737-68-1), composto por 0,5% (g/g) de piriproxifem em areia vulcânica de liberação lenta foi obtido da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná – Regional de Paranaguá. Foram preparadas duas soluções-estoque, de 20 µg L^{-1} e 200 µg L^{-1} de princípio ativo utilizando água reconstuída e 15 min de agitação, seguido por filtração em papel de filtro 80 g para a remoção de material particulado de areia vulcânica. A partir destas soluções, foram preparadas as soluções de uso de concentração final de 10 µg L^{-1} (P1) – valor recomendado para a disposição do produto em caixas de água (consumo humano) para o combate à mosquitos vetores de doenças (WHO, 2008) e 100 µg L^{-1} (P2), que poderia ser encontrado em caixas de água com menor volume de água, já que a recomendação é que o produto seja colocado nas caixas da água considerando sempre o seu volume máximo (BRASIL, 2014). A partir do produto Sumilarv™, o inseticida é liberado de forma lenta para a água. Desta forma, após a quantificação do piriproxifem nas soluções teste, a exposição foi realizada em concentrações reais aproximadas de 0,17 (P1) e 1,85 µg L^{-1} (P2), respectivamente.

Um total de 12 grupos experimentais foram utilizados para este trabalho (Figura 6): controle, microcistinas nas concentrações descritas acima (M1, M2, M3), piriproxifem nas

concentrações de P1 e P2 e suas associações, para a manutenção das mesmas concentrações de microcistina e piriproxifem testadas em separado (P1M1, P1M2, P1M3, P2M1, P2M2, P2M3). As concentrações de todas as soluções contendo microcistinas e/ou piriproxifem foram testadas conforme método cromatográfico descrito em 2.2 e 2.3 – Anexo 3.

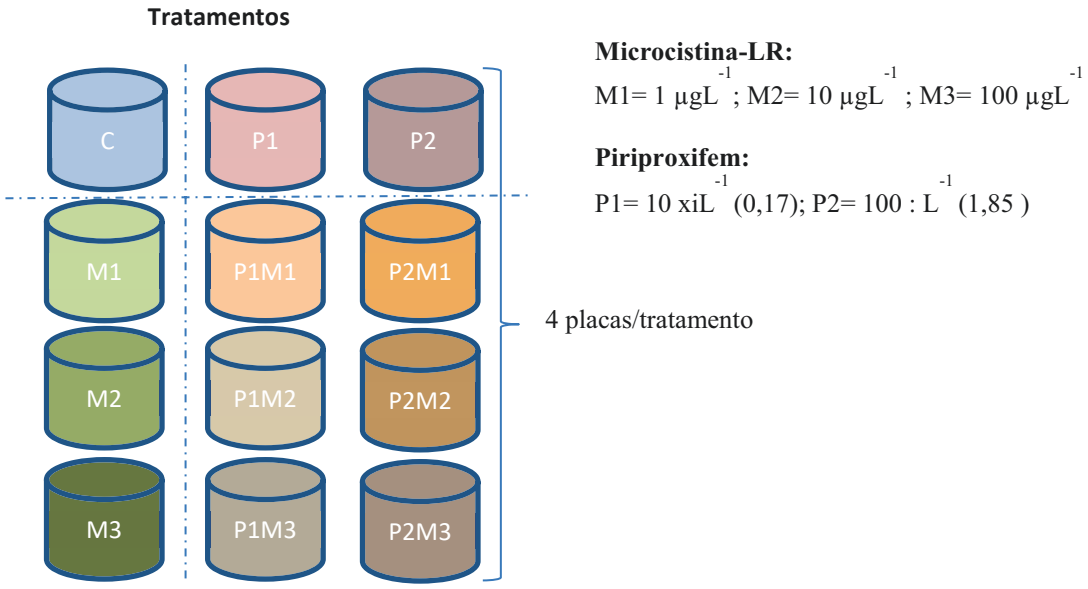


Figura 6. Diagrama esquemático da preparação das placas de 96 poços para o experimento de exposição hídrica de embriões/larvas de *Rhamdia quelen* à microcistina-LR e ao piriproxifem (Sumilarv®) por 96 horas pós fertilização. Cada poço representa 96 poços de uma placa. Foram preparadas quatro placas por tratamento. C=controle. M= microcistina-LR (MC-LR); M seguido dos números 1, 2 e 3, representam, respectivamente, as concentrações de 1 µgL^{-1}, 10 µ0L^{-1} e 100 gL^{-1} de MC-LR. P= piriproxifem. P seguido de 1 e 2, correspondem a concentrações calculadas de 10 µg L^{-1} e 100 µg L^{-1}, respectivamente. Os valores entre parênteses correspondem aos valores reais (em µem^{-1}) de concentração do piriproxifem medidos nas soluções de contaminação das placas.

2.5.2 Procedimento de fertilização dos ovos e exposição aos contaminantes

Desova parental: os ovos fertilizados da espécie *Rhamdia quelen* (jundiá) (Fig. 7) foram obtidos na piscicultura Panamá (Paulo Lopes, SC), onde o procedimento de desova encontra-se bem descrito para a espécie. Para a desova, um exemplar macho e fêmea de *R. quelen,* ambos adultos e sadios, foram colocados em tanques separados, com fluxo contínuo de água e temperatura ajustada para 21°C através de aquecedores com termostato. Então, seguiu-se o método descrito por Graeff et al. (2008), com modificações: primeiramente, a fêmea recebeu duas injeções intramusculares, na base da nadadeira, de extrato de pituitária de carpa *Cyprinus carpio,* diluídos em solução salinas nas doses de 0,5 mg kg^{-1} e 4,5 mg kg^{-1}, respectivamente, com intervalos de 8 h entre as injeções – Fig 8A. O momento da desova foi calculado considerando a soma do tempo após a administração da última injeção (em hora) e a

temperatura (°C), que, para esta espécie ocorre entre 210 e 240 horas-graus. Para a desova, secou-se muito bem o ventre da fêmea com toalha e pressionou-se levemente o ventre com movimentos em sentido antero-posterior sobre um grande recipiente plástico - Fig. 8B. Na sequência, exatamente o mesmo procedimento foi realizado com o macho - Fig. 8C. Então, os gametas foram misturados com espátula seca para a fertilização. Após 1 min da mistura, os ovos foram hidratados com água do tanque de um dos pais. Em seguida, os ovos foram embalados em sacos plásticos com atmosfera rica em oxigênio e trazidos para o laboratório de Toxicologia Celular da UFPR em Curitiba para a realização dos ensaios.

Exposição dos ovos à microcistina e piriproxifem: 8 h após a fertilização (hpf), 4.608 ovos viáveis em estágio de gástrula foram selecionados em lupa (×0.7 to 4.5) de acordo com Rodrigues-Galdino et al. (2010) e transferidos para microplaca de 96 poços (TPP®, 1 ovo por poço (MacPhail et al. 2009) previamente pipetadas com 200 µL das soluções-testes. Para cada tratamento foram preparadas 4 placas (384 embriões por tratamento). As placas foram mantidas em 24 °C em incubadora tipo BOD (Solab®, modelo SL-224). A cada 24 h, 50% das soluções-teste de cada placa foi trocada para a renovação do oxigênio e remoção de excretas. A eclosão dos ovos (sobreviventes após a saída dos ovos) foi avaliada após 28 hpf, ou seja, após 20 h de exposição aos contaminantes em todas as placas, totalizando 384 embriões avaliados por tratamento. A análise da eclosão foi realizada em 28 hpf pois permitiria avaliar possíveis atrasos neste evento, uma vez que a eclosão para a espécie ocorre por volta de 26 hpf a 24°C; a sobrevivência foi avaliada ao longo de 96 hpf - até o final da fase larval da espécie (Rodrigues-Galdino et al., 2010), sendo acompanhados e contados 192 embriões/tratamento (duas placas/tratamento) em 48 hpf, 72 hpf e 96 hpf. Para as avaliações, foi utilizado estereomicroscópio (× 0.7 to 4.5).

Figura 7. Jundiá (*Rhamdia quelen*) (Quoy & Gaimard, 1824). Siluriformes, Heptapteridae. Fonte: http://www.fishbase.se/summary/23351.

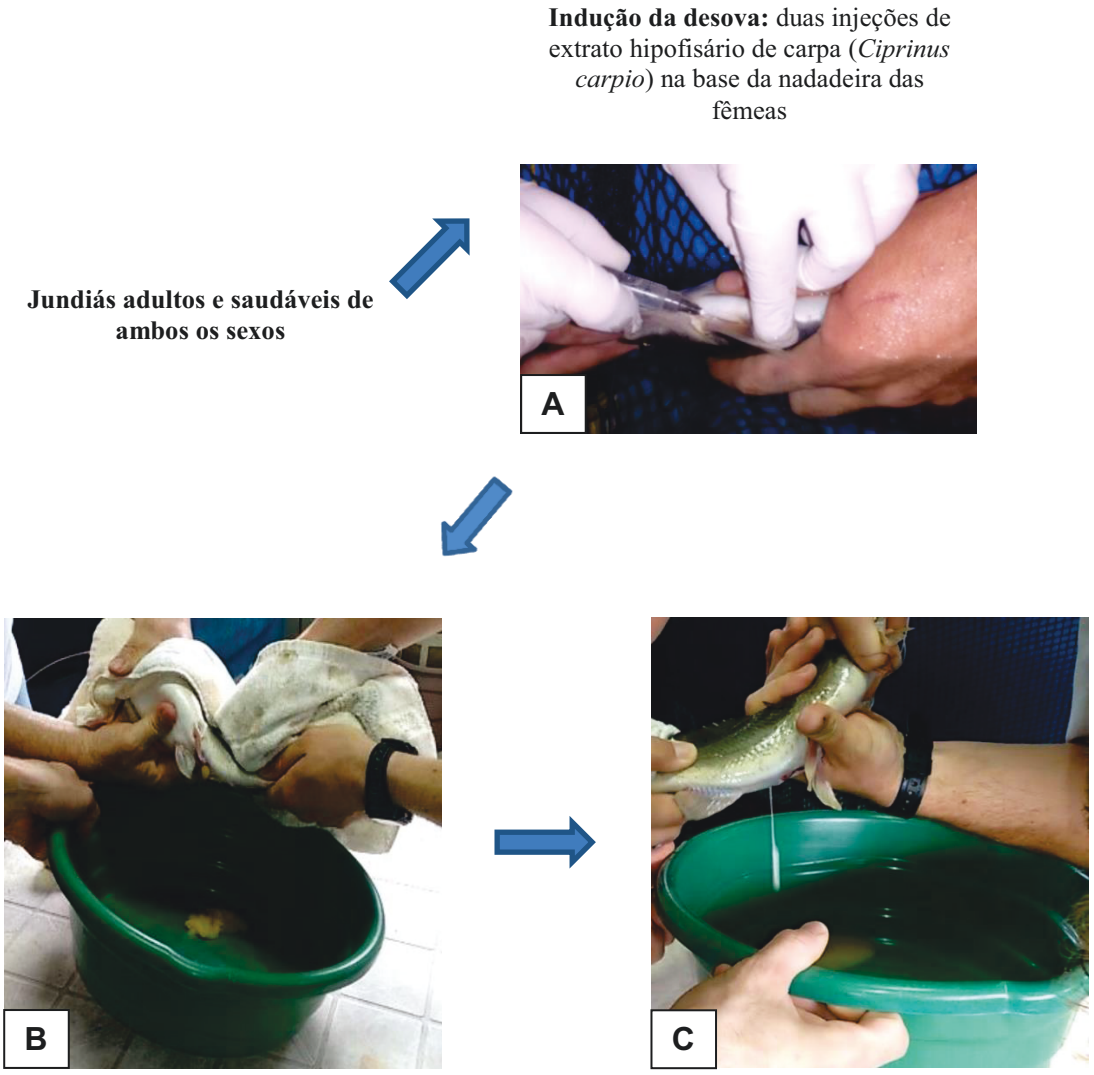


Figura 8. Sequência de eventos para a fertilização artificial de ovos de jundiás. Inicialmente foram selecionados exemplares adultos e saudáveis, de ambos os sexos. A= As fêmeas foram tratadas com duas injeções de extrato hipofisário de carpa (*Cyprinus carpio*), com intervalo de 8 h. B= após atingir o momento da desova, as fêmeas e machos (C) tiveram seus ventres pressionados, sendo os gametas liberados e misturados em repiciente de plástico com o auxílio de uma espátula (não mostrado). Após a mistura, os gametas foram hidratados embalados para transporte (não mostrado).

Para as análises morfológicas, 14-38 larvas por grupo e tempo (48, 72 e 96 hpf) foram anestesiadas com eugenol (50 mg L^{-1}) e fixadas em solução fixadora (2.5% glutaraldeído, 4% paraformoldeído em 0,1 M de tampão fosfato de sódio, pH 7.3) por 24 h em temperatura ambiente. Então, as larvas foram lavadas duas vezes com 0,1 M de tampão fosfato de sódio, pH 7.3 e estocado em 4° C até a análise. As larvas foram cuidadosamente transferidas para placas de Petri e analisadas em estereomicroscópio (×0.7 to 4.5) para avaliação de malformações/deformidades e classificadas em quatro categorias (escores de 1-4) de acordo com a severidade, sendo que aos escores maiores foram atribuídos a graus de severidades

maiores, de acordo com Powers et al. (2011). As categorias estabelecidas estão descritas na Tabela 1. Como diferentes deformidades podem ocorrer no mesmo animal, mesmo dentro de uma mesma categoria e com diferentes graus de severidade, todas as notas atribuídas ao mesmo animal foram somadas, totalizando uma faixa de 0 a 33. Cada escore individual foi utilizado para a análise estatística. Após as análises de deformidades, os animais foram transferidos para placas de 24 poços e fotografados em microscópio invertido (Leica™).

Tabela 1. Categoria de deformidade observada em *R. quelen* após exposição a microcistina-LR e piriproxifem e escore de deformidades para a severidade.

Categoria	Descrição da deformidade	Pontuação
A) Axial	Esqueletro atrofiado, Cauda enrolada, Lordose ou cifose da coluna	4
B) Nadadeiras	Lesões	1
	Atrofiadas ou danificadas	4
C) Cranial ou facial	Edema ocular pequenos otólitos ou olhos ausentes	4
	Deformidades faciaiss	3
	Deformidades bucais	4
	Barbilhões reduzidos ou ausentes	4
D) Torax ou Abdomen	Distension ou emaciação	2
	Edema cardíaco	4

Powers et al. (2011) com modificações.

2.5.3 Modelagem Matemática dos dados de sobrevivência

Foi aplicado um modelo matemático teórico previamente descrito para *R. Quelen* sobre os dados de sobrevivência dos estágios iniciais de desenvolvimento (embrio-larval), (Brito et al., 2017). Segundo estes autores, a aplicação do modelo é realizada considerando os seguintes parâmetros e cálculos: a partir dos percentuais de sobrevivência obtidos através das contagens nas placas, tem-se o valor de SobA (sobrevivência expressa na forma bruta, não percentual) e, através desse valor calcula-se a intensidade de impacto (I), dividindo-se os valores de SobA de cada grupo experimental pelo SobA do grupo controle. Desta forma, I para o grupo controle é 1, e corresponde à ausência de impacto. De posse destes dados e da probabilidade conhecida de sobrevivência em ambiente natural para cada uma das três fases do ciclo de vida, respectivamente, 0,60 para a fase embrio-larval, 0,80 para a fase juvenil e 0,65 para a fase adulta, calcula-se a probabilidade de sobrevivência para cada fase em decorrência da contaminação. Para o cálculo da probabilidade de sobrevivência nos grupos experimentais, utiliza-se a seguinte fórmula: S= I x probabilidade em ambiente natural. Como

o ambiente considera 3 fases do ciclo, calcula-se: i. (S^A) - probabilidade de sobrevivência na fase embrio-larval (A), que corresponde às 96 horas pós-fertilização; ii. (b) - taxa de sobrevivência na fase juvenil (B), que corresponde ao término do vitelo do ovo (início de busca por alimento) até um ano de idade; iii. (S^C) - probabilidade de sobrevivência na fase adulta (C) de um ano até 21 anos de idade. Assim, utiliza-se o I calculado na fase embrio-larval também para as fases de juvenil e adulto. A partir dos resultados destes cálculos (expressos na Tabela 1 do capítulo II) o modelo matemático faz a previsão do comportamento da densidade populacional ao longo dos anos. Para este trabalho, foi estabelecido que as populações não estariam sobre efeito de contaminantes por 100 anos, para que elas pudessem atingir a previsão de estabilidade. A partir do 101° ano, os efeitos dos contaminantes sobre a sobrevivência das populações foi considerado e estimou-se a densidade populacional população até o ano 200.

2.6 CAPÍTULO III

2.6.1 Métodos testados para utilização no desenvolvimento de um biosensor para microcistina

2.6.1.1 Interações moleculares

Técnica EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) – Ensaio de deslocamento de mobilidade eletroforética:

Essa técnica foi utilizada para a verificação da interação de aptâmero contendo uma cauda de adeninas (poli-A) ao oligonucleotídeo de timinas (dT). Para a realização da técnica EMSA foi inicialmente testado o melhor tampão para a corrida e para o gel, utilizando-se o tampão TBE (89 mM tris pH 8.3, 89 mM ácido bórico, 20 mM EDTA pH 8.0) ou o tampão TB (TBE sem o EDTA). A partir destes tampões, foi preparado o gel com 8 ou 12% de poliacrilamida para verificação da melhor malha para o ensaio, na presença ou ausência de $MgCl_2$, 2 mM.

Para o tampão de corrida foi utilizado exatamente o mesmo tampão utilizado no gel, TBE (ou TB) com ou sem magnésio. A corrida foi realizada em 100 V por cerca de 4 horas (30 minutos após a saída do segundo corante do gel). Para a coloração, foi utilizado o corante fluorescente SYBR Gold, que se intercala no DNA, diluído no tampão de corrida na concentração de 0,0001%. A leitura foi realizada em aparelho transiluminador.

As interações de ambas as moléculas – aptâmero com cauda poli-A e oligo-dT na presença de microcistina e de um segundo aptâmero (aptâmero 2 – marcado com fluorescência) também foram avaliadas, em concentrações equimolares e em duas condições de temperatura A e D – item 2.2 do capítulo III. Todos os aptâmeros e oligonucleotídeos mencionados neste trabalho estão descritos no capítulo III desta tese.

Ressonância plasmônica de superfície (SPR):

Para os ensaios no SPR foi utilizado o protocolo de Zheng et al. (2011), com modificações. Inicialmente, o chip (SPR Sensorchip Bionavis CMD 500 I – hidrogel carboximetildextrano – baixa densidade) foi lavado com água e etanol para sua limpeza e, em seguida, foram realizadas leituras dos ângulos nos dois canais do chip sem qualquer modificação.

Na sequência, o chip foi imerso em solução de 10 mM de ácido mercaptopropiônico (MPA) em etanol por 30 min em temperatura ambiente e lavado com etanol e água deionizada. O MPA é um ácido tiolado que possui em uma de suas extremidades um grupo tiol e na outra, um grupo carboxílico. Através do grupo tiol, o MPA se liga à superfície do ouro, formando uma monocamada auto-organizada ("SAM ou self-assembled monolayer"), deixando a extremidade carboxílica livre para interagir com outras moléculas. Após a secagem do chip ao ar, este foi imerso em solução contendo 0,2 M EDC [cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropril) *carbodiimida*] e 0,05 M de NHS (N-Hidroxisuccinimida) por 30 min em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Na sequência, o chip foi recolocado no equipamento, sendo que um dos seus canais recebeu 5 μM do aptâmero AN6-01 (previamente desnaturado por 5 min a 90 ºC e resfriado por 10 min a 4 °C – detalhes deste aptâmero na Figura 2 do capítulo III) em tampão MES 5 mM, pH 5.0, filtrado e deaerado com o auxílio de seringas. No outro canal, apenas o tampão deaerado foi administrado. A injeção foi realizada de modo paralelo, com fluxo de 20 μL min^{-1} por 10 min para a imobilização do aptâmero. Como resultados, o sinal formado foi muito baixo, indicando baixa imobilização do aptâmero.

Em seguida, nova tentativa de imobilização foi realizada, aplicando-se o mesmo aptâmero, mas na concentração de 10 μM, diluído em tampão fosfato 10 mM pH 7.4, filtrado e deaerado. Nesta tentativa, o fluxo utilizado foi de 5 μL min^{-1} por 42 min. Novamente não foi observado aumento de sinal indicativo de ligação do aptâmero.

No terceiro experimento, mesma sequência de ensaio foi realizada, com o mesmo aptâmero, porém, o EDC e NHS foram aplicados via injeção dirta pelo equipamento, em somente um dos canais e o tampão MES utilizado continha 0,1 M de MES, pH 4.5 e fora

previamente filtrado e deaerado. Esta concentração para o tampão MES baseou-se em protocolos presentes na literatura para a imobilização de oligonucleotídeos em microesferas (Angeloni et al., 2013); neste ensaio, a velocidade de fluxo de aplicação utilizada foi de 30 µL min^{-1} por 7 min.

Na sequência, 10 µM do aptâmero AN6-01 já desnaturado foi aplicado dissolvido em tampão MES 0,1 M pH 4.5, na mesma velocidade de fluxo. Novamente, não houve resultado evidente de imobilização do aptâmero no chip.

Na quarta tentativa de ensaio, foi utilizado o segundo canal do chip testado no teste anterior. Neste caso, o EDC e NHS foram injetados nas mesmas concentrações e no mesmo tampão MES utilizado no ensaio anterior, porém com velocidade de fluxo de 7 µL min^{-1} por 1 h. Neste caso, o aptâmero foi administrado na mesma concentração via injeção em tampão fosfato 1 M pH 8.0, com a mesma velocidade de fluxo por também 1 h.

Houve novamente baixo sinal de imobilização do aptâmero, porém, deu-se continuidade ao ensaio, uma vez que o aptâmero é pequeno (60 pares de bases) e talvez não apresentasse realmente uma variação tão grande de sinal. Após esta leitura, os sítios da monocamada ativados pelo EDC/NHS que não reagiram com o aptâmero foram bloqueados com solução de 1 M de etanolamina, com velocidade de fluxo de 30 µL min^{-1} por 5 min. Após esta aplicação, foi observado leve redução do sinal, indicando que a etanolamina estaria bloqueando os sítios ativados. Para confirmar este resultado, a solução de etanolamina foi também injetada no canal 1, testado no teste 3, obtendo-se o mesmo resultado de redução.

Após esta observação, injetaram-se no equipamento várias concentrações de um padrão de microcistina-LR inicialmente diluído em metanol e re-diluído em tampão de ligação (50 mM tris pH 7.5, 150 mM NaCl e 2 mM $MgCl_2$), tampão chamado neste trabalho por TL. Este tampão foi o tampão utilizado para a seleção dos aptâmeros, sendo, por isso, o mais indicado para a sua ligação à microcistina (Ng et al., 2012).

As injeções foram intercaladas por leituras do tampão TL (branco). As concentrações utilizadas seguiram a seguinte ordem: MC-LR 10 µM, MC-LR 1µM, MC-LR 100 µM, MC-LR 500 µM, MC-LR 250 µM, MC-LR 100 µM de um novo padrão (diluído inicialmente em água) e, por fim, o tampão TL contendo metanol, como um branco.

2.6.1.2 Ensaios para detecção de microcistinas

Testes em microplacas - soluções utilizadas:

Tampão carbonato: tampão carbonato, 100 mM, pH 9.6.

Tampão fosfato-EDTA: Na_2HPO_4 500 mM pH 8.5 com 1 mM EDTA (ácido etilenodiamino-tetracético).
Tampão PBS 1x: 4,3 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl e 2,7 mM KCl pH 7.4
Tampão PBST: tampão PBS 1x-tween 20 (0,05%)
Tampão PBST-leite: tampão PBS 1x-tween 20 (0,05%)- leite desengordurado (1%).
Tampão de ligação (TL): 50 mM tris pH 7.5, 150 mM NaCl e 2 mM $MgCl_2$
Tampão TBS: 10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl;
Tampão TBS-T-leite: tampão TBS-Tween 20 (0,05%)-leite desengordurado (1%);
Tampão citrato-T: tampão citrato trissódico 5x (75 mM Na_3-citrato pH 7.0, 0,75 M NaCl) – tween 20 (0,1%).

A desnaturação dos aptâmeros e/ou oligonucleotídeos foi realizada pelo aquecimento a 90°C por 5 min em termobloco seguido por resfriamento a 4 ºC por 10 min. Para as leituras foi utilizado um leitor de microplacas multi-detecção Synergy H1 da Biotek® Instruments Inc. no modo de fluorescência, com excitação em 490 nm e emissão em 525 nm para as leituras de moléculas fluorescentes ou no modo absorbância em 405 nm para os ensaios revelados por fosfatase ou 490 nm para aqueles revelados por peroxidase.

Testes preliminares ao ALISA e ALISA (Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay) – teste tipo ELISA sanduíche com aptâmeros:

Nestes ensaios foram utilizadas placas da Costar Corning DNA-bind™ e Nunc Immobilizer™. Ambas as placas são pretas de 96 poços com tratamento específico para ligações de grupamentos nucleofílicos, como aminas primárias (Matte et al., 2012; Andersen, 2012).

Como testes prévios ao ALISA sanduíche, as placas foram testadas para confirmar a ligação do aptâmero ao seu fundo (suporte sólido) através do uso de um oligonucleotídeo contendo FAM (carboxifluoresceína) complementar ao aptâmero. No ensaio ALISA este oligonucleotídeo-FAM (oligo-FAM) também foi utilizado nas mesmas concentrações da microcistina para avaliar a sensibilidade do ensaio a concentrações baixas de microcistinas como as encontradas na natureza.

Teste 1 – Interação do aptâmero com oligonucleotídeo-FAM na placa de 96 poços Costar Corning DNA–bind™.
Nesta placa o protocolo foi adaptado a partir do protocolo do fabricante da placa, disponível em Matte et al. (2012):

Sensibilização: o aptâmero AN6-02 (aminado) foi diluído em tampão fosfato-EDTA nas concentrações de 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM e 1000 nM, desnaturado e colocado nos poços da placa por 15 min em temperatura ambiente, 100 µL/poço.

Lavagens pós-sensibilização e bloqueio: o sobrenadante foi descartado e a placa foi lavada 3x com TBS, sendo bloqueada na sequência com 3 lavagens por TBS-T-leite, todos em 200 µL/poço;

Ensaio: o oligonucletídeo-FAM (C15AN6F) também foi desnaturado e adicionado sobre o aptâmero imobilizado no fundo da placa nas mesmas concentrações deste por 30 min a 55 °C em tampão de ligação TL, no escuro, 100 µL/poço; na sequência, após a redução da temperatura para a temperatura ambiente, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 1x, 200 µL/poço; foi adicionado 100 µL de PBS 1x e as leituras foram realizadas no modo de fluorescência. Neste caso, a leitura medida foi a fornecida pelo oligo-FAM.

Teste 2 – Interação do aptâmero com oligonucleotídeo-FAM e microcistinas na placa de 96 poços Costar Corning DNA–bind™:

Foi realizado o mesmo protocolo de sensibilização, lavagens e bloqueio acima, porém utilizando 500 nM de aptâmero para sensibilizar a placa. Após a sensibilização e lavagens, os poços foram incubados por 1h em temperatura ambiente com microcistina diluída em tampão de ligação TL nas concentrações de 0,1; 0,5; 1 e 10 nM (0,1 a 1 ng/poço); os demais poços (referentes ao branco e curva) receberam apenas 100 µL/poço de tampão de ligação. Decorrido este tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão TL (200 µL/poço) e todos os poços foram incubados com o oligo-FAM (100 µL/poço); nos poços que receberam microcistina, o oligo foi adicionado na concentração de 500 nM, enquanto que os poços referentes à curva receberam concentrações de 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50, 100; 500 e 1000 nM do oligo-FAM. Na sequência, a placa foi incubada em 60°C por 30 min, seguido por incubação por 10 min em temperatura ambiente. Após este passo, a placa foi lavada 3 vezes com tampão de ligação TL e as leituras foram realizadas no modo fluorescência.

Teste 3 – Interação do aptâmero com oligonucleotídeo-FAM na placa de 96 poços Nunc Immobilizer Amino™:

O teste nesta placa foi realizado a partir de adaptação do protocolo de ligação de biomoléculas do fornecedor da mesma, disponível em Andersen, 2012:

Sensibilização: o aptâmero AN6-02 (aminado) foi diluído em tampão 100 mM carbonato pH 9.6 nas concentrações de 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM e 1000 nM,

desnaturado e colocado em 100 µL/poço. A placa foi incubada por 2 h em temperatura ambiente.

Lavagens pós-sensibilização: o sobrenadante foi descartado e a placa foi lavada 3 vezes com tampão citrato-T, 200 µL/poço.

Ensaio: o oligo-FAM (C15AN6F) desnaturado foi adicionado nas mesmas concentrações do aptâmero por 30 min a 60°C em tampão de ligação TL no escuro, 100 µL/poço. Na sequência, após as placas atingirem a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e foram feitas 3 lavagens com TL 200 µL/poço. Então, foi adicionado 100 µL de TL e as leituras foram realizadas no modo de fluorescência.

Teste 4 - Interação do aptâmero com oligonucleotídeo-FAM e microcistinas na placa de 96 poços Nunc Immobilizer Amino™:

Foi realizado o mesmo protocolo de sensibilização e lavagens pós-sensibilização do teste 3. Nos demais itens, foi utilizado o protocolo descrito no teste 4.

Teste 5 - Teste ALISA – ensaio sanduíche com aptâmeros na placa NUNC Immobilizer Amino™:

Sensibilização e continuidade do ensaio: a placa foi sensibilizada com o aptâmero AN6-01-02 (aminado e de um novo lote) após sua desnaturação na concentração de 2000 nM em tampão carbonato pH 9.6 por 24 h a 4 °C. Após as lavagens e bloqueio como descritos nos testes anteriores para a placa NUNC, a microcistina foi adicionada em concentrações de 0,5; 1; 5 e 10 nM em tampão de ligação TL por 40 min a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas com tampão TL por 3 vezes e adicionado o segundo aptâmero RC6F2 (com fluorescência) com concentração de 2000 nM (100 µL/poço) em tampão de ligação TL. As leituras foram realizadas no modo fluorescência.

Teste 6 - Competitivo para verificação de ligação do aptâmero à MC-OVA (microcistina conjugada à ovalbumina):

Placa: Greiner 96 poços preta (Fluotrac™)

Sensibilização: a placa foi sensibilizada com MC-ova ou ova (ovalbumina, controle negativo) na concentração de 20 µg mL^{-1} em tampão carbonato por, no mínimo, 16 h a 4°C.

Lavagens e bloqueios: após a sensibilização a placa foi lavada 3 vezes com 200 µL de PBS–T para a remoção da MC-ova ou ova não aderidas à placa. Na sequência, a placa bloqueada com 200 µL de PBST-leite por 1h em temperatura ambiente e com agitação lenta.

Incubação com os aptâmeros: após as lavagens e bloqueios, o aptâmero AN6F2 (com fluorescência) após desnaturado foi adicionado na concentração de 1 μM por 1h com agitação lenta e no escuro. O aptâmero AN6 (sem grupamento amino, já que foi utilizado como molécula de captura o antígeno – MC-ova) também foi testado na concentração de 1 μM e no mesmo tempo, porém, como este aptâmero não continha fluorescência, foi incubado previamente por 30 min com o oligonucleotídeo C15AN6F (com fluorescência) na concentração final de 1,5 μM em tampão TL (aptâmero e oligonucleotídeo foram desnaturados juntos).

Incubação com microcistina: ambos os aptâmeros nas concentrações mencionadas foram incubados previamente por 55 min com microcistina do extrato algal filtrado (2 μM de MC em tampão TL – em excesso em relação ao oligo fluorescente para favorecer a sua ligação ao aptâmero) antes de colocá-los na placa de 96 poços.

Para as lavagens após a adição dos aptâmeros na placa, foi utilizado somente o tampão TL, para que o aptâmero não desligasse da microcistina.

Ao final, as placas receberam tampão TL e foram lidas no leitor de microplacas no modo de fluorescência.

Teste 7 - AAIA - Teste tipo sanduíche, com anticorpo monoclonal anti-ADDA ou anti-MC-LR e aptâmeros fluorescentes:

Placa: Greiner 96 poços preta (Fluotrac™)

Sensibilização: parte da placa foi sensibilizada com o anticorpo monoclonal anti-ADDA (AD4G2) de camundongo da Enzo Life Sciences e a outra parte, com o anticorpo monoclonal anti-microcistina-LR (MC10E7) de camundongo e de mesma marca – concentração inicial de ambos: 1 mg mL^{-1} – diluição: 1:10.000 (10 ng/poço) em tampão carbonato por 16 h a 4°C.

Lavagens e bloqueios: após a sensibilização a placa foi lavada 3 vezes com 200 μL de PBS–T para a remoção dos anticorpos não ligados. Na sequência, a placa bloqueada com 200 μL de PBST-leite por 1 h em temperatura ambiente e com agitação lenta.

Incubação com microcistina: após o bloqueio, foi adicionada microcistina do extrato algal na concentração de 250 μg L^{-1} (250 nM; 25 ng/poço) diluída em tampão PBST-leite por 40 min, também com agitação lenta e em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com 200 μL PBST-leite para a remoção das microcistinas não ligadas.

Incubação com aptâmeros fluorescentes ou anticorpo secundário: foram adicionados os aptâmeros AN6F2 ou RC6F2 (de acordo com o mapa da placa, não mostrado), nas condições: desnaturado e não desnaturado. Os aptâmeros foram diluídos em tampão de ligação TL para a

concentração final de 0,5 μM e foram incubados por 1h, com agitação lenta, em temperatura ambiente e no escuro. Para comprovar que os anticorpos haviam aderido à placa foi usado um anticorpo secundário anti-camundongo (mouse) com Alexa-fluor (com fluorescência na mesma faixa do FAM) diluído em tampão PBST-leite por 1 h na diluição de 1:1000, o qual foi incubado simultaneamente aos aptâmeros. Também foram feitos brancos com o tampão TL e com tampão fosfato para permitir a comparação de cada leitura ao seu padrão. Ao final, as lavagens foram feitas 3 vezes com 200 μL de TL ou PBST-leite para a remoção dos aptâmeros não ligados ou do anticorpo secundário não ligado, respectivamente.
Ao final, as placas receberam 100 μL PBS 1x e foram lidas no modo fluorescência.

2.6.1.3 Testes eletroquímicos

Preparo dos dispositivos de papel:

O Laboratório de Dispositivos e Sistemas Funcionais do LNNANO (Laboratório Nacional de Nanotecnologia do CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) desenvolveu uma plataforma de papel sulfite impermeabilizado por cera para torná-lo hidrofóbico. Em uma das faces, o papel recebe uma camada de 150 nm de ouro através de deposição por feixe de elétrons ou *eléctron-beam* - sistema Aja International (Santhiago et al., 2017). A partir deste papel tratado, os dispositivos para medições eletroquímicas foram preparados da seguinte forma: o papel foi recortado em tamanho aproximado de 2 x 4 cm e envolvido por fita adesiva em ambas as faces para sua proteção, exceto por um círculo de 2 mm perfurado na fita adesiva e disposto na face contendo ouro para a delimitação da área do eletrodo de trabalho. Além disso, na mesma face na base do eletrodo também foi deixado um espaço entre 5 e 8 mm sem fita adesiva, para a criação do terminal de contato do eletrodo e permitir a sua ligação ao potenciostato, conforme figura 4A do capítulo III.

Montagem do sistema de medição e limpeza dos eletrodos:

Para a realização das modificações do eletrodo e medições, o dispositivo foi preso em placa de Petri com fita adesiva larga com perfuração de 6 mm de diâmetro para delimitar uma área maior ao redor do eletrodo de trabalho. Este eletrodo foi posicionado logo abaixo do eletrodo calomelano e fio de platina - os quais servem como eletrodo de referência e contra eletrodo, respectivamente, para as medidas eletroquímicas - de forma a poder se colocar uma gota da sonda eletroquímica sobre o conjunto dos 3 eletrodos (conforme Figura 4B do

capítulo III). Durante as etapas de lavagens após as incubações ou após as leituras, os eletrodos foram lavados com gotas de água ultrapura ou tampão, dependendo do ensaio. Após a lavagem, o excesso de solução foi retirado de forma cuidadosa com papel absorvente.

Sondas e tampões utilizados:

A sonda eletroquímica utilizada foi a sonda de ferri-ferrocianeto de potássio – K_3 $[Fe(CN)_6]$ e K_4 $[Fe(CN)_6]$ na concentração equimolar de 0,5 mM e 0,5 M de KCl como eletrólito suporte. O excesso deste eletrólito garante que os efeitos por transporte por migração (movimento de íons através da solução causada pela atração ou repulsão entre as espécies iônicas em solução e o eletrodo de trabalho) sejam minimizados. Ao mesmo tempo, o transporte por convecção (movimentação das espécies causadas por perturbação mecânica do fluxo da solução) é minimizado por interrupção de qualquer distúrbio mecânico da solução. Desta forma, garante-se que o transporte de massa ocorra basicamente por difusão (ou seja, movimentação espontânea da espécie química devido à formação de um gradiente de concentração do analito de interesse) - https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/5180/5180_3.PDF. A sonda de ferri-ferrocianeto (ferri/ferro) possui cargas negativas e sinal bem característico de oxirredução em superfícies condutoras. O tampão fosfato foi escolhido como tampão a ser utilizado com a sonda eletroquímica em alguns testes por ser um tampão mais simples, sem maiores adições de sais que poderiam comprometer os resultados de voltametria. Estes tampões foram utilizados em 2 concentrações diferentes, sendo sempre proporcional a concentração de ferri/ferro e KCl dentre os diferentes tampões, como segue:
Tampão fosfato 10 mM (7,7 mM Na2HPO4 e 2,3 mM de NaH2PO4), pH 7.4 (ajustado com NaOH), 1 mM de ferri/ferro e 0,1 M de KCl (tampão 1, T1).
Tampão fosfato 20 mM (15,4 mM Na2HPO4 e 4,6 mM de NaH2PO4), pH 7.4 (ajustado com NaOH), 2 mM de ferri/ferro e 0,2 M de KCl (tampão 2, T2).

Medidas eletroquímicas:

A varredura de voltametria cíclica (CV) foi realizada na faixa de varredura de -150 mV a 600 mV, potencial inicial de –50 mV, 5 ciclos, velocidade de varredura de 30 $mV.s^{-1}$ e "step potencial" de 2,44 mV, sendo estes parâmetros previamente definidos para a solução de ferri/ferro para a voltametria cíclica. Para a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), os parâmetros utilizados para a mesma sonda foram: 0,1 a 100000 Hz de faixa de frequência, 0,01 V de amplitude no modo "TOP", "integration time calculation" de 0,125 s, 50 frequências, "frequency step" no modo logarítmico e tipo de onda "single sine"., no modo

de potencial de circuito aberto (OCP – *"open circuit potential"*). Estes parâmetros foram utilizados em todos os testes realizados, quando necessários. Para ambos os tipos de leitura, os eletrodos foram sempre enxaguados duas vezes antes da leitura com a sonda eletroquímica utilizada. Além disso, sempre foram medidos previamente (leitura basal) às modificações.

Teste preliminar - Condicionamento e concentrações de tampões:

Este experimento foi realizado com o objetivo de se avaliar a estabilidade de respostas de cada dispositivo, a fim de garantir o seu bom funcionamento durante todas as etapas de funcionalização do eletrodo de trabalho, imobilização de aptâmeros ou anticorpo, remoção de ligações inespecíficas e em testes com a microcistina. Além disso, nestes eletrodos foram testadas concentrações diferentes de tampão fosfato, com o objetivo de estabilizar o pH, aumentar a corrente e, por consequência, aumentar a resolução do sinal para concentrações baixas da molécula-alvo. Para os ensaios de condicionamento em sonda eletroquímica, duas varreduras em CV foram realizadas, cada uma com 5 ciclos. Em seguida, os eletrodos foram lavados, secos por evaporação e armazenados por 4 dias. Decorridos os 4 dias, novamente os eletrodos foram ciclados em voltametria cíclica (5 ciclos). Em seguida, foram testados os tampões com concentrações diferentes de sais (tampões 2 e 3) por 5 ciclos em CV, sempre com etapas de lavagens em águaultrapura entre as soluções.

Após este experimento, os demais ensaios foram sempre condicionados com duas varreduras por CV antes dos ensaios com a sonda eletroquímica ferri/ferro ou tampões T1 ou T2.

2.6.1.4 Montagem do Biossensor

Para a formação do biossensor com o dispositivo de papel, seguiram-se as seguintes etapas:

- **1ª etapa - funcionalização da superfície de ouro do eletrodo de trabalho:** esta etapa compreende a ligação de uma molécula à superfície condutora. No caso da superfície de ouro, foi utilizada uma molécula tiolada, como o ácido mercaptopropiônico, que interage com o ouro, conforme descrito no capítulo III e forma uma monocamada auto-organizada (SAM – *"self assembled monolayer"*).
- **2ª etapa - imobilização do oligo dT aminado ou aptâmero aminado ou anticorpo à SAM:** através do uso de EDC – para acoplamento de oligonucleotídeos ou EDC/NHS, para a imobilização de proteínas, conforme descrito na sequência (Angeloni et al.,

2013); – sub-etapa: hibridização com o aptâmero aminado (no caso de imobilização de oligos dT); alternativamente, pode-se ligar diretamente o aptâmero tiolado à superfície do eletrodo, sem necessidade de funcionalização prévia do dispositivo.

- **3ª etapa – bloqueios de sítios ativados e remoção de ligações inespecíficas** – através de moléculas como etanolamina ou albumina, para a remoção de ligações inespecíficas.
- **4ª etapa – incubação com a microcistina.**

Estas etapas estão descritas abaixo de acordo com cada ensaio realizado.

Teste 1- Imobilização do oligonucletídeo dT aminado sobre os eletrodos:

1ª etapa – funcionalização da superfície de ouro: a superfície do dispositivo foi tratada através do uso de 40 μL de 10 mM de ácido mercaptopropiônico (MPA) em água por 12 horas em água ultrapura no escuro para a criação da monocamada auto-organizada (SAM). Em seguida foram feitas lavagens com água ultrapura.

2ª etapa - imobilização do oligo dT aminado à SAM: a imobilização de 30 μL de 10 μM de oligo dT aminado (previamente desnaturado a 90°C/5 min) à superfície do dispositivo foi realizada através de ligação peptídica favorecida por 10 mg mL^{-1} de EDC (hidrocloreto de 1-Etil-3[3-dimetilaminopropil] carbodiiimida), em tampão 0,1 M MES, pH 4.5 por 30 min, seguida por adição de nova alíquota de EDC e incubação no escuro. Na sequência, foram realizadas lavagens utilizando 0,02% de Tween 20, 0,1% SDS e tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0), conforme o protocolo para acoplamento de oligonucleotídeos aminados do Luminex (Angeloni et al., 2013).

Sub-etapa – hibridização (ligação) do oligo dT ao aptâmero com causa poli-A: este passo foi realizado somente para os grupos que continham o oligo dT imobilizados. Neste caso, a hibridização ao oligo dT foi realizada com o aptâmero AN6A a 10 μM (40 ou 20 μL) em tampão de ligação (TL, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, pH 7.5). Esta etapa de hibridização foi feita através da colocação do aptâmero aquecido a 50 ºC diretamente sobre as superfícies modificadas com oligonucleotídeos por 20 min ou com aquecimento dos eletrodos por 10 min em chapa a 50 ºC em câmara úmida, seguido por 10 min em temperatura ambiente.

3ª etapa – bloqueios: realizada previamente, logo após a incubação com EDC durante a 2ª etapa com a solução de 0,02% de Tween 20, 0,1% SDS e tampão TE.

4ª etapa - ligação à microcistina: aplicada a solução de microcistina-padrão diluída tampão TL a 10 ou 100 μg L^{-1}, com tempo de incubação de 45 min em temperatura ambiente.

Para as leituras, seguiram-se os parâmetros de voltametria cíclica descritos em 2.6.1.3 deste capítulo.

Teste 2 - Imobilização do aptâmero aminado sobre os eletrodos:

Nesta etapa, utilizou-se um protocolo adaptado do trabalho de Zheng et al. (2011) e Angeloni et al. (2013):

1ª etapa - funcionalização da superfície de ouro: conforme protocolo do teste 1 acima -1ª etapa.

2ª etapa - imobilização do aptâmero aminado à SAM: os eletrodos de trabalho foram lavados com tampão MES 0,1 M pH 4.5, gelado, seguido por incubação com 40 μL de EDC (19 mg mL^{-1}) em tampão MES por 15 min. Em seguida, esta solução foi retirada e adicionado aptâmero (previamente desnaturado a 90°C/5 min) e nova solução de EDC, obtendo-se concentrações de aptâmero de 1,67 a 10 μM sobre o ponto de análise. Esta mistura foi agitada levemente e incubada por 1 h no escuro em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, o material foi retirado com auxílio de micropipeta e lavado 2 vezes com tampão TE pH 7.4 seguido por lavagem em tampão de ligação TL (50 mM tris pH 7.5, 150 mM NaCl e 2 mM $MgCl_2$).

3ª etapa - bloqueio da Superfície e remoção de ligações inespecíficas: os eletrodos receberam 40 μL de solução de hidrocloreto de etanolamina 1 M por 8-10 min, para o bloqueio dos sítios de MPA que não foram ativados por EDC. Em seguida, foi realizada lavagem com tampão TE pH 7.4 por 2 vezes e incubação com 100 mM de ácido fosfórico por 10 min. Por fim, foi realizada nova lavagem com TE pH 7.4 seguida por lavagem com tampão de ligação do aptâmero à microcistina (tampão TL, 50 mM tris pH 7.5, 150 mM NaCl e 2 mM $MgCl_2$), descrito por Ng et al., 2012.

4ª etapa - ligação à microcistina: antes da ligação da microcistina ao aptâmero, a superfície do eletrodo foi lavada de forma abundante com tampão de ligação. Em seguida, a microcistina foi aplicada nos eletrodos nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μg L^{-1}, com tempo de incubação de 45 min em temperatura ambiente.

Todas as leituras foram realizadas em sonda ferri/ferro em voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) nos parâmetros descritos em 2.6.1.3. deste capítulo.

Teste 3 - Experimento com aptâmeros tiolados:

Para este teste foi utilizado como referência o protocolo descrito por Ng et al., 2012 para aptâmero tiolado.

1ª etapa - funcionalização da superfície de ouro: não foi necessária.

2ª etapa - imobilização do aptâmero tiolado (obtido comercialmente, conforme item 2.1 do capítulo III) sobre o eletrodo: incubação de 8 μL de aptâmero tiolado previamente desnaturado (90 ºC por 5 min, 4ºC por 10 min e 25 min em temperatura ambiente) sobre o eletrodo em estufa a 37°C por 10 min (ou até secar). Após o esfriamento do eletrodo, este foi lavado 3 vezes com tampão de ligação (TL).

3ª etapa - bloqueio da superfície e remoção de ligações inespecíficas: os eletrodos foram incubados com 1- hexanetiol (0,1% por 2 min – após ajustes de tempo e concentração). Em seguida, o eletrodo foi enxaguado 3 vezes com tampão de ligação (TL).

4ª etapa - ligação à microcistina: o eletrodo foi enxaguado novamente com TL, seguido por incubação com 40 μL (gota disposta sobre o eletrodo para a reação) de 20 μg L^{-1} de microcistina-LR por 30 min. Ao final deste tempo, o eletrodo foi enxaguado por 3 vezes com tampão TL.

Todas as leituras foram realizadas em sonda ferri/ferro em espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) nos parâmetros descritos em 2.6.1.3. deste capítulo.

Teste 4 - Experimento com anticorpos e microcistinas:

Nesta fase o objetivo foi avaliar as respostas dos eletrodos frente à funcionalização com MPA, imobilização do anticorpo monoclonal para a microcistina MC10E7, bloqueios e detecção de microcistina.

1ª Etapa - funcionalização com MPA: os eletrodos foram incubados por 28 h a 4 °C e sem agitação com 30 μL de 10 mM de MPA em água. Em seguida, foram enxaguados 5 vezes com água para a remoção do MPA e medidos em voltametria cíclica e impedância nos tampões T1 (10 mM fosfato, 1 mM ferri/ferro e 0,1 M KCl pH 7.4) e T2 (20 mM fosfato, 2 mM ferri/ferro e 0,2 M KCl pH 7.4).

2ª Etapa - Imobilização do anticorpo: após as medidas realizadas na etapa 1, os eletrodos foram lavados 3 vezes com água e armazenados secos por 3 dias. Então, os eletrodos foram lavados com água e incubados em temperatura ambiente e no escuro com 50 μL de 2 mM de EDC e 5 mM NHS-sulfa em água, por 1h20min, com agitações ocasionais leves.

Após a incubação, o excesso de EDC/sulfa-NHS foi removido com micropipeta e foram realizadas 3 lavagens com tmapõa fosfato salino (PBS – *"phosphate buffered-saline"*) 1x -

(4,3 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl e 2,7 mM KCl). Em seguida, 20 µL do anticorpo anti-microcistina MC10E7 em PBS 1x foram incubados sobre os eletrodos na concentração de 0,1 $mg.mL^{-1}$, ou seja, 2 µg de anticorpo por eletrodo, por 1h30min em temperatura ambiente e sem agitação, seguido por incubação por 20 h a 4°C.

3ª Etapa - bloqueio com etanolamina e uso do PBST: Após a incubação com o anticorpo, foram realizadas 3 lavagens com água e 3 com PBS 1x e novas leituras em CV. Então, testou-se a necessidade de bloqueio de sítios sobressalentes ativados por EDC/sulfa-NHS com 1 M etanolamina, em água gelada seguido ou não por incubação com PBST (PBS 1x , 0,01% tween) para a remoção de ligações inespecíficas com tween 20 (0,1%) em PBS (PBST).

Por fim, os eletrodos foram armazenados por 20 h a 4ºC em PBS 1x, enxaguados com esta solução e lidos novamente em T1 e T2.

4ª etapa - ligação à microcistina: após a realização das leituras nas etapas anteriores, os eletrodos foram incubados com uma gota de 30 µL de 250 µg L^{-1} de microcistina (extrato algal filtrado em filtro de 0,45 µm) diluído em PBS 1x por 30 min em temperatura ambiente. Ao final, novas leituras foram realizadas em T1 e T2.

Todas as leituras foram realizadas em sonda ferri/ferro em voltametria cíclica (CV) nos parâmetros descritos em 2.6.1.3 deste capítulo.

CAPÍTULO I

Microcystin-LR revealed endocrine disruption effects in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) orally exposed to realistic doses of cyanobacteria extract and purified standard

Azevedo-Linhares, M.[1,2*], Medeiros, L.T.[2], Paixão, R.E.[1], Paulin, A.F.[1], Folle, N.M.T.[2], J.E. Garcia[3], F. Filipak Neto[2], C.A. Oliveira Ribeiro[2*]

[1] Centro de Tecnologia em Saúde e Meio Ambiente, Instituto de Tecnologia do Paraná, CEP 81350-010, Curitiba, PR, Brazil.

[2] Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.

[3] Estação de Piscicultura Panamá, CEP 88490-000, Paulo Lopes, SC, Brazil.

Submmited to Chemmosphere

ABSTRACT

The recent increase of cyanobacterial blooms is a consequence of human activities leading to the massive eutrophication of aquatic environments. Microcystin-LR is a very toxic cyanotoxin to vertebrate including fish, even under low concentrations. Endocrine disruptor chemicals are suspected to be associated with altered reproductive function in males and females and establish the risk of exposure to aquatic organism is a challenge for toxicologists. The pyriproxyfen is a wide spectrum insecticide that mimics the juvenile hormone of insects and recently has been used to control the insect vectors of diseases *Aedes aegypti* during epidemic outbreaks, such as Dengue, Chikungunya and Zika virus in Brazil. But little is known about the effect on non-target animals. The present study investigated the subchronic and oral effects of microcystin and pyriproxyfen on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus,* under realistic doses/concentrations. The results showed an estrogenic disruption in male fish and a very subtle increase of muscular acetylcholinesterase activity after exposure to microcystin-LR. However, no morphological damages in liver, biochemical disturbs, as oxidative stress or physiological alterations were found. For pyriproxyfen, none of all evaluated parameters showed differences. In conclusion, the results point to endocrine disruption effects of microcystin-LR in *O. niloticus* whereas pyriproxyfen mean do not present health effects under the tested experimental design. However, more information about the safe exposure or levels of these substances for the aquatic ecosystem are needed and further studies are recommended, mainly to understand the endocrine disruption effects of the cyanotoxin to fish.

Keywords: Microcystin-LR, endocrine disruption, pyriproxyfen, *Oreochomis niloticus*, realistic exposure, biomarkers.

1 INTRODUCTION

The natural eutrophication has often increased by human activities leading to the enrichment of water bodies that favor the intensifications of cyanobacteria blooms. Additionally, the global temperature warming and climate changes may contribute to the enhance of cyanotoxins levels in water including microcystins (Wiegand & Pflugmacher, 2005; Puddick et al, 2014, EPA, 2015; Saraf et al., 2018).

The global dispersion of many chemicals as POPs, pharmaceuticals, plasticizer Bisphenol A and synthetic hormones such as 17a-ethinylestradiol are known and contribute to the risk of endocrine disruption in terrestrial and aquatic organisms (von Hippel et al., 2018; Niemuth and Klaper, 2018). In these terms the environment implications for the health of people and wildlife are still a challenge for scientists. More recently studies described the effect of microcystine as reproductive impairment to fish (Pavagadhia and Balasubramarinana, 2015; Su et al, 2016; Cheng et al., 2017), but the role of this cyanotoxin as an endocrine disruptor is not completely understood mainly under realistic conditions. Vitellogenin is a lipophosphoglycoprotein expressed in response to estrogen signaling via binding to nucleus estrogen receptor present in hepathocytes; and according to Yamamoto et al. (2017) and von Hippel et al. (2018) its concentration in male fish indicates exposure to estrogenic chemicals.

Microcystin-LR (MC-LR) is the most toxic variant among one hundred microcystins isoforms globally distributed (WHO, 2003; Hilborn et al., 2005; Puddick et al., 2014). This natural toxin are a potent inhibitors of serine/threonine phosphatases 1 (PP1) and 2A (PP2A) leading to protein hyperphosphorylation (Carmichael, 1992, Trinchet et al, 2011). As a consequence some cellular disturbs were described as: cytoskeleton disorganization, imbalance the redox state of cell, cell death or even severe hepatic damage including gonads, kidneys and other organs (Wiegand & Pflugmacher, 2005; Malbrouck & Kestemont, 2006; Trinchet et al., 2011; Pavagandhi & Balasubramanian, 2013). Microcystin-LR was described as toxic to aquatic vertebrates even at low concentrations during blooms events where food, gills and skin are the most important routes of exposure (Malbrouck & Kestemont, 2006). According to Saraf et al. (2018) the damages are more severe in aquatic than in terrestrial organisms. However, the literature reported few studies about the risk of exposures orally and subchronic exposed, especially under low and realistic doses (Carbis et al., 1996; Mezhoud et al., 2008; Trinchet et al., 2011).

Pyriproxyfen (Py), 2- [1-methyl-2- (4-phenoxyphenyenoxyphenyl) ethoxy] pyridine) is a broad spectrum insecticide that mimics insect juvenile hormone (JH), compromising the development of adult characteristics, reproduction and survival of the pupa (Sihuincha et al., 2005, Yapabandara, 2005, Invest & Lucas, 2008). This product is largely utilized in agriculture due to its effectiveness in insect control and low impact to non-target organisms (Invest & Lucas, 2008). In 2008, the World Health Organization (WHO, 2008) recommended the use of this product to control the vector mosquitoes. In Brazil, this recommendation was implemented in 2014 to control *Aedes aegypti* due to the development of outbreak diseases as Dengue, Chikungunya and Zyka virus (Adapar, 2016; PPDB, 2016).

However, pyriproxyfen can affect beneficial insect species such as *Apis melifera* (Chen et al., 2016), and other arthropods such as crustaceans - crabs, shrimps and *Daphnia spp*. (McKenney, 2005, WHOPES, 2001). In case of fish, the studies included the establishment of LC50 for some species (Sullivan, 2000), the behavioral studies in *Xiphophorus maculatus* (Caixeta et al., 2016) and some investigations of malformations and neutoxicity in *Danio rerio* embryos (Truong et al., 2016, Dzieciolowska et al., 2017).

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is an omnivorous fish widely distributed in aquaculture worldwide due to its adaptability and management facility (Fishbase.org, 2018). For these reasons has been also used as model species to investigate the risk of exposure to a diversity of chemicals in ecotoxicological studies (Osman et al., 2012; Ates et al., 2016). In the current study, the toxic effects of realistic doses/concentration of microcystin-LR and pyriproxyfen were investigated in Nile tilapia under oral and subchronic exposures.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 MICROCYSTIN

Two forms of microcystin-LR were used: purified commercial standard (Abraxis™), and microcystin-LR from algal extract of *Microcystis aeruginosa.* For the extracted form, the BB05 – Barra Bonita strain was provided from Federal University of São Carlos, Brazil (WDCM: CCMA-UFSCar 835), cultivated in ASM-1 medium modified (Jacinavicius et al., 2014) in Technology Institute of Parana State - TECPAR, Brazil. Cultures at 10^6 cells mL^{-1} density were centrifuged (3,000 *g* at 4 ºC for 15 min), and lyophilized for 3 days. Lyophilized cells were suspended in pure water (0.1 g mL^{-1}), sonicated for 3 min, and centrifuged (3,000 *g*, 4 ºC for 5 min, 3 times). The supernatant were stored at −20 °C until use (Silva-Stenico et al., 2009). The supernatant was filtered in 0.45 μm PVDF filter and analyzed by LC-ESI-

MS/MS (Accela UHPLC, Thermo Fisher Scientific) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (TSQ Vantage, Thermo Fisher Scientific) with positive mode electrospray ionization - ESI (Dahlmann et al. 2003, with modifications) and using 5 mg L^{-1} standard microcystin RR, YR and LR (Fluka™). After determination, the algal extract and purified standard were diluted in ultrapure water to prepare theoretical 4000 µg L^{-1}, 400 and 40 µg L^{-1}. New determinations of concentration were performed in 4000 µg L^{-1} solutions and real values were, respectively, 3600 µg L^{-1} and 3660 µg L^{-1} for extract and purified standard. Then, fish were exposed by force-feeding to approximate concentrations of 0.04 µg body weight $(bw)^{-1}$ day^{-1} – TDI (tolerable daily intake by WHO, 1999), 0.4 µg bw^{-1} day^{-1} and 4 µg bw^{-1} day^{-1}.

2.2 PYRIPROXYFEN

Sumilarv™ product from Sumimoto Chemical (Chemical Abstract Service [CAS] Registry Number 95737-68-1) composed of 0.5% pyriproxyfen in slow release volcanic sand was obtained through the Health Secretary of Parana State, Brazil. Solutions of pyriproxyfen were prepared in milli-Q water and shaken for 15 min to promote the release of the pyriproxyfen from the granulate sand. The solutions were prepared for the final concentration in the tank of 10 µg L^{-1} of active principle - recommended concentration for drinking water for the control of mosquito vectors (WHO, 2008) and 100 µg L^{-1} – concentration which could be found in residential water tanks with low volume (Brasil, 2014). All pyriproxyfen prepared solutions were quantified by liquid chromatography/tandem mass spectrometer (Applied Biosystems – API 4000) adapted from EPA Method 538 (EPA, 2009), using 100 mg L^{-1} standard pyriproxyfen (Accustandard™). The mean concentration of pyriproxyfen detected in water from the experimental tanks immediately after the contamination with 10 µg L^{-1} and 100 µg L^{-1} was respectively 0.3 µg L^{-1} and 2 µg L^{-1}. The chemical analysis showed that the product is retained in the filtration blanket (45% and 90% from the highest and lowest concentration respectively). Also part of the product was found in the quartzite ceramics (8%) in tanks with the highest contamination. In addition, greater accumulation of organic matter was observed in contaminated tanks during all the experiment. To verify the appropriateness of the extraction time of the pyriproxyfen from the granulate sand, a solution of pyriproxyfen was analyzed shortly after the preparation. In this case, there was a 25% reduction of the active principle, indicating that the extraction time should be increased.

Temperature, dissolved oxygen, pH, ammonia and nitrite (commercial Labcon kits®) were controlled during the experiments for the optimal conditions of Nile tilapia cultivation.

2.3 MAINTENANCE AND EXPOSURE OF FISH

The experimental procedures were submitted and approved by the Committee for the Ethics for Animal Experiments from the Biological Sciences Department of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO, protocol number 1132). The procedures are in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the Brazilian National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), as well as with the international guidelines for animal experimentation.

Experimental design

Microcystin exposure: Early juvenile *O. niloticus* (~ 20 g and 10 cm) were obtained from State Rural Development Secretary - DRURAL (Santa Catarina State, Brazil, www.joinville.sc.gov.br/institucional/sdrural/) and transported to the Cellular Toxicology Laboratory (Federal University of Parana, Brazil). For the experiment fish were acclimated for 1 week in 14 tanks of 100 L with 8 individuals and randomLy distributed per tank in replicate. Eight groups were established: Control Group (E = algal extract and P = commercial standard), Lowest dose 0.04 μg bw^{-1} day^{-1} (groups E1and P1), Intermediate dose 0.4 μg bw^{-1} day^{-1} (groups E2 and P2) and Highest dose 4 μg bw^{-1} day^{-1} (groups E3 and P3) respectively. Each tank received a filter system composed of submerged water circulation pump (flow: 1,000 liters per hour) and a filter containing quartzite for biological filtration, activated charcoal, zeolite for the removal of compounds like nitrite and ammonia, and Perlon™ type blanket for mechanical filtration of residues as feces and food. Temperature was controlled by heater and feeding was performed daily. The tanks were cleaned in 2 days intervals siphoning the bottom and replacing 25% of water.

Prior to exposure the fish were anesthetized with MS222 ™ (120 mg L^{-1}), weighed and measured. The force-feeding procedure was performed using a metallic gavages' cannula. Six doses were performed, with 10-day intervals between doses, totaling sixty days of exposure.

Pyriproxyfen exposure: Male juvenile *O. Niloticus* (~ 95 g and 18 cm) were obtained at e Panama fish-farming (Santa Catarina State, Brazil) and transported to the laboratory (Parana State, Brazil). Prior the experiments fish were acclimated for one month in 3 tanks of 500 L containing 10-13 individuals per tank and one control tank. Two tested concentrations were

investigated by waterborne exposure (0.3 μg L^{-1} and 2 μg L^{-1} of Py). Each tank received filter system and submerged pump, as described before with controlled temperature. The tanks were maintained in a semi static system replacing 30% of water and pyriproxyfen weekly.

2.4 BIOLOGICAL SAMPLING

After the period of exposure, the animals were anesthetized with MS222 ™ (120 mg L^{-1}), weighed and measured and immediately the blood was sampled from the caudal vein using the heparinized syringes. Then the fish were killed by ruptured of medulla, the sex was confirmed by visual analysis of the gonads and the liver, gonads, muscle and brain were sampled and preserved to posterior analyses.

2.5 PROCESSING OF BIOLOGICAL MATERIAL

Blood analyses: hemoglobin concentration was quantified by the Drabkin method (Oliveira Ribeiro et al. 2012) and plasma was obtained after centrifugation (3,000 *g* for 30 min at 4°C) of blood with 1 mM PMSF (phenyl-methyl-sulfonylfluoride). The plasma was store at -80 °C for vitellogenin immunodetection by western blot.

Histological analysis: liver samples were fixed (70% ethanol, 4% formaldehyde and 5% acetic acid) for 16 h and processed according to the protocol described by Oliveira Ribeiro et al. 2012 and posterior analysis under light microscopy.

Biochemical analyses: brain, muscle and liver samples were homogenized in buffer (brain and muscle: 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.5; liver: 20 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6, 1 mM PMSF) and centrifuged (9,000 *g,* 4 °C, 20 min). The supernatants were stored at -80 ° C until analysis.

The total protein concentration was quantified according to Bradford (1976) and protein concentration was normalized prior to the enzymatic analyzes. Acetylcholinesterase activity was determined in the brain and muscle (Ellman et al., 1961). Catalase (Aebi, 1984, with modifications), glutathione *S*-transferase (GST, Keen et al., 1976, with modifications), non-protein thiols (NPT, Sedlak and Lindsay, 1968), lipid peroxidation (LPO, Jiang et al., 1991, 1992) and protein carbonylation (PCO, Levine et al., 1994) were determined in the liver.

Immunodetection of vitellogenin: After quantification of plasma proteins (Bradford, 1976), 50 μg were denaturated at 100 °C for 5 min in sample buffer with 2% SDS and 0.05% β-

mercaptoethanol. A SDS-PAGE eletrophoretic runs for separation of proteins were processed by using 5% (stacking) and 8% (resolving) polyacrilamide gels. After runs, the PAGE gels were stained with Coomassie blue or transferred to nitrocellulose membrane using Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad™) at 100V for 60 min in transfer buffer. Then, the membranes were blocked with 5% non-fat dry milk at room temperature for 60 min, and washed 3 times with TBT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween® 20). After wash, the membranes were incubated with rabbit polyclonal anti-*Geophagus brasiliensis* vitellogenin antibodies (1:20,000, from our laboratory) at 4°C overnight. Then, the membranes were washed 3 times in TBST (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) and incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies (1:4000, Sigma Aldrich™) at room temperature for 60 min. Then membranes were washed 3 times in TBST and detected with autoradiography film (Kodak™) by using the Pierce chemiluminescent kit (Thermo scientific®).

Immunodetection of microcystin-LR: pools of muscle and liver homogenates were used to investigate the presence of adducts of microcystin and phosphatases by western blot. Positive controls were prepared using tissue homogenates incubated with 240 μg of purified standard microcystin or algal extract kg^{-1} of tissue (weighed before homogenization) for 24 °C at 20 h. This dose of the toxin is the sum of the 6 force-feeding procedures using the highest dose of microcystin to fish, considering 10 days of exposure at each dose.

The total proteins were quantified (Bradford, 1976) and 50 μg of each homogenate was denatured at 100 °C for 10 min in 2% SDS sample buffer with 0.05% β-mercaptoethanol. The SDS-PAGE eletrophoretic runs was prepared using 5% (stacking) and 12% (resolving) polyacrilamide gels. Transfers, subsequent incubations, and revelations were performed as described in the previous for vitellogenin, except for the dilution of antibodies (1:10,000 commercial of mouse monoclonal anti-microcystin antibody (MC10E7, from Enzo Life Sciences). The HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody HRP (Sigma Aldrich™) was used at the dilution of 1: 4,000.

The competitive ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) is also performed for MC-LR detection. The Maxisorb Nunc™ 96 wells plates were coated with microcystin-ovalbumin (previously conjugated) or ovalbumin (negative control) at 0.5 μg/well in carbonate buffer pH 9.6 for 16 h at 4°C. The plates were washed 4 times with PBST (43 mM Na2HPO4, 1.5 mM KH2PO4, 137 mM NaCl e 2.7 mM KCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4) and blocked with defatted milk (1%) in PBST for 1 h at 37 °C. Then, the plates were washed 5

times with PBST and incubated for 1 h at 37ºC with MC10E7 anti-MC-LR antibody (1:10,000) previously incubated in PBST (1h at 37°C) with pooled samples (100 μg of muscle proteins, 5 μg of liver proteins, or 0, 0.005, 0.015, 0.045, 0.135 and 0.405 ng mL^{-1} of MC-LR purified standard for calibration curve. Again, the plates were washed 4 times with PBST and incubated with HRP anti-mouse (Sigma) at 1:4000 in PBST for 1h, washed (2 times) in PBST and twice with PBS to remove Tween. The revelation was made using 5 mg of o-Phenylenediamine (OPD) in 5 mL citrate-phosphate buffer (0.1M), pH 5.0 and 5 μL of H2O2 for 30 min. The reaction was stopped by using 30 ul of 1M H2SO4.

2.6 STATISTICAL ANALYSIS

Shapiro-Wilk normality tests and equality of variances performed by Bartlett´s test were performed. Then, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (parametric analysis) or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for multiple comparisons (nonparametric analysis) were performed. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3 RESULTS

Physicochemical parameters

The water temperature varied between 25-32 °C while the dissolved oxygen was found between 6 and 9 mg L^{-1} and pH variation was between 6.8 - 8.0. Eventually the ammonia reached 5.0 ppm and nitrite 1.0 ppm, when 50% of water was changed in the tanks.

Biological parameters

There was no change in total hemoglobin concentration in individuals orally exposed to microcystin algal extract or purified commercial standard (Table 1). The same was observed to individuals after waterborne exposure to pyriproxyfen (Table 2). The somatic indexes (condition factor, hepatosomatic and gonadosomatic indexes, including histopathological factor of lesion) are important to evaluate the health quality of individuals and some physiological disturbs. All these biomarkers did not show significant difference among the tested groups for microcystin and pyriproxyfen exposure (Table 1 and 2). Among the biochemical parameters (catalase and GST activity and levels of non-protein thiols, lipid peroxidation and protein carbonylation) (Table 1 and 2). no statistical differences were shown for both compounds. Differently from individuals exposed to pyriproxyfen, the

animals orally exposed to purified standard in the higher dose of microcystin (P3) presented an increase in the muscular acetylcholinesterase activity ($F = 4.37$, $p < 0.01$, Table 1).

Immunodetection of vitellogenin: The results of western blot indicated the presence of vitellogenin (~120 kDa) in plasma of male fish exposed only to microcystin-LR (Fig. 1) with incidence >15% (Table 3). Females were used for positive controls.

Immunodetection of MC-LR: microcystin was not detected through western blot in samples of fish exposed to microcystin-LR, except for the positive control of liver (tissue incubated directly with MC-LR). Thus, a competitive ELISA in both tissues was performed. The results indicated that long-term exposures, even at very low doses of 0.04 $\mu g\ kg^{-1}\ day^{-1}$ and with a large interval of time between doses (10 days), were sufficient for bioaccumulation of MC-LR in fish liver. Levels ranged from 1.9 to 2.4 ng mg^{-1} and from 2.5 to 4.2 ng mg^{-1} protein for the animals exposed to extract and purified toxin, respectively, with P3 (purified form) presenting highest values. In the muscle no bioaccumulation was detected, but metabolites such as Mdha are likely to exist.

Table 1. Biological parameters from *O. niloticus* after oral and subchronically exposure to microcystin-LR

		Standard microcystin-LR			Cellular extract microcystin-LR		
	Control	**0.004**	**0.04** ($\mu g\ kg^{-1}\ day^{-1}$)	**4.0**	**0.004**	**0.04** ($\mu g\ kg^{-1}\ day^{-1}$)	**4.0**
Hemoglobin	5.66 ± 0.15	6.61 ± 0.46	6.35 ± 0.21	6.43 ± 0.28	6.54 ± 0.25	6.63 ± 0.21	6.39 ± 0.20
Somatic indexes							
Condition Factor	1.54±0.08	1.60±0.11	1.75±0.04	1.77±0.14	1.64±0.09	1.69±0.03	1,78±0.15
Hepatosomatic	0.71 ± 0.11	0.85 ± 0.06	0.58 ± 0.14	0.99 ± 0.21	0.83 ± 0.04	0.80 ± 0.09	0.85 ± 0.06
Gonadosomatic	0.57 ± 0.22	0.63 ± 0.41	1.20 ± 0.34	0.84 ± 0.17	0.84 ± 0.04	0.12 ± 0.02	1.34 ± 0.57
Liver							
LPO	0.0012 ± 0.0003	0.0010 ± 0.0004	0.0012 ± 0.0003	0.0011 ± 0.0004	0.0010 ± 0.0002	0.0010 ± 0.0003	0.0013 ± 0.0003
Catalase	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.02
GST	0.25 ± 0.04	0.27 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.02
GSH	4.52 ± 0.42	3.57 ± 0.40	5.42 ± 1.05	5.62 ± 0.84	3.90 ± 0.46	3.60 ± 0.31	3.63 ± 0.27
PCO	0.0075 ± 0.0012	0.0045 ±0.0007	0.0046 ±0.0012	0.0069 ±0.0023	0.0053 ±0.0008	0.0034 ±0.0006	0.0044 ±0.0005
Muscle							
AChE	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.01*
Brain							
AChE	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01

* Statistical different from control group ($p < 0.05$). Units: Hemoglobin: g dL^{-1}; Condition Factor, Hepatosomatic and Gonadosomatic: %; LPO and PCO: nmol mg $protein^{-1}$; Catalase, GST and AChE: micromol min^{-1} mg $protein^{-1}$; GSH: micromols mg $protein^{-1}$.The data are presented as mean±standard error of mean. $6<n<16$.

Table 2. Biological values from *O. niloticus* after waterborne and subchronically exposure to Pyriproxyfen

	Control	**Pyriproxyfen**	
		0.3 (µg L^{-1})	**2.0 (µg L^{-1})**
Hemoglobin	8.39 ± 0.26	9.03 ± 0.36	9.36 ± 0.38
Somatic Indexes			
Condition factor	1.82 ± 0.05	1.81 ± 0.05	1.67 ± 0.08
Hepatosomatic	0.43 ± 0.05	0.51 ± 0.07	0.67 ± 0.09*
Gonadosomatic	0.28 ± 0.06	0.19 ± 0.05	0.21 ± 0.05
Liver			
LPO	0.0008 ± 0.0001	0.0007 ± 0.0001	0.0009 ± 0.0001
Catalase	0.40 ± 0.04	0.36 ± 0.02	0.40 ± 0.05
GST	0.41 ± 0.03	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.02
GSH	1.54 ± 0.33	1.83 ± 0.44	2.39 ± 0.32
PCO	0.0072 ± 0.0015	0.0080 ± 0.0018	0.0072± 0.0020
Muscle			
AChE	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Brain			
AChE	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01

* Statistical different from control group ($p < 0.05$). Units: Hemoglobin: g dL^{-1}; Condition Factor, Hepatosomatic and Gonadosomatic: %; LPO and PCO: nmol mg $protein^{-1}$; Catalase, GST and AChE: micromol min^{-1} mg $protein^{-1}$; GSH: micromols mg $protein^{-1}$..The data are presented as mean±standard error of mean. $9<n<14$.

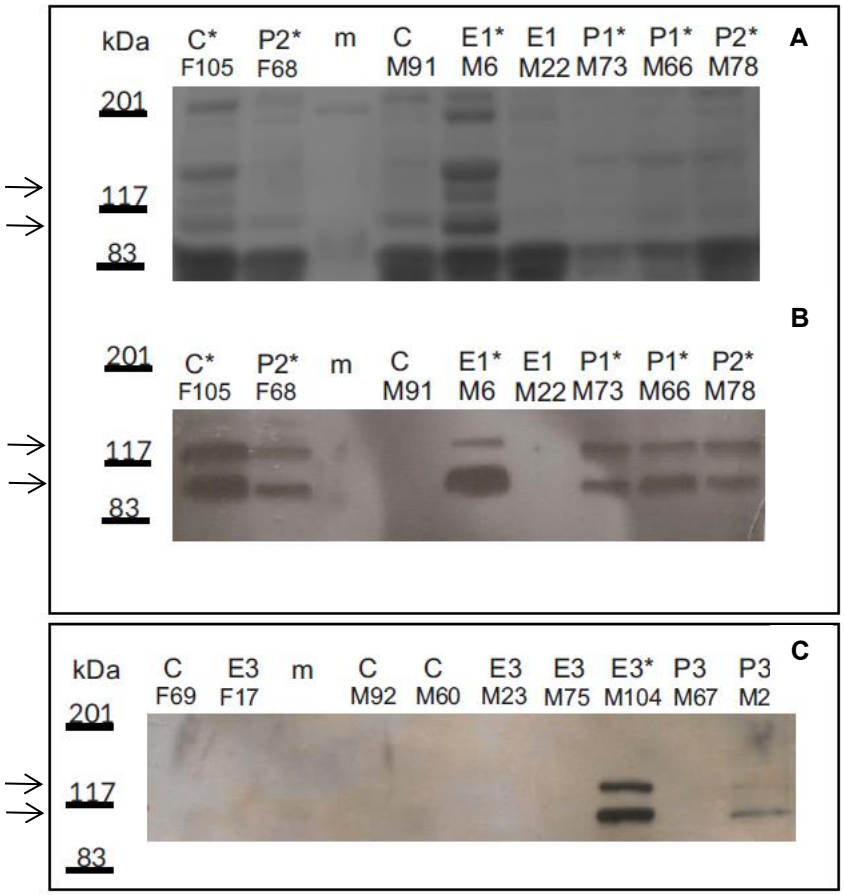


Figure 1. Immunodetection of vitellogenin in plasma of *O. niloticus* after exposure to microcystin-LR by SDS-PAGE (A) and western blot (B and C). Codes: E1= algal extract at 0.04 µg.L^{-1}.day-1MC-LR, E2= 0.4 µg.L^{-1} MC-LR.day-1 and E3 = 4 µg.L^{-1} day^{-1} MC-LR. P1, P2 and P3 represent the sames doses above, but for purified standard microcistin-LR. F represents females, M, males, C, control group, m= marker. The number after F or M represents the animal identification. *= positivity for vitellogenin. Arrows indicate molecular weight region of two bandss of vitellogenin (around 120 kDa). SDS-PAGE was stained with Coomassie blue and the result for presence of vitellogenic was confirmed by western blot.

Table 3. Frequencies of positive male fish of *O. niloticus* for plasma vitellogenin analysis by western blot:

Groups	Positive (%)	n
Control	0.0	10
E1	40	05
E2	29	07
E3	57	07
P1	25	12
P2	20	05
P3	17	06

n = number of analyzed animals. Each western blot was performed at least twice. E means microcystin of algal extract and P means the purified microcystin-LR. Number in groups represents the doses utilized – 1: 0.04 µg kg^{-1}.day^{-1}; 2: 0.4 µg kg^{-1} day^{-1} and 3: 4 µg kg^{-1} day^{-1}.

4 DISCUSSION

The current study shows that microcystin-LR (cellular extract and purified solutions) and pyriproxyfen under realistic exposure did not compromise the general health of *O. Niloticus*, but the endocrine disruption and less evident neurotoxicity found in individuals exposed to MC-LR are reasons for concern. This argument is based in the realistic tested doses for microcystin-LR, suggesting that fish in natural condition can potentially present similar effect.

The supposed non-toxicity as observed to *O. niloticus* under realistic doses or concentrations after subchronic exposure (60 days) for both tested chemicals, revealed that juvenile fish is apparently not affected. The evidences are expressed by somatic indexes and hematological, biochemical and histopathological biomarkers. On the other hand, these results are very important to highlight the findings attributing the effect of endocrine disruption to microcystin, even if physiological parameters are not affected. These findings are a new and ecologically important data as the physiological condition of *O. niloticus* exposed to cellular extract and purified microcystin-LR were similar, demonstrating that the endocrine disruption as observed is independent of other health disturbs.

The route of exposures as performed, trophic and waterborne for MC-LR and pyriproxyfen respectively, simulated a realistic exposure. Tilapia can be exposed by phytoplankton ingestion (Fishbase.org, 2018) and pyriproxyfen may potentially reach to the rivers and lakes due to the recent intensive use to control of mosquitoes. The natural exposure to both substances is potentially realistic as in Brazil and other countries, the blooms present in water bodies are largely described (Paulino et al., 2017) while the pyriproxyfen may reach to the rivers (Belenger et al., 2014; Ccanccapa et al., 2016).

The tested low concentrations of pyriproxyfen investigated in the current study revealed the realistic exposure of aquatic animals. Pyriproxyfen present in Sumilarv™ as used for mosquito control is slowly released to water for 2 months providing lower concentrations in water than initially calculated, but enough for mosquito control (Sihuincha et al., 2005). In addition, in rivers where pyriproxyfen has already been detected, the concentrations remain in the range of 24 ng L^{-1} to 0.10 µg L^{-1}, which is lower than those tested in the present study (Belenger et al., 2014; Ccanccapa et al., 2016).

In the current data juveniles *O. niloticus* are not affected by subchronic exposure to low concentration of pyriproxyfen under experimental conditions. But differently, this compound affects the development of freshwater fish *Rhamdia quelen* during the early stages

(Azevedo-Linhares et al., submmited data). For this reason, the present study is not conclusive and other life cycle stages must be investigated to evaluate the risk of exposure to pyriproxyfen.

Very low and realistic doses/concentrations of microcystin-LR and pyriproxyfen did not impair physiological events in O. niloticus

Somatic indexes, liver histopathology and antioxidant defenses are parameters well established in literature to evaluate the effects of chemicals in fish like *O. Niloticus* (Van der Oost et al., 2003; Woźny et al., 2016; Oliveira Ribeiro et al., 2012; Santos et al., 2016). The absence of effects in the gonadosomatic index revealed that the gonads mass is not affected, although disturbs in the expression of vitellogenin in groups exposed to microcystin-LR were observed. According to Woźny et al. (2016), changes in the hepatosomatic index (HSI) revealed that microcystin may alter the energy reserves or conditions of the organ, but these effects were observed only after exposure to non-realistic doses (100 μg kg^{-1}). Moreover, in the current study no histological alterations were found in the liver, hemoglobin levels and biochemical parameters, confirming no harsh effects of both compounds to the health of the exposed individuals.

Few studies reporting effects of pyriproxyfen to non-arthropod species are available. The results on fish are related with LC50 determination under non-realistic doses or concentrations (Sullivan, 2000). More recently, Caixeta et al. (2016) showed only behavioral disturbs in fish exposed to low concentrations, and Azevedo-Linhares et al. (submmitied data) described mortality and deformities in embryos of *Rhamdia quelen* exposed to lower concentration of pyriproxyfen. These results revealed that other parameters in different stages of life cycle should be considered in further studies.

Histological damages were found in liver of *Cyprinus carpio* orally exposed to purified and extracted MC-LR (2.5 μg kg^{-1}) or algae cells intact daily for 15 days (Carbis et al., 1996). But according to the same authors no histological damages were observed after the same single dose in liver and other organs. The recovery following administration of microcystins was described by Woźny et al. (2016) starting after 7 days of intraperitoneal injection of MC-LR (100 μg kg^{-1}) in *Oryzias latipes* and this continued even after new contaminations. Interestingly after exposure to 10 μg kg^{-1} the authors reported some histological damages after 7 days, probably because the recovery period had not even started due to the smaller administered dose. The autors also reported absence of biochemical findings, showing that the morphological effects in tissues are dose and time dependent.

Microcystin alter AChE activity in the muscle of O. Niloticus

The use of acethylcolinesterase activity as a neurotoxic biomarker in fish is a consolidated procedure described in many studies (Oliveira Ribeiro and Silva de Assis, 2005). Considering the very low doses of purified microcystin-LR tested in the present study, the alteration observed here shows that muscle and more specifically the AChE activity is important target to the toxin. The increase of activity registered in muscle of individuals exposed to the higher dose of purified MC-LR (4 μg bw^{-1} day^{-1}) suggesting at least that neurological disturbs should be investigated under realistic doses. These findings were also described by Kist et al. (2012) in brain of *Danio rerio* after acute waterborne exposure (24 h) to a higher concentration (100 μg L^{-1}). In the current study the experimental design is realistic to natural conditions of exposure and if considered an algal bloom occurrence the results of Kist et al. (2012) are also realistic. In these terms the results may suggest a potential neurotoxicity of microcystin to fish waterborne or orally exposed.

Microcystin-LR revealed endocrine disruption effects in O. Niloticus orally exposed to realistic doses of cellular extract and purified toxin

The expression of vitellogenin (vtg) in males when exposed to endocrine disruptors is a consolidated method to evaluate the hormonal deregulation in fish (Santos et al., 2016). Higher amounts of vtg were detected in the plasma of male fish exposed to the cellular extract of MC-LR if compared with individuals exposed to the commercial purified toxin. This finding may indicates that other molecules present in the cellular extract can potentialize an endocrine disruption effect, or even that the effect is dependent on the natural chemical structure of MC-LR. Palikova et al. (2007) also found more pronounced effects of cellular extracted than purified microcystins, over embryonary development of *Cyprinus carpio*. These findings of endocrine disruption effect are corroborated by Su et al. (2016) that observed an up-regulation of vtg in males of *D. rerio* after exposure to purified MC-LR (30 μg L^{-1}) for 90 days and by Qiao et al. (2013) that showed reduction of vtg expression and *vtg1* in *D. rerio* exposed to lower doses and shorter exposure time (5 and 20 μg L^{-1} for 30 days). These findings showing that a higher dose of purified toxin is necessary if compared the effects with the cellular extract containing the toxin. The same authors reported that other genes as *gnrh2* and *gnrh*3 involved in the estrogen receptor (ER) in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis were also up-regulated after the toxin exposure and including the brain gonadotropin-releasing hormone, increasing the evidence of endocrine disruption of MC-LR to fish. Other effects related with the endocrine systems and microcystin exposure in

fish were recently described, such as reduction of yolk storage in the ovary and disruption of spermatogenesis in the testis of fish *Orizyas latipes* after 30 days of waterborne exposure to low concentration (5 μg L^{-1}) of microcystin-LR (Trinchet et al. (2011), while Oziol and Bouaïcha (2010) showed the effects on the ER in cultured mammalian cells. In the present study, the occurrence of effects on vtg expression is an important highlight as it occurred at realistic and natural condition of exposure to fish, low doses and cellular extract containing the toxin.

The current results and other as described above allow concluding that the endocrine disruption effect revealed in the current study may be strongly influenced by concentration, route and time of exposure, stage of development or even by the chemical conditions of microcystin-LR (purified or cellular extract).

Microcystin-LR was detected in liver of O. Niloticus

The results of competitive ELISA indicated that microcystin-LR can be bioaccumulated in fish liver even at low concentrations when the exposure is made for a long time. The presence of MC-LR in the liver indicates that tilapia can tolerate the presence of this contaminant without the physiological and histological impairment already mentioned. It is possible that the *O. niloticus* fits biochemically and physiologically at low concentrations with long intervals (10 days between contaminations) and long exposure time have contributed to the achievement of homeostasis. On the other hand, the molecular compromise observed in the expression of vitellogenin is a much more complex and therefore the response is slow to be suppressed: this response involves the mechanisms of DNA regulation for activation of the *vtg* genes, transcription, translation and post-modification of proteins.

The lack of detection of microcystin in the muscle may indicate that the methods (western blot and ELISA) were not sensitives enough to detect it or that the concentrations used were not sufficient to reach this tissue directly. Considering that through the ELISA analysis, even using a large concentration of muscle proteins (100 μg/well), detection did not occur, it is likely that the second hypothesis is true. Then, this would be a relevant data, considering that other animals, including humans, could become contaminated by muscle ingestion. It is probable that only in exposures to continuous and high concentrations of microcystin-LR is it able to reach the muscle, in the non-metabolized form, as observed by Magalhães et al. (2001) in muscle of *Tilapia rendalli* in Jacarepaguá lagoon (Brazil) during algal blooms. On the other hand, microcystin metabolites, such as Mdha, which binds to phosphatases could be present in the muscle causing the observed changes in AchE of motor

neurons. Thus, it is suggested that new studies investigating the presence of microcystin in the muscle also investigate the presence of Mdha.

5 CONCLUSION

Two aspects are relevant in the current study: (i) the use of realistic condition of exposure, and (ii) the use of microsystin-LR from cellular extract and purified standard. These experimental conditions allied to detection of microcystin-LR in liver allowed concluding that microcystin-LR is an endocrine disruptor to *O. niloticus*, which may be affecting the expression of viltellogenin directly or indirectly. Additionally, the results showing non-effects to physiological parameters are important to a more robust data as demonstrated the good health conditions of the animals. Finally, the cellular extract of microcystin affects the expression of vitellogenin more than the purified microcystin. For pyriproxyfen the results showed the tested concentrations are not toxic to *O. niloticus*, but it is suggested to investigate the effects also to others species.

Acknowledgments

This study was supported by the National Council of Science and Technology - CNPq and State Agency of Science and Technology of Parana State - Araucaria Foundation. The authors thank Magda Clara V Costa Ribeiro, Robson R Linhares, Satar LS Gemusse, Patrícia Manuitt, Tugstênio Lima and Flávia Y. Yamamoto for technical support and the Health Secretary of Parana State (Brazil) for supplying the Sumilarv product for this study.

References

4th WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES), 2001. Review of IR3535, KBR3023, (RS)-methoprene 20%EC, pyriproxyfen 0.5%GR and lambda-cyhalothrin 2.5%CS. 4—5. December 2000, Ref:WHO/CDS/WHOPES/2001.2, 2001. Geneva. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66683/1/WHO_CDS_WHOPES_2001.2.pdf?ua=1>.

Aebi, H. Catalase in vitro, 1984. Method Enzymol.105, 121-126.

Ates, M., Dermi, V.I.Mehtmet, Arslan, Z., Kaya, H., Yilmaz, S., Camas, M. 2016. Chronic exposure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to iron oxide nanoparticles: Effects of particle morphology on accumulation, elimination, hematology and immune responses. Aquat. Toxicol. 177, 22-32.

Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR). Bula do produto Cordial 100. Available at: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/CORDIAL100.pdf>. (Acessed in January 2018).

Belenger, V., Martinez-Capel, F., Masiá, A., Picó, Y., 2014. Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (Eastern Spain). J. Hazard. Mater. 265, 271– 279.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72, 248-254.

Brasil, Ministério da Saúde, 2014. Orientações técnicas para utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de Aedes aegypti. Available at: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/30/Instrucoes-para-uso-de-pyriproxyfen-maio-2014.pdf>. (Acessed in December 2017).

Caixeta, E.S., Silva, C.F., Santos, V.S., Campos Júnior, O. E., Pereira, B.B., 2016. Ecotoxicological assessment of pyriproxyfen under environmentally realistic exposure conditions of integrated vector management for Aedes aegypti control in Brazil. J. Toxicol. Environ. Health 79A, 799-803.

Carbis, R.C., Rawlin, G.T., Mitchel, G.F., Anderson, J.W., McCauley, I. 1996. The histopathology of carp, Cyprinus carpio L, exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. J. Fish. Dis. 19, 199-207.

Carmichael, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins, 1992. J. Appl. Bacteriol. 72, 445-459.

Ccanccap, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., 2016. Pesticides in the Ebro RIver basin: Occurrence and risk assessment. Environ. Poll. 211, 414-424.

Chen, Y-W., Wu, P-S., Yang, E-C., Nai, Y-S., Huang, Z.Y., 2016. The impact of pyriproxyfen on the development of honey bee (*Apis mellifera* L.) colony in field. J. Asia. Pac. Entomol. 19, 589–594.

Dahlmann, J., Budakowski ,W. R., Luckas, B., 2003. Liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins, J. Chromatogr., A, 994, 45.

Dzieciolowska, S., Larroque, A-L, Kranjec, E-A., Drapeau, P., Samarut, E., 2017. The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in

zebrafish embryos. *Scientific Reports*, 7, art. no. 40067. Available at <https://www.nature.com/articles/srep40067> (Acessed in January 2018).

Ellman, G.L., Courtney D., Andres Jr., V., Feathersthone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-96.

EPA, 2009. "Method 538: Determination of Selected Organic Contaminants in Drinking Water by Direct Aqueous Injection-Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (DAI-LC/MS/MS)," Revision 1.0, U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, EPA/600/R-09/149, November 2009.

EPA, 2015. Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, Health and Ecological Criteria Division Washington, DC, June 2015.

Fishbase.org, 2018. Available at <http://www.fishbase.org> (Acessed in January 2018).

Fujimura, K., Okada, N. 2007. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. *Develop. Growth Differ.* 49, 301–324. doi: 10.1111/j.1440-169x.2007.00926.x

Hilborn, E.D., Carmichael, W.W., Yuan, M., Azevedo, S.M.F.O, 2005. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. Toxicon, 46, 218–221.

Invest, J.F. and Lucas, J.R, 2008. Pyriproxyfen as a mosquito larvicide. In: Robinson W.H., Bajomi D. (Eds). Proc. 6th Int. Conf. on Urban Pests, Budapest, pp. 239-245.

Jacinavicius, F.R., Gama-Júnior, W.A., Paiva Azevedo, M.T., Sant'anna, C.L. Manual para o Cultivo de Cianobactérias. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Instituto de Botânic a- Núcleo de Pesquisa em Ficologia. Available at <http://botanica.sp.gov.br/institutodebotanica/files/2013/09/virtuais_4cianobact%C3%A9rias.pdf> (Acesso in January 2018).

Jiang, Z. Y., Woollard, A. C., Wolff, S. P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. Lipids. 26, 853–856.

Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., Wolff, S. P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. Anal. Biochem. 202, 384–389.

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B, 1976. Mechanism for several activities of the gluthatione S-transferases. J.Biol. Chem. 251, 6183–6188.

Kist, L.W., Rosemberg, D.B., Pereira, T.C.B., Azevedo, M.B., Richetti, S.K., Leão, J.C., Yunes, J.S., Bonan, C.D.B., Bogo, M.R.B, 2012. Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional *ache* activation in zebrafish (*Danio rerio*) brain. Comp. Biochem. Phys. 155 C, 247–252.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 233, 346– 357.

Malbrouck, C., Kestemont, P., 2006. Effects of microcystins on fish. Environ. Toxicol. Chem. 25, 72–86.

McKenney, C.L., 2005.The influence of insect juvenile hormone agonists on metamorphosis and reproduction in estuarine crustaceans. Integr. Comp. Biol. 45, 97-105.
Medri, V., Medri, W., Caetano Filho, M., 2009. Growth of Nile Tilapia Oreochromis niloticus Fed Diets with Different Levels of Proteins of Yeast. Braz. Arch. Biol. Techn. 52, 721-728.

Niemuth, N.J., Klaper, R.D., 2018. Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes. Aquat. Toxicol, 95, 33–40.

Oliveira Ribeiro, C.A.O., dos Reis Filho, H.S.; Grötzner, S.R**. Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia.** Santos: Livraria Santos Editora Ltda, Curitiba, BR, 2012. pp. 442.

Osman, A.G.M., 2012. Biomarkers in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) to Assess the Impacts of River Nile Pollution: Bioaccumulation, Biochemical and Tissues Biomarkers J. Environ. Prot. 2012, 3, 966-977.

Palikova, M., Krejc, R., Hilscherov, K., Babica, P., Navratil, D., Kopp, S., Ludek, B., 2007. Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquatic Toxicol 81, 312–318.

Pavagadhi, S., Balasubramanian, R., 2013. Toxicological evaluation of microcystins in aquatic fish species: current knowledge and future directions. Aquat. Toxicol. 142- 143, 1–16.

Properties Pesticides Database (PPBD) Available at <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/574.htm#3> (Acessed in January 2018).

Puddick, J., Prinsep, M.R., Wood, S.A., Kaufononga, S.A., Cary, S.C., Hamilton, D,P., 2014. High levels of structural diversity observed in microcystins from Microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. Mar Drugs. 13, 5372-95.

Qin Qiao, Q., Liu, W., Wu,K., Song,T., Hu,J., Huang, X., Wen,J., Chen, L., Zhang,X. 2013.Female zebrafish (*Danio rerio*) are more vulnerable than males to microcystin-LR exposure, without exhibiting estrogenic effects. Aquat. Toxicol. 142– 143, 272– 28.

Saraf, S.R., Frenkel, A., Harke, M.J., Jankowiak, J.G., Gobler, C.J., McElroy, A.E., 2018. Effects of Microcystis on development of early life stage Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Comparative toxicity of natural blooms, cultured *Microcystis* and microcystin-LR. Aquatic Toxicology. 194, 18–26.

Sedlak J, Lindsay R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal. Biochem. 25,192–205.

Sihuincha, M., Zamora-Perea, E., Orellana-Rios, W., Stancil, J.D.,, López-Sifuentes, V., Vidal-Oré, C., Devine, G.J., 2005. Potential use of pyriproxyfen for control of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Perú. J. Med. Entomol. 42,620-30.

Silva-Stenico, M.E.**,** Cantúsio Neto,Alves, I.R., Moraes, L.A.B., Shishido, T.K., Fiore, M.F., 2009. Hepatotoxin Microcystin-LR Extraction Optimization. J. Braz. Chem. Soc., 20, 535-542.

Su, Y., Li, L., Hou, J., Wu, N., Lin, W., Li, G, 2016. Life-cycle exposure to microcystin-LR interferes with the reproductive endocrine system of male zebrafish. Aquat. Toxicol. 175, 205–212.

Trinchet, I., Djediat, C., Huet, H., Dao, S.P.,Edery, M. 2011. Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. Reprod. Toxicol. 32, 329– 340.

Truong, L., Gonnerman, G., Simonich, M.T., Tanguay, R.L., 2016. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish, Environ Pollut., 218, 1089–1093.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57–149.

von Hippel, F.A., Miller, P.K., Carpenter, D.O., Dillon, D., Smayda, L., Katsiadaki, I., Titus, T.A., Batzel, P., Postlethwait, J.H., Buck, C.L., 2018. Endocrine disruption and differential gene expression in sentinel fish on St. Lawrence Island, Alaska: Health implications for indigenous residents. Environ. Pollut., 234, 279-287.

Wiegand, C.; Pflugmacher, S., 2005 Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites - a short review. Toxicol Appl Pharm, 203, 201– 218.

World Health Organization, 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus, I.; Bartram, J (Eds). eds E & FN Spon on behalf of WHO, London.

World Health Organization, 2003. Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Available at <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cyanobactoxins.pdf> (Acessed in December 2017)

World Health Organization, 2008. Pyriproxyfen in drinking-water: Use for vector control in drinking-water sources and containers. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Available at <http://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/pyriproxyfen-background.pdf> (Acessed in December 2017).

Woźny, M. Lewczuk, B., Ziółkowska, N., Gomułka, P., Dobosz, S. Łakomiak, A., Florczyk, M., Brzuzan, P., 2016. Intraperitoneal exposure of whitefish to microcystin-LR induces rapid liver injury followed by regeneration and resilience to subsequent exposures. Toxic. APPL. Pharm. 313, 68–87.

Yamamoto, F.Y., Garcia, J.R.E., Kupsco, A., Oliveira Ribeiro, C.A., 2017. Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu River - Southern Brazil. Chemosphere, 186, 88-99.

Yapabandara, AM., Curtis, CF,2004. Control of vectors and incidence of malaria in an irrigated settlement scheme in Sri Lanka by using the insect growth regulator pyriproxyfen. J Am Mosq Control Assoc. 20,395-400.

CAPÍTULO II

Microcystin and pyriproxyfen are toxic to early stages of development in *Rhamdia quelen*: An experimental and modelling study

M. Azevedo-Linhares[1*], A.T.C. Souza[2], C.A. Lenz[1], N. Ferreira Leite[1], I.A. Brito[3], N.M.T. Folle[3], J.E. Garcia[4], F. Filipak Neto[3], C.A. Oliveira Ribeiro[3*]

[1] Centro de Tecnologia em Saúde e Meio Ambiente, Instituto de Tecnologia do Paraná, CEP 81350-010, Curitiba, PR, Brazil.
[2] Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.
[3] Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.
[4] Estação de Piscicultura Panamá, CEP 88490-000, Paulo Lopes, SC, Brazil.

Submmited to Ecotoxicology and Environmental Safety

ABSTRACT

The eutrophication of freshwater has favoring the occurrence of cyanobacteria mainly in developing countries around the world. Microcystin-LR is the most toxic microcystin to vertebrate including fish even under low concentrations at long-term exposure. Pyriproxyfen is a wide spectrum insecticide, analogous to the juvenile hormone of insects, leading to death of pupa also at low concentrations. Recently it was indicated to control the development of mosquitoes such as *Aedes aegypti*, the vector of Dengue, Chikungunya and Zika diseases by WHO (World Health Organization), but few data are available about the effects to non-target species as fish. Fish at early life stages (ELS) are more sensitive to chemical stress due to higher metabolic rate, immature immune system and high superficial area/volume ratio. *Rhamdia quelen* is an omnivorous fish from Central and South Americas and widely consumed by human population. The present study investigated the effects of environmentally realistic concentrations of microcystin-LR algal extract (M1, M2 and M3), pyriproxyfen (P1 and P2) and their association (co-exposure) on early life stage of *R. quelen* through analyses of hatching, survival, larvae deformities and a mathematical model to evaluate the effects on the population size along further generations. The results showed that both test substances are toxic to embryos/larvae of *R. quelen* and that the mixtures presented a more accentuated effect in almost the totality of biomarkers. The modelling findings revealed that the future populations are under risk of extinction if the post-fertilized eggs are exposed. Overall, the current data increase the discussion about the use of new molecules and its risk of exposure to biota in the same time that highlights the studies of mixtures of pollutants.

Keywords: microcystin, pyriproxyfen, early life stages, *Rhamdia quelen*, mixtures, biomarkers

1 INTRODUCTION

The increase of both global temperatures and human activities has led to the eutrophication of many water bodies, favoring the occurrence of cyanobacteria blooms (Puddick et al, 2014; EPA, 2015; Saraf et al., 2018) and the production of cyanotoxins such as microcystins (Wiegand & Pflugmacher, 2005). This is a cyclical heptapeptide with more than 100 congeners (Puddick et al., 2014).

Microcystin-LR is the most toxic microcystin (WHO, 2003, Hilborn et al., 2005). Toxicity is due to inhibition of phosphatases (Carmichael, 1992), leading to severe hepatic damage in vertebrates after acute intoxication (Wiegand & Pflugmacher, 2005, Malbrouck & Kestemont, 2006, Pavagandhi & Balasubramanian, 2013). Microcystin-LR is also toxic to fish even under low concentrations at long-term exposure (Malbrouck and Kestemont, 2006) and uptake may occurs by food chain, gills and skin (Saraf et al., 2018).

Fish at early life stages (ELS) are more sensitive to chemical stress due to higher metabolic rate, immature immune system and skin, high superficial area/volume ratio and limited mobility on water column (Malbrouck & Kestemont, 2006, Saraf et al., 2018). Microcystin-LR effects on ELS of fish include reduction or absence of digestive system (Huynh-Delerme et al., 2005), reduction of the head size and the yolk sac, pericardial edema (Liu et al., 2002), increased body and tail curvature (Wang et al., 2005), late hatching and decreased survival ratio (Malbrouck & Kestemont, 2006, Saraf et al., 2018). However, most of studies reviewed by Malbrouck & Kestemont (2006) used microinjection of purified microcystin into fertilized eggs due to decreased diffusion of microcystin through the chorion barrier of the embryo. Saraf et al. (2018) described a more realistic approach with water exposure of fish at ELS using cyanobacteria from blooms or laboratory.

Pyriproxyfen (2-[1-metil-2-(4-phenoxyfeniphenoxyfeni)etoxi]pyridine) is a wide spectrum insecticide, analogous to the juvenile hormone of insects, and acts on reproduction and development of insects, leading to death of pupa even at low concentrations (Sihuincha et al., 2005, Yapabandara, 2005, Invest & Lucas, 2008). This molecule has been used in agriculture and, recently, in human drinking water (WHO, 2008, Adapar, 2017; PPDB, 2017) to control the development of mosquitoes such as *Aedes aegypti*, the vector of Dengue, Chikungunya and Zika diseases. Due to specificity of pyriproxyfen, low impact on the environment and toxicity to mammals are expected (Invest & Lucas, 2008), but toxicity on *Apis melifera* bees (Chen *et al.* 2016) and non-target species such as crab, shrimp and *Daphnia spp* have been described (McKenney, 2005; WHOPES, 2001).

Few data are available on the toxicity of pyriproxyfen to vertebrates such as fish. Erratic swimming of *Xiphophorus maculatus* (Caixeta et al. 2016) and embryos deformities at extremely high concentration of pyriproxyfen (Truong et al. 2016) have been reported. Foremost, we did not find studies on toxicological interaction of pyriproxyfen and other chemicals such as microcystin in fish.

Rhamdia quelen (Silver catfish) is an omnivorous fish from Central and South America (Fishbase.org, 2017). In Southern Brazil, *R. quelen* is widely consumed by human population so that there is extensive aquaculture activity with well-known artificial reproduction. On this way, some ecotoxicological studies with larvae and adult fish are available (Kreutz et al., 2008, Pimpão et al., 2013, Brito et al., 2017).

The present study investigated the effects of environmentally realistic concentrations of microcystin-LR algal extract, pyriproxyfen and their association (co-exposure) on early life stage of *R. quelen* through analyses of survival and larvae maldeformities. In addition, a mathematical model (Brito et al. 2017) was applied to evaluate the effects of these chemicals on the population size of *R. quelen* along further generations.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 MICROCYSTIN

The microcystin used in the current study was obtained from the algal extract of *Microcystis aeruginosa* – strain: BB05 – Barra Bonita, provided by UFSCar – Federal University of São Carlos, Brazil (WDCM: CCMA-UFSCar 835) and cultivated in ASM-1 modified environment (Jacinavicius et al., 2014) in Technology Institute of Parana State, Brazil. The growth of cultures was interrupted when 10^6 cells mL^{-1} was reached. Then, the cultures were centrifuged (3,000 *g* at 4 ºC for 15 min), and lyophilized for 3 days. Lyophilized cells were suspended in pure water (0.1 g mL^{-1}), sonicated for 3 min, and centrifuged (3,000 *g*, 4 ºC for 5 min). The pellet was re-extracted according to the same procedure 3 times. The supernatants were combined and stored at −20 °C until use (Silva-Stenico et al., 2009). Microcystins in supernatants were analyzed by mass spectrometer after filtration by PVDF 0.45 μm filter, according with Dahlmann et al., (2003) with modifications.

Before experiments, the solution was diluted in reconstituted water (0.0065 g L^{-1} $CaCl_2$, 0.1335 g L^{-1} $MgSO_4$, 0.0004 g L^{-1} KCl, 0.0105 g L^{-1} $NaHCO_3$) previously filtered in 0.45 μm filter, to obtain 200 μg L^{-1} MC (stock solution). From the stock solution the test

concentrations of 1 μg L^{-1} (M1), 10 μg L^{-1} (M2) and 100 μg L^{-1} (M3) were prepared. According to Brazilian law, 1 μg L^{-1} (= 1 ppb, M1) is the maximum allowed MC concentration for drinking-water (Brasil, 2011), whereas 100 μg L^{-1} (M3) was described in algae blooms, but MC can reach 25,000 g L^{-1} in eutrophicated waters (WHO, 1999).

2.2 PYRIPROXYFEN

Sumilarv™ product from Sumimoto Chemical (Chemical Abstract Service [CAS] Registry Number 95737-68-1), composed by 0.5% of pyriproxyfen in volcanic sand of slow releasing, was obtained from Health Secretary of Parana State, Brazil. The stock solutions (20 μg L^{-1} and 200 μg L^{-1}) were prepared with reconstituted water after 15 min of shaking and filtered in 80 g filter paper to remove the volcanic sand. From the stocks, test concentrations (10 μg L^{-1}) were prepared based on that recommended to mosquito control in drinking-water (WHO, 2008), and 100 μg L^{-1} which may be found in residential water tanks with low volume capacity (BRASIL, 2014). From the commercial product, containing pyriproxyfen in volcanic sand, the insecticide is released slowing when in water. On this way, the real concentrations of pyriproxyfen found in test solutions (described above) were 0.17 (P1) and 1.85 μg L^{-1} (P2) respectively.

2.3 TEST SOLUTIONS OF MICROCYSTIN, PYRIPROXYFEN AND THEIR ASSOCIATION

A total of 12 experimental groups were established: control, microcystin (M1, M2, M3), pyriproxyfen (P1, P2) and the association of both (P1M1, P1M2, P1M3, P2M1, P2M2, P2M3). The concentrations of microcystin and pyriproxyfen were further confirmed in these test solutions: *Microcystin*: LC-ESI-MS/MS (Accela UHPLC, Thermo Fisher Scientific) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (TSQ Vantage, Thermo Fisher Scientific) with positive mode electrospray ionization - ESI (Dahlmann et al. 2003, with modifications), using 5 mg L^{-1} standard microcystin RR, YR and LR (Fluka™); and *Pyriproxyfen*: liquid chromatography/tandem mass spectrometer (Applied Biosystems – API 4000) adapted from EPA Method 538 (EPA, 2009), using 100 mg L^{-1} standard pyriproxyfen (Accustandard™).

2.4 PROCEDURES FOR EGGS FERTILIZATION AND EXPOSURE

Parental spawning: one male and one female of adult *Ramdia quelen* were used to obtain the fertilized eggs, according to procedures established from Panama fish-farming (Santa Catarina State, Brazil, www.pisciculturapanama.com.br) and described by Graeff et al. (2008), with modifications. The female fish received two intramuscular injections of pituitary extract of carp fish diluted in saline solution (0.5 mg kg^{-1} and 4.5 mg kg^{-1}), respectively, with intervals of 8 h between injections. The moment of spawning was calculated considering the sum of hour and temperature (hour-degree) after injection, which vary between 210 and 240 hours-degrees according to fish species. The spawning was performed in a plastic recipient and the gametes were manually fertilized. After 1 min, fertilized eggs were hydrated with water, properly packed in plastic bags with oxygen rich atmosphere and transported to the Laboratory of Cell Toxicology at Federal University of Paraná (Parana State, Brazil) where the experiments were performed.

Experimental design: 8 h-post fertilization (hpf), 4.608 viable eggs in gastrula stage were selected on a stereomicroscope (×0.7 to 4.5), according to Rodrigues-Galdino et al. (2010). For each treatment, 96 eggs were transferred into 96-well culture plates (TPP®, 1 egg per well; MacPhail et al. 2009) and 200 µL of test solutions were added. A total of 4 plates (384 embryos per treatment) were maintained at 24 °C in BOD type incubator (Solab®, model SL-224) with daily replacement of 50% of test solutions oxygen supply and remove the excess of ammonia. Hatched eggs were counted after 28 hpf (384 embryo/treatment), and live embryos were counted after 28 hpf (=hatched eggs), 48, 72 and 96 hpf (192 embryo/treatment) using a stereomicroscope (× 0.7 to 4.5). Since the exposure to the chemicals started 8 hpf, the period of exposure is hpf – 8 (e.g. 28 hpf → 20 h of exposure).

For the morphological analysis, 14-38 larvae per group and time (48, 72 and 96 hpf) were anesthetized with eugenol (50 mg L^{-1}) and fixed in Karnovsky's solution (2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3) for 24 h at room temperature. Then, the larvae were washed twice with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3 and stored at 4 °C until analysis. Larvae were carefully transferred to Petri dishes and analyzed on a stereomicroscope (×0.7 to 4.5) to malformations/deformities and classified into four categories and ranked (scores 1–4) according to severity, with higher scores meaning greater severity (Powers et al. 2011). The categories comprised: axial (stunted skeletal growth, kinked tail, column lordosis or kyphosis), fins (lesions, stunted or damaged fins),

cranial/facial (ocular edema, small otoliths, eyes absence, facial deformities, buccal deformities, absent/reduced barbells), thorax/abdominal (distension/emaciation, pericardial oedema). Different deformities may occur in the same animal, even within the same category and with different degrees of severity. Thus, for each animal analyzed, the malformation scores of all categories were summed totaling a range of 0 to 33. These individual scores were used for the statistical analysis. After this analysis the larvae were transferred to 24-well plate and photographed on Inverted Microscope Leica™.

Data modelling: a theoretical model based on individual (IMB) to assess the relationship between exposure to toxicity in the early stages of *R. quelen* and transfer of lethal and sub-lethal effects to adults on the population dynamics level was used (Brito et al. 2017). Briefly, the model was built dividing the fish life in three phases: i. (S^A) Probability of survival in phase (A) Embryo-larval which corresponding the first 96 h post-fertilization; ii. (b) Survival rate in phase (B) Juvenile which corresponds from exhaustion of the yolk (after 96 hpf) to one year old and iii. (S^C) Probability of survival in phase (C) Adult of one-year until 21 years old.

All procedures using the fish and larvae are in agreement with Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the Brazilian National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), as well as with the international guidelines for animal experimentation (protocol number 1132 - Committee of Animal Experimentation of the Federal University of Paraná, CEUA/BIO).

2.5 STATISTICAL PROCEDURES

Kruskal-Wallis (non-parametric ANOVA) followed by the Dunn test (α=0.05) were used for hatching rates, deformities and for predicted average relative population density over 100 years of exposition from modelling data. For deformity analysis, the scores based on the Powers index (2011) were summed before the comparisons to compose a value that individually represents the degree of severity for the deformities. To calculate the survival rate, the Kaplan-Meier test was used followed by Log-rank test (Mantel Coxx). In this case, the value of α (0.05) was divided by the number of comparisons to adjust the statistical results obtained for the multiple comparisons, according to the Bonferroni method (GraphPad Prism™, 2017). Then, this newly-calculated α was used to evaluate the statistical significance between the groups.

3 RESULTS

3.1 CHEMICAL ANALYSIS OF MICROCYSTIN AND PYRIPROXYFEN

The concentrations of microcystin and pyriproxyfen in the test solutions were confirmed by chemical analysis. For microcystin, the real concentrations were similar to those calculated: M1=0.95 μg L^{-1}, M2= 9.40 μg L^{-1} and M3= 97.8 μg L^{-1}. For pyriproxyfen, the real concentrations pyriproxyfen were lower than calculated: P1= 0.17 and P2= 1.85 μg L^{-1}. In the mixtures, the concentrations of microcystin were close to those of the respective isolated solutions; for pyriproxyfen, P1 levels ranged from 0.10 (P1M1) to 0.17 μg L^{-1} (P1M2) and P2 levels ranged from 0.84 in (P2M1) to 2.44 μg L^{-1} (P2M3).

3.2 HATCHING RATE ANALYSIS

Hatching rates of the control, M1, M3, P1, P2, P1M1, P2M2 and P2M3 groups were 66.7-87.5% and decreased 28% in M2 (Fig. 1). Conversely, hatching rates decreased 24-33% in P2M1 and P1M2 when compared with the control group, but there is no indication of toxicological interaction since the co-exposure and the alone exposures (microcystin or pyriproxyfen) had similar effects (Fig. 1).

3.3 SURVIVAL RATE ANALYSIS

For comparison among the groups, the accumulative survival at 96 hpf was considered. Except for P2M3 group, the decrease of survival rate was harsher at 0-28 hpf interval than after 28-96 hpf (Fig. 2). The survival rate in control group was about 79% and decreased in M2 (35%), P1 (20%), P1M2 (43%), P1M3 (27%) and P2M1 (25%, Fig. 2). From the groups exposed to microcystin, survival rate decreased only in M2 group (Chi Square - CS = 31.15; Fig. 2A), while for pyriproxyfen it decreased only in P1 group (CS= 11.85; Fig. 2B). These values were different when the co-exposure was considered. Larvae survival decreased in P2M1 in relation to the control (25%, CS=17.04) as well as in comparison to the single exposures (P2: 22%, CS=23.33; M1: 18%, CS=14.68), indicating a synergistic effect (Fig. 2D). No toxicological interaction was observed for the other co-exposure groups (Fig. 2). Interestingly, the co-exposure to the highest concentrations of microcystin and pyriproxyfen (P2M3) led to survival rates similar to the control (Fig. 2H).

3.4 MORPHOLOGICAL DEFORMITIES ANALYSIS

The deformities were analyzed after 48, 72 and 96 hpf and an index of severity was calculated according to Powers (2011), considering the classification in axial, cephalic, abdominal and fins categories.

After 48 hpf, the medians of deformities index were higher than that of the control for the majority of tested groups, except for P1 group (Fig. 3A). Toxicological interaction was observed for P1M2, P2M1 and P2M2, with an effect of intermediate value between those observed in P1 and M2 in the former group (P1M2), and lower effects for P2M1 and P2M2 groups than those in isolated exposures (Fig. 3A). A quite different situation was observed for 72 hpf, as the number of groups that differ from the control decreased and toxicological interaction occurred for P1M2 and P2M2 (Fig. 3B). Deformities index increased in P1M2, but no effect was observed for P1 and M2, and an apparent synergic effect occurred for P2M2 (Fig. 3B). Finally, there were no significant differences between the treatments and the control group, as well as toxicological interactions at 96 hpf (Fig. 3C).

No changes were found when the deformities index was compared among the control groups of different post-fertilization periods of time (Fig. 4). For contaminated groups, the embryos/larvae that survived over the 96 hpf were those with lesser deformities, as observed by the decrease of deformities indexes over time, i.e. from 48 to 96 hpf (Fig. 4A-C). On the other hand, no time-dependent decrease of deformities index was observed for P1, P1M3 and P2M3 groups (Fig. 4B-D).

3.5 MATHEMATICAL MODEL APPLICATION TO EVALUATE THE CHRONIC EXPOSURE OF *R. quelen* TO MICROCYSTIN AND PYRIPROXYFEN

The experimental data were related with the survival rates used in fish farming according to the model described by Brito et al. (2017) ($S^{A} = 0.60$, $b = 0.80$ and $S^{C} = 0.65$) and the impacts were calculated as decrease of survival in the presence of pollutant. In phase 1 (embryo-larval phase) the control group showed survival of about 80% (Control $S^{A} = 0.60$) while in the presence of microcystin (M1) it decreased to $S^{A} = 0.55$, (M2) to $S^{A} = 0.33$ and (M3) to $S^{A} = 0.56$ (Table 1). Assuming a scenario in which the same intensity of impact of contaminants on larvae can occurr in juveniles and adults fish, the model shows that the decreases of survival rates (Table 1) could lead, in the worst case, to extinction risk.

The figure 5A shows the predicted temporal evolution of the *R. quelen* population for 200 years, being the last 100 years exposed to microcystin, and assuming that the juvenil,

adult and the embryo-larval stages are both equally impacted. In a non-pertubative scenario in the absence of pollutants, the relative population density is around 1, as observed in first predicted one hundred years. Thus, when the exposure to microcystin is considered, the relative populational density decreased. Even under the low concentrations of microcystin (M1) the population decreases to levels lower than 0.70 (Fig. 5A), while in a 10-fold higher concentration (M2) the exposure may lead the population to an extinction risk, near to 0.14 (Fig. 5A and 6).

In figure 6, the results for all data for predicted temporal evolution of population during 100 years of exposure to pollutants are condensed as average of relative population density. As can be observed, there were decreases in population density for all analyzed groups, except for P1M1, in relation to the control (Fig. 6). Similarly, the isolated pollutants showed a synergic effect over density of populations from co-exposure groups, leading to reduction in P1M2, P1M3, P2M1 and P2M3. In P2M2, the effect of co-exposure maintained the population density between P2 and M2 levels. There is no effect of isolated exposure over P1M1.Considering that the levels of population density lower than 0.5 are critical for maintenance of the population, the populations exposed to M2 (as explained), P1, P1M3 and P2M1 are in risk of extinction. According to the mathematical modelling used, the extinction for P1M2 group would occur in six years of the co-exposure to contaminants (Fig. 5B).

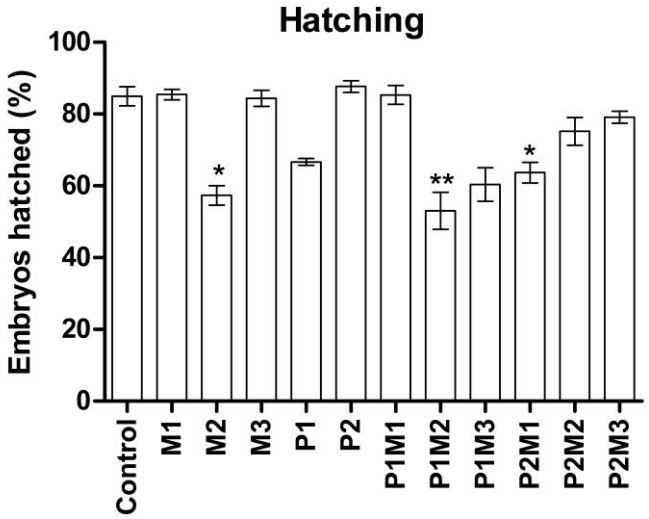


Figure 1. Percentage of hatching in embryos of *Rhamdia quelen* exposed to 1 µg L^{-1} (M1), 10 µg L^{-1} (M2), 100 µg L^{-1} (M3) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 µg L^{-1} (P1) and 0.84 µg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixtures of both chemicals (P1M1, P2M1, etc) at 28 hpf (hours post-fertilization). Exposure started 8 hpf so that at 28 hpf embryos had been exposed for 20 h. N=4. Kruskal-Wallis followed by Dunns post-test. *$p<0.05$ and **$p<0.01$ for comparison to the control.

Table 1. Percentage of survival of *R. quelen* embryo-larval exposed to different concentrations of pollutants after 96 hours pos fertilization and data used for mathematical model appplication

Treatments	Survival (%) 96 hpf	Sob A	Impact	S^A	b^*	S^{C*}
Control	79.17	0.79	1.00	0.60	0.80	0.65
M1	72.25	0.72	0.91	0.55	0.73	0.59
M2	43.98	0.44	0.56	0.33	0.44	0.36
M3	74.48	0.74	0.94	0.56	0.75	0.61
P1	58.85	0.59	0.74	0.45	0.59	0.48
P2	76.54	0.77	0.97	0.58	0.77	0.63
P1 M1	79.07	0.79	1.00	0.60	0.80	0.65
P1 M2	36.33	0.36	0.46	0.28	0.37	0.30
P1 M3	52.09	0.52	0.66	0.39	0.53	0.43
P2 M1	54.17	0.54	0.68	0.41	0.55	0.44
P2 M2	68.02	0.68	0.86	0.52	0.69	0.56
P2 M3	70.68	0.71	0.89	0.54	0.71	0.58

Sob A = survival 96 hpf data in non-percent form; Impact = Ratio between Sob A test group and Sob A control group; S^A = Probability of survival in phase (A) Embryo-larval; b = Survival rate in phase (B) Juvenile in absence of competition; S^C = Probability of survival in phase (C). * b and SC refer to survival values when the impact identified in larvae experimentally is considered equivalent in the juvenile and adult stages.

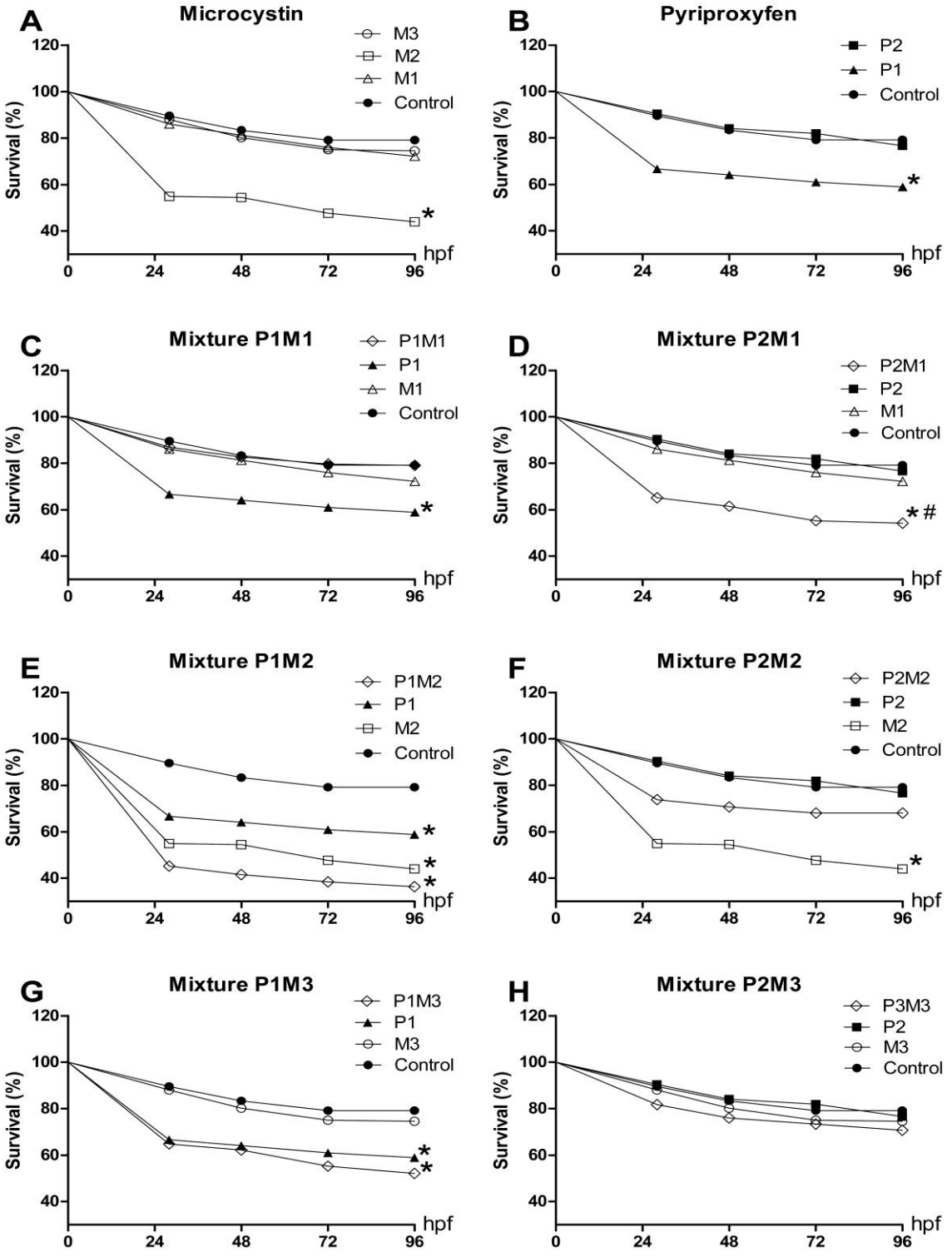


Figure 2. Percentage of survival of embryos/larvae of *Rhamdia quelen* exposed to 1 µg L^{-1} (M1), 10 µg L^{-1} (M2), 100 µg L^{-1} (M3) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 µg L^{-1} (P1) and 0.84 µg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixture of both chemicals (P1M1, P2M1, etc) at 28, 48, 72 and 96 hpf (hours post-fertilization). Exposure started 8 hpf so that the period of exposure is hpf – 8 (e.g. 28 hpf → 20 h of exposure). N=96-192. Kaplan-Meier analysis followed by Log-rank (Mantel Coxx test). α was adjusted by Bonferroni method to correct for multiple comparisons (p value threshold = 0.002). * indicates difference in comparison to the control; # indicates difference in comparison to the isolated pollutants.

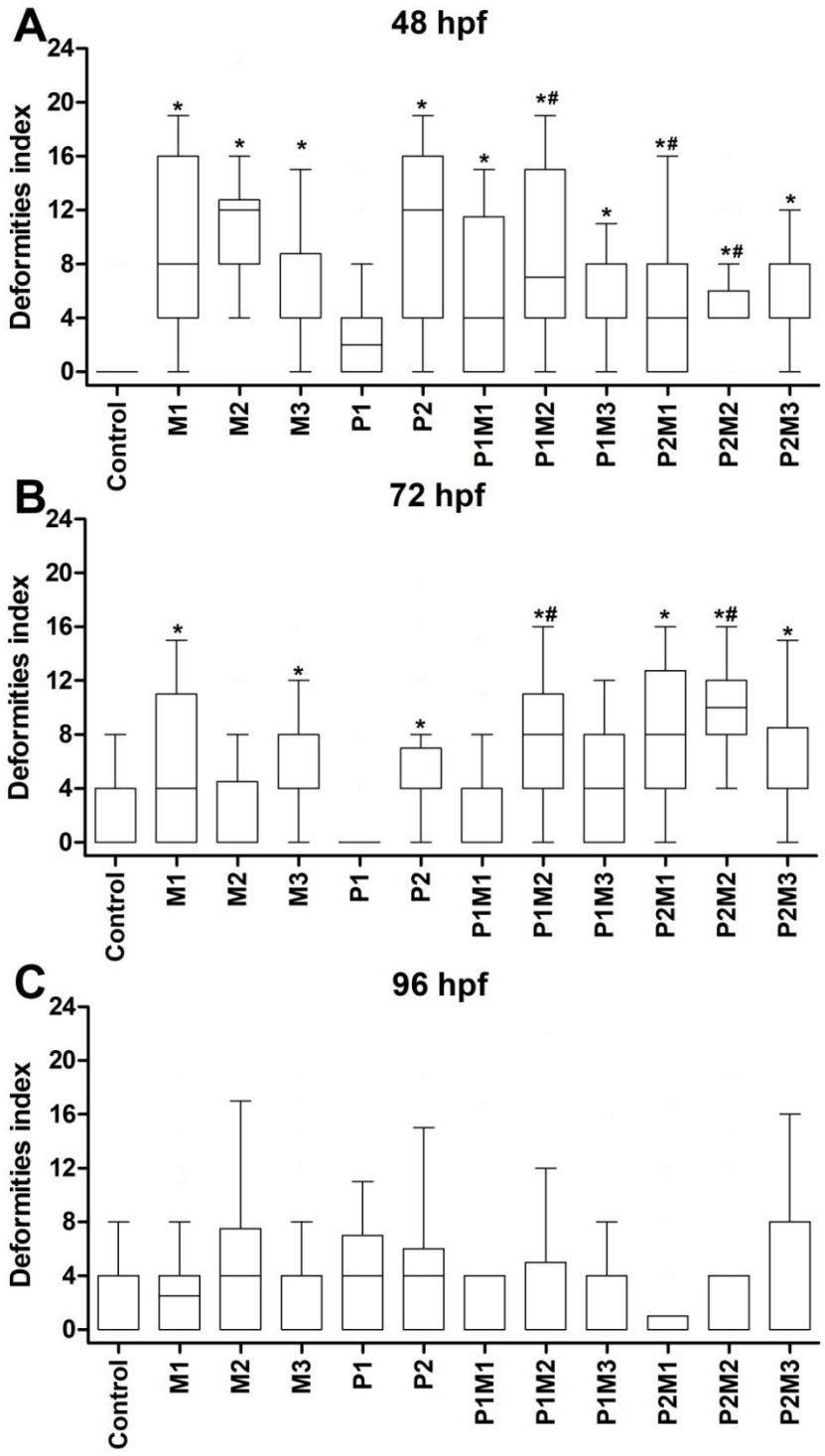


Figure 3. Median of deformities index of embryos/larvae of *Rhamdia quelen* exposed to 1 µg L^{-1} (M1), 10 µg L^{-1} (M2), 100 µg L^{-1} (M3) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 µg L^{-1} (P1) and 0.84 µg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixture of both chemicals (P1M1, P2M1, etc) at 48, 72 and 96 hpf (hours post-fertilization). Exposure started 8 hpf so that at 28 hpf embryos had been exposed for 20 h. N=17-38. Kruskal-Wallis followed by Dunns post-test. * indicates difference in comparison to the control; # indicates difference in comparison to the isolated pollutants. Deformity index was calculated as indicated in 2.4 section of M&M.

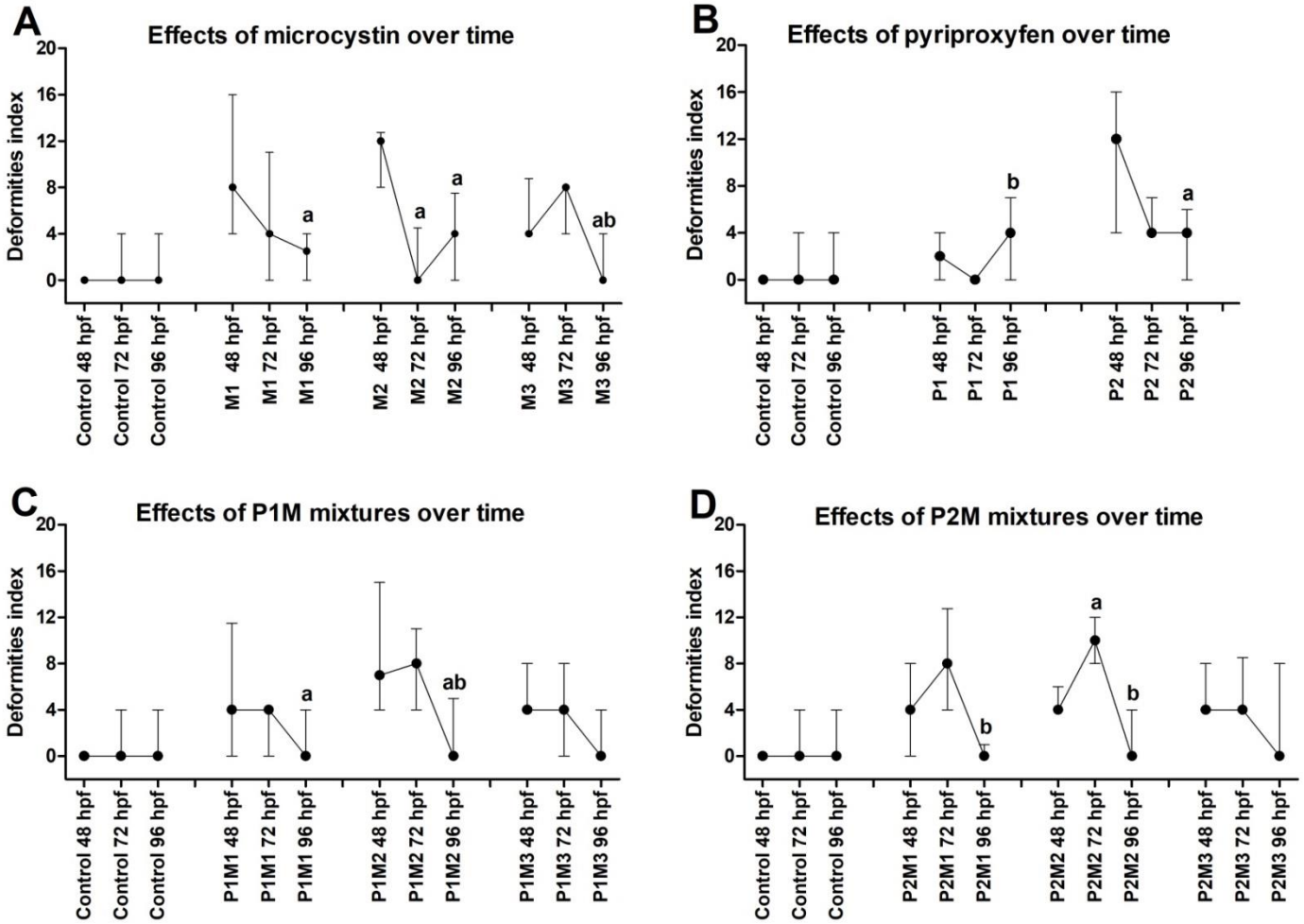


Figure 4. Median of deformities index of embryos/larvae of *Rhamdia quelen* exposed to 1 µg L^{-1} (M1), 10 µg L^{-1} (M2), 100 µg L^{-1} (M3) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 µg L^{-1} (P1) and 0.84 µg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixture of both chemicals (P1M1, P2M1, etc) at 48, 72 and 96 hpf (hours post-fertilization). N=17-38. Exposure started 8 hpf so that at 28 hpf embryos had been exposed for 20 h. Kruskal-Wallis followed by Dunns post-test. $p<0.05$. a- indicates difference in comparison to the 48 hpf and same group; b- indicates difference in comparison to the 72 hpf and same group. Deformity index was calculated as indicated in 2.4 section of M&M.

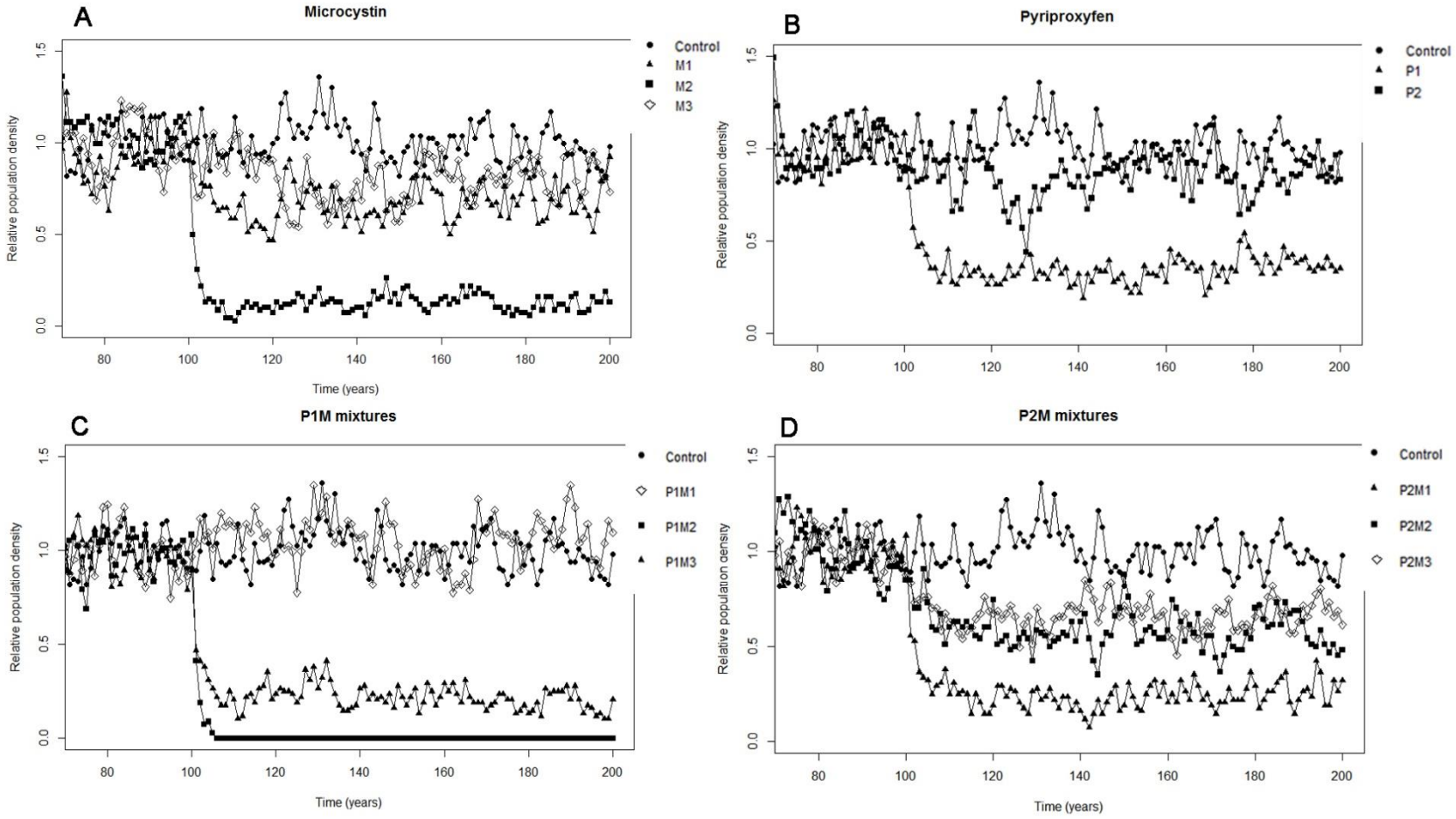


Figure 5. Temporal evolution of relative population density when the impacted of exposition to microcystin and pyriproxyfen is propagated for other life stages of *Rhamdia quelen*. The pictures show the exposure groups (A = Microcystins, B = Pyriproxyfen, C= P1M mixtures, D= P2M mixtures) when juveniles and adults are proportionally impacted as the embryo-larval stage. The populations achieve its asymptotic behavior before 20 generations. M1: 1 µg L^{-1}, M2: 10 µg L^{-1}, M3: 100 µg L^{-1}, P1 = 0.17 µg L^{-1} and P2 = 1.85 µg L^{-1}.

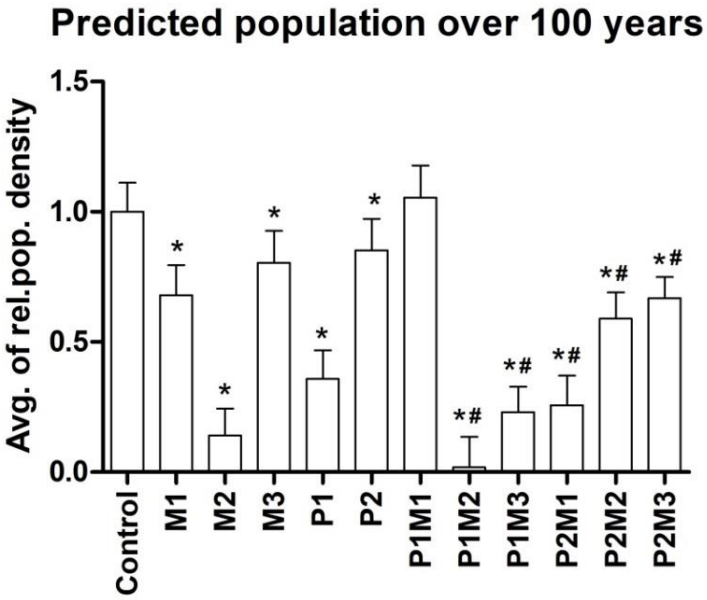


Figure 6. Predicted *Rhamdia quelen* average of relative population density over 100 years of exposure to 1 µg L^{-1} (M1), 10 µg L^{-1} (M2), 100 µg L^{-1} (M3) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 µg L^{-1} (P1) and 0.84 µg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixture of both chemicals (P1M1, P2M1, etc). Data are showed in media ±SD. n= 100. Statistical analyses were made by Kruskal-Wallis followed by Dunns post-test. * indicates difference in comparison to the control; # indicates difference in comparison to the both isolated pollutants.

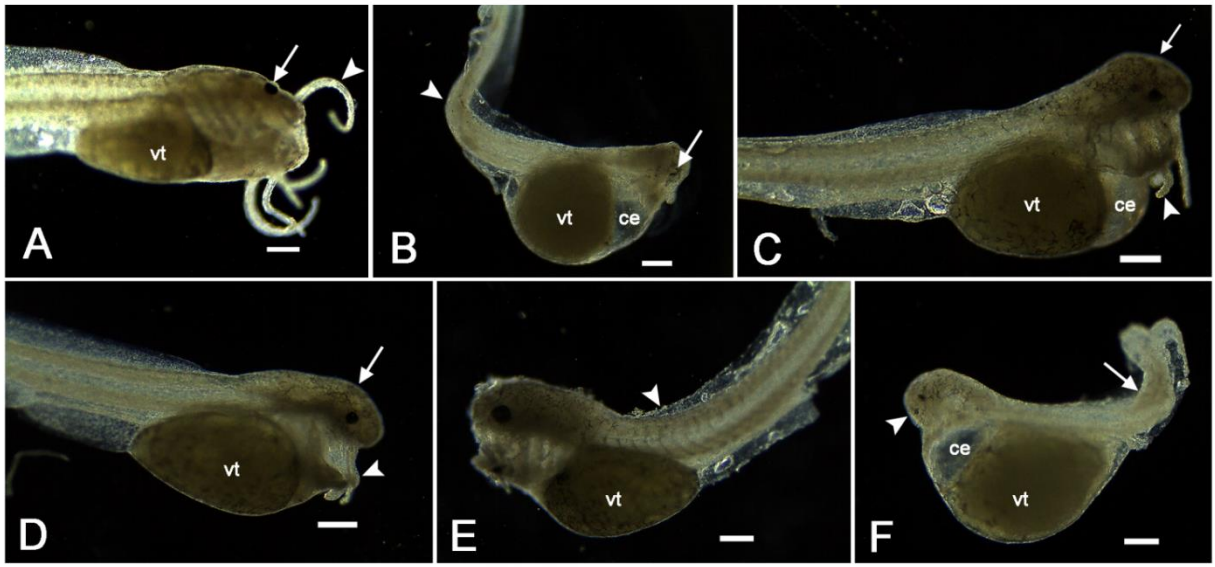


Figure 7. Deformities observed in *Rhamdia quelen* after exposure to microcystin (1, 10 e 100 µg L^{-1}) of microcystin-LR, a minimum of 0.10 µg L^{-1} (P1) and 0.84 µg L^{-1} (P2) of pyriproxyfen, and the mixture of both chemicals (P1M1, P2M1, etc). A. Control group 96 hpf. Observe the presence of barbells (arrowhead), eye (arrow) and vitelinic sac (vt). B. Larvae exposed to P2 72 hpf. The absence of eyes (arrow), thorax dysfunction (arrowhead) and pericardial oedema (ce) are observed. C. Larvae exposed to P1 72 hpf. The arrow indicates the head size alteration, the arrowhead the barbells atrophy including the pericardial oedema (ce). D. Control group 48 hpf. Observe the barbells and head under development. E. Larvae exposed to M3-72 hpf. The absence of barbells and thorax dysfunction (arrowhead) are observed. F. Larvae exposed to P2 72 hpf. The arrow shows thorax dysfunction while the arrowhead shows the absence of barbells, month and head size alteration. The pericardial oedema is also present (ce). Scale bar = 250 µm.

4 DISCUSSION

The current results showed that both microcystin and pyriproxyfen are toxic to *R. quelen* at earlier stages of development, with toxicological interactions in the survival rates and deformities index. In addition, a more pronounced deformities index were found at first 48 hpf and, after using a mathematical model to predict the population density for this species during exposure, it was observed a risk of extinction for several groups. These findings show that more attention is necessary to the use of pyriproxyfen in the control of the vector (mosquito) of Dengue, Chikungunya, and that the investigation of the effect of mixtures is still a challenge to ecotoxicology.

The concentrations of microcystin measured in the samples through chemical analysis were consistent with those calculated. For the pyriproxyfen, the values were below the calculated ones (40-fold for 10 μg L^{-1} and 100-fold for 100 μg L^{-1}). Therefore, it is possible that the extraction method used for releasing the pyriproxyfen from the volcanic sand granulate (15 min under shaking and using reconstituted water) was not efficient or that the product has been dissipated from the sample, as observed by Caixeta et al. (2016). Moreover, the stock-solutions were filtered in 80 g filter paper, as soon as they were prepared to remove the particulate material, which prevented that more pyriproxyfen could be released to the solution during the experiment. Overall, Belenger et al. (2014) detected 0.10 μg L^{-1} of pyriproxyfen in one site of water of Jucar River - Spain, while Ccanccapa et al. (2016) described concentrations of 24.38 ng L^{-1} in water of Ebro River, showing that the test concentrations utilized in the current study are realistic, making the results significantly important.

4.1 MICROCYSTIN AND PYRIPROXYFEN AFFECTED HATCHING OF *R. quelen* EMBRYOS

According to Rodrigues-Galdino (2010), the hatching for *Rhamdia quelen* occurs in 26 hpf at 24°C. In this way, the evaluation of hatching after 28 hpf can be considered adequate to observe if the hatching would be reduced or delayed. The hatching rate about 80% in the control group is considered adequate for the species (Brito et al. 2017), confirming the good health conditions of the animals used in the present experiments.

The reduced hatching rate observed for M2 is not completely explained by the other results, but M2 also presented decreased survival rate in comparison to the control and other tested concentrations. P1M2 and M2 affected the hatching rate in the same way, confirming

the effect of this concentration of microcystin. However, since the test pyriproxyfen concentration (P1) was very low (0.17 μg L^{-1}), it may be insufficient to affect the hatching. Decreased hatching rate have been reported by Malbrouck et al. (2006) and, according to the authors, depends on the fish species, concentration and variant of microcystin. Conversely, when eggs are exposed to 2.23 μg L^{-1} of pyriproxyfen (real concentration) in P2M2, no effect occurred, but P2M1 showed reduced hatching rate. The toxic mechanism of pyriproxyfen is not described in fish, but the concentration of 5 μg L^{-1}, twice that in P2 and P2-containing mixtures and half of the recommended concentration for use in drinking water, was enough to cause stress, erratic swimming, loss of equilibrium and lethargy on the larvivorous fish *Xiphophorus maculatus,* under acute exposure (Caixeta et al. 2016).

4.2 MICROCYSTIN AND PYRIPROXYFEN AFFECTED SURVIVAL OF *R. quelen* LARVAE

Larvae survival rate is crucial to understand the risk of exposure to chemicals in aquatic organisms, since it provides a link between toxicity and long-term maintenance of natural populations.

The reduced survival of larvae exposed to very low concentrations of pyriproxyfen (0.17 μg L^{-1}) and its mixture with microcystin (P1M2-3) is a concern because this molecule is being used to control *A. aegypti* mosquitoes in water supplies, following recommendation of Brazilian Health Ministry and WHO. We have no data on the co-existence of both chemicals, but it is possible to speculate a scenario. According to Santos et al. (2015), some reservoirs are impacted by urban activities including the illegal urban waste without treatment, which can lead to eutrophication and so potentially to cyanobacteria bloom. Release of pyriproxyfen from houses or the direct application of this chemical in reservoirs, and cyanobacteria blooms may create a scenario of co-exposure. Particularly, synergic effect of pyriproxyfen and microcystin (P2M1) requires better investigation.

The effects of microcystin on the survival rate in *Oryzias latipes* medaka (Saraf et al. 2018) were similar to those of *R. quelen* reported in the current study, but the authors used higher concentration (120 μg L^{-1} of microcystin from algal bloom). On the other way, they did not find effect up to 600 μg L^{-1} of microcystin from a laboratory cepa. So, larvae of *R. quelen* may be more sensitive than that of *O. latipes*.

4.3 MORPHOLOGICAL DEFORMITIES ARE MORE FREQUENT AT THE FIRST HOURS OF DEVELOPMENT

The frequency of deformities in larvae is essential to establish the risk of exposure, because some alterations can lead to death, and impaired movements and behavior. Here, the most frequent deformities were cephalic damage (mainly eye and head sizes) and absent or reduced barbells and they occurred at first hours of exposure (see Fig. 7 for images of the deformities). Damages in barbells and other sensitive structures may impair feeding and reproduction with consequences to population maintenance. Other deformities like fin damage, abnormal body curvature and size (lordose, kyphosis, body atrophy) and pericardial oedema may impair larvae survival and render them more susceptible to predation. Curiously, deformities indexes were higher in M2 and P2 than most co-exposures after 48 hpf, although the effects of co-exposures on hatching and survival rates had been higher than that of isolated exposures. The majority of sensitive structures affected by isolated exposures is concentrated in the head of larvae. These findings are corroborated by studies that reported loss of equilibrium and lethargy in fish *X. maculatus* (Caixeta et al. 2016), ocular damages, small head, abnormal larval trunk and tail curving, oedema in pericardial sac (Wang et al., 2005; Huynh-Delerme et al., 2005) and bradycardia (Saraf et al., 2018) in embryos after exposure to microcystin.

Studies of pyriproxyfen effects in fish larvae are scarce and very recent. Facial deformities were describe to *Danio rerio* embryos exposed to very high concentrations of pyriproxyfen (1670 μg L^{-1}) that led to high mortality, and mandibular and eyes deformities (Truong et al., 2016). Under lower concentrations (<100 μg L^{-1}), Dzieciolowska et al. (2018) found no deformities in *Danio rerio* (eye size and corporal length), but increases of mortalities and teratogenic effects occurred at higher concentrations. These data reinforce the suggestion that *R. quelen* embryos/larvae are more sensitive to exposure to microcystin and pyriproxyfen than other species, which is particularly preoccupying due to frequency of use of pyriproxyfen and the occurrence of cyanobacteria blooms in tropical regions.

After 72 hpf, increases of indexes were observed for isolated exposures and co-exposures, with toxicological interactions in P1M2 and P2M2. Finally, after 96 hpf there was no difference between control and all exposure groups. In this way, our hypothesis is that the individuals that presented high damages on external structures did not survive until 96 hpf as a consequence of these malformations.

The set of results strongly suggest that there is some interaction between microcystin and pyriproxyfen, either directly or as a consequence of their action on the physiology of *R. quelen* embryo/larvae. However, the interaction of both may cause synergistic and antagonistic effects, depending on their concentrations and the analyzed endpoints.

4.4 MATHEMATICAL MODEL REVEALED A RISK OF EXTINCTION TO THE SPECIES *R. quelen* AFTER MICROCYSTIN AND PYRIPROXYFEN EXPOSURE TO POST-FERTILIZED EGGS

Recently, our group proposed mathematic modelling studies as complementary methods to evaluate perturbations at the individual level to the population level (Brito et al., 2017). The model utilizes experimental data on *R. quelen* embryos and larva exposed to pollution conditions resulting in a stochastic model to evaluate the effect of the pollutants at the population level.

Applying the mentioned model, we observed that M2, P1 and, foremost, half of the co-exposed groups presented a risk of extinction over one hundred years. In fact, for P1M2 it was calculated that the group would be extinct after 6 years, showing this group was the most affected according to the model.

According to Lande (1993), smaller populations are more sensitive to random environmental fluctuations effects. Populations in which the densities were lower than 0.5, like M2, P1, P1M3 and P2M1, could be subject of demographic and environmental stochasticity and, over time, it could increase the chances of local extinction of these populations (Pimm et al., 1988), affecting the ecosystem.

Some authors (Davidson, 2009; Henle, 2004; Fujiwara, 2007) argue that models can be used significantly to quantify the risks of extinction of populations. In this way, the findings showed in this study are, at least, an alert to ecologists and for conservation politics involving the aquatic ecosystems.

5 CONCLUSIONS

Realistic concentrations of microcystin-LR and pyriproxyfen affected deleteriously the initial stages of development of *R. quelen*, and the intermediate concentration of microcystin (10 μg L^{-1}) was the most critical. Co-exposure to pyriproxyfen and microcystin suggests toxicological interaction depending on their concentrations and the endpoint analyzed in the embryos and larvae of the species. As these compounds may potentially occur simultaneously

in the aquatic environment, there must be caution on the use of pyriproxyfen to control *Aedes aegypti* dispersion until more studies determine the real environmental safety of the compound. Finally, despite of a theoretical approach, the results from the modelling studies point for a more ecological finding that, associated with other parameters, lead to a more complete interpretation of the risk of exposure of fish to microcystin and pyriproxyfen.

Acknowledgments

This study was supported by the National Council of Science and Technology - CNPq and State Agency of Science and Technology of Parana State - Araucaria Foundation. The authors thank the technical participation of Sabrina Borges Lino Araújo, Magda C V Costa Ribeiro, Robson Ribeiro Linhares, Alex Fabiano Paulin and Ronei Ezequiel da Paixão. We would like thanks to Health Secretary of Parana State, Brazil, for supplying the Sumilarv product for this study.

References

4th WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES), 2001. Geneva: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_WHOPES_2001.2.pdf?ua=1 –IR3535, KBR3023, (RS)-methoprene 20%EC, pyriproxyfen 0.5%GR and lambda-cyhalothrin 2.5%CS. 4—5. December 2000, Ref:WHO/CDS/WHOPES/2001.2, 2001.

Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR). Bula do produto Cordial 100. Available at: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/CORDIAL100.pdf>. (Acessed in December 2017).

Belenger, V., Martinez-Capel, F., Masiá, A., Picó, Y., 2014. Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (Eastern Spain). J. Hazard. Mater. 265, 271– 279.

Brasil, Ministério da Saúde, 2011. Portaria nº 2914, de 11 de dezembro de 2011. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 14 dez. 2011.

Brasil, Ministério da Saúde, 2014. Orientações técnicas para utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de Aedes aegypti. Available at: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/30/Instrucoes-para-uso-de-pyriproxyfen-maio-2014.pdf>. (Acessed in December 2017).

Brito, I.A.A., López-Barrera, E.A., S.B.L., Oliveira Ribeiro, C.A., 2017. Modeling the exposure risk of the silver catfish Rhamdia quelen (Teleostei, Heptapteridae) to wastewater. Ecol. Model. 347, 40-49.

Caixeta, E.S., Silva, C.F., Santos, V.S., Campos Júnior, O. E., Pereira, B.B., 2016. Ecotoxicological assessment of pyriproxyfen under environmentally realistic exposure conditions of integrated vector management for Aedes aegypti control in Brazil. J. Toxicol. Environ. Health 79A, 799-803.

Carmichael, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins, 1992. J. Appl. Bacteriol. 72, 445-459.

Ccanccap, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., 2016. Pesticides in the Ebro RIver basin: Occurrence and risk assessment. Environ. Poll. 211, 414-424.

Chen**,** Y-W., Wu, P**-**S., Yang, E-C., Nai, Y-S., Huang, Z.Y., 2016. The impact of pyriproxyfen on the development of honey bee(Apis mellif**e**ra L.) col**o**ny **i**n field. J. Asia. Pac. Entomol. 19, 589–594.

Dahlmann, J., Budakowski ,W. R., Luckas, B., 2003. Liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins, J. Chromatogr., A, 994, 45.

Davidson, A.D., et al. 2009. Multiple ecological pathways to extinction in mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. **U**SA 106, 10702-10705.

Dzieciolowska, S., Larroque, A-L, Kranjec, E-A., Drapeau, P., Samarut, E., 2017. The larvicide p**y**riproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. *Scientific Reports*, 7, art. no. 40067. Available at <https://www.nature.com/articles/srep40067> (Acessed in December 2017).

EPA, 2009. "Method 538: Determination of Selected Organic Contaminants in Drinking Water by Direct Aqueous Injection-Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (DAI-LC/MS/MS)," Revision 1.0, U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, EPA/600/R-09/149, November 2009.

EPA, 2015. Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, Health and Ecological Criteria Division Washington, DC, June 2015.

Fishbase.org, 2017. Available at <http://www.fishbase.org/summary/Rhamdia-quelen.htmL> (Acessed in December 2017).

Fujiwara, M. 2007. Extinction-effective population index: Incorporating life-history variations in population viability analysis. Ecology 88, 2345-2353.

Graeff, A.; Segalin, C.A.; Pruner, E.N.; Amaral Jr., H. Produção de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Florianópolis: Epagri, 2008. 34p. (Epagri. Boletim Técnico, 140)

GraphPad Prism™, 2017. Available at <https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?comparing_three_or_more_groups.htm>. Acessed in December 2017).

Henle, K., Sarre, S., Wiegand, K., 2004. The role of density regulation in extinction processes and population viability analysis. Biodivers. Conserv. 13, 9-52.

Hilborn, E.D., Carmichael, W.W., Yuan, M., Azevedo, S.M.F.O, 2005. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. Toxicon, 46, 218–221.

Huynh-Delerme, C., Edery, M., Huet, H., Puiseux-Dao, S., Bernard, C., Fontaine, J.J., Crespeau, F., Luze, A., 2005. Microcystin-LR and embryo-larval development of medaka fish, Oryzias latipes. I: effects on the digestive tract and associated systems. Toxicon 46, 16–23.

Invest, J.F. and Lucas, J.R, 2008. Pyriproxyfen as a mosquito larvicide. In: Robinson W.H., Bajomi D. (Eds). Proc. 6th Int. Conf. on Urban Pests, Budapest, pp. 239-245.

Jacinavicius, F.R., Gama-Júnior, W.A., Paiva Azevedo, M.T., Sant'anna, C.L. Manual para o Cultivo de Cianobactérias. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Instituto de Botânic a- Núcleo de Pesquisa em Ficologia. Available at <http://botanica.sp.gov.br/institutodebotanica/files/2013/09/virtuais_4cianobact%C3%A9rias.pdf> (Acesso in December 2017).

Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Anziliero, D., Martins, D., Lorenson, M., Marteninghe, A., Silva, L.B., 2008. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. Ciência Rural, Santa Maria, 38, 1050-1055.

Liu, Y., Song, L., Li, X., Liu, T., 2002. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, Misguruns mizolepis Gunthe. Toxicon 40, 395–399.

MacPhail, R.C., Brooks J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D., Padilla, S., 2009. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. Neurotoxicology 30, 52–58.

Malbrouck, C., Kestemont, P., 2006. Effects of microcystins on fish. Environ. Toxicol. Chem. 25, 72–86.

McKenney, C.L., 2005.The influence of insect juvenile hormone agonists on metamorphosis and reproduction in estuarine crustaceans. Integr. Comp. Biol. 45. p. 97-105.

Pavagadhi, S., Balasubramanian, R., 2013. Toxicological evaluation of microcystins in aquatic fish species: current knowledge and future directions. Aquat. Toxicol. 142- 143, 1–16.

Pimm, S.L., Jones, L., Diamond, J., 1988. On the risk of extinction. Am. Nat. 132, 757-785.

Pimpão, C.T., Moura, E., Fredianelli, A.C., Galeb, L.G., Rocha, R.M.V.M., Montanha, F.M., 2013. Evaluation of Toxicity in Silver Catfish, in: Türker, H (Ed), New Advances and Contributions to Fish Biology. InTech, Croatia, pp 197-220. DOI: 10.5772/45635.

Powers, C.M., Slotkin, T.A., Seidler, .F.J., Badireddy, S.P., 2011. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. Neurotoxicol. Teratol. 33, 708–714.

Properties Pesticides Database (PPBD) Available at <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/574.htm#3> (Acessed in December 2017).

Puddick, J., Prinsep, M.R., Wood, S.A., Kaufononga, S.A., Cary, S.C., Hamilton, D,P., 2014. High levels of structural diversity observed in microcystins from Microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. Mar Drugs. 13, 5372-95.

Rodrigues-Galdino, A.M., A.M., Maiolino, C.V., Forgati, M., Donatti, L.,Mikos, J.D., Falanghe Carneiro, P.C., Sant'Anna Rios, F., 2010. Development of the neotropical catfish Rhamdia *quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. Zygote 18, 131–144.

Santos, D.R., Yamamoto, F., Filipak Neto, F., Randi, M.A.F., Moura-Costa, D.D., Liebel, S., Xavier, S., Voigt, C.L., Oliveira Ribeiro, C.A., 2016.The applied indicators of water quality may underestimate the risk of chemical exposure to human population in reservoirs utilized for human supply-Southern Brazil. Environ Sci Poll Res Int 23, 9625-9639.

Saraf, S.R., Frenkel, A., Harke, M.J., Jankowiak, J.G., Gobler, C.J., McElroy, A.E., 2018. Effects of Microcystis on development of early life stage Japanese medaka (Oryzias latipes): Comparative toxicity of natural blooms, cultured Microcystis and microcystin-LR. Aquatic Toxicology. 194, 18–26.

Sihuincha, M., Zamora-Perea, E., Orellana-Rios, W., Stancil, J.D.,, López-Sifuentes, V., Vidal-Oré, C., Devine, G.J., 2005. Potential use of pyriproxyfen for control of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Perú. J. Med. Entomol. 42,620-30.

Silva-Stenico, M.E.**,** Cantúsio Neto,Alves, I.R., Moraes, L.A.B., Shishido, T.K., Fiore, M.F., 2009. Hepatotoxin Microcystin-LR Extraction Optimization. J. Braz. Chem. Soc., 20, 535-542.

Truong, L., Gonnerman, G., Simonich, M.T., Tanguay, R.L., 2016. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish, Environ Pollut., 218, 1089–1093.

Wang, P., Chien, M., Wu, F., Chou, H., Lee, S., 2005. Inhibition of embryonic development by microcystin-LR in zebrafish, Danio rerio. Toxicon 45, 303–308.

Wiegand, C.; Pflugmacher, S., 2005 Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites - a short review. Toxicol Appl Pharm, 203, 201– 218.

World Health Organization (WHO). Pyriproxyfen in drinking-water: Use for vector control in drinking-water sources and containers. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 2008. Relatório técnico.

World Health Organization, 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus, I.; Bartram, J (Eds). eds E & FN Spon on behalf of WHO, London.

World Health Organization, 2003. Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.

Available at <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cyanobactoxins.pdf> (Acessed in December 2017).
World Health Organization, 2008. Pyriproxyfen in drinking-water: Use for vector control in drinking-water sources and containers. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Available at <http://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/pyriproxyfen-background.pdf> (Acessed in December 2017).

Yapabandara, AM., Curtis, CF, 2004. Control of vectors and incidence of malaria in an irrigated settlement scheme in Sri Lanka by using the insect growth regulator pyriproxyfen. J Am Mosq Control Assoc. 20,395-400.

CAPÍTULO III

Aplicação de métodos para o desenvolvimento de um sistema para a detecção de microcistina-LR

RESUMO

Os processos de eutrofização dos ambientes naturais tem favorecido uma maior frequência de florações de cianobactérias em todo o planeta. Como existe uma grande diversidade de espécies de cianobactérias produtoras de toxinas é necessário que haja um aperfeiçoamento na detecção de baixos níveis das mesmas principalmente nos corpos d´água. Dentre estas toxinas, destacam-se as microcistinas, existentes em mais de 100 isoformas, sendo a mais tóxica e letal, a microcistina-LR (MC-LR). Neste sentido, alguns ensaios têm sido desenvolvidos para a detecção desta toxina em níveis abaixo dos considerados seguros em água de abastecimento público (1 $\mu g\ L^{-1}$). Este trabalho tem por objetivo avaliar métodos que pudessem ser utilizados para o desenvolvimento de um sistema de detecção de MC-LR baseado principalmente em aptâmeros de DNA. Foram realizados testes de interações moleculares e testes em microplaca e eletroquímicos. Através dos primeiros, observou-se que o aptâmero AN6 descrito na literatura, modificado com grupamento amino na região 5' foi o que se ligou melhor à microcistina e que seria possível ancorá-los à um oligonucletídeo através de ligação de adenina-timina. Os ensaios de detecção em microplaca não apresentaram boas respostas, devido à baixa fluorescência gerada ou a impedimento estérico. Por outro lado, os testes eletroquímicos (voltametria cíclica e de espectroscopia de impedância) indicaram o funcionamento adequado de um dispositivo de papel revestido por ouro e forneceram algumas respostas de detecção positiva, porém, sem especifidade e repetibilidade. Após algumas alterações nos dispositivos e nos protocolos, os primeiros resultados parecem bastante promissores. Contudo, mais testes são necessários para a comprovação de seu completo funcionamento, assim como, a realização de processos de validação. Com completo desenvolvimento deste biossensor, será possível uma quantificação de MC-LR de forma simples, rápida, barata, em um dispositivo reciclável e de tecnologia nacional, e com potencial de ser utilizado diretamente em análises de campo.

Palavras-chave: microcistina, biossensor, aptâmeros.

1 INTRODUÇÃO

Devido à alta toxicidade das microcistinas e da ocorrência de florações de cianobactérias produtoras de microcistinas também em reservatórios de água, a Organização Mundial de Saúde (WHO- *"Worldwide Organization"*), estabeleceu um limite máximo da presença dessa molécula em água de consumo humano em 1 $\mu g\ L^{-1}$ (WHO, 1999). No Brasil, este limite está expresso na legislação RDC 2914 (Brasil, 2011).

Dessa forma, alguns sistemas de detecção de microcistinas têm sido desenvolvidos com o intuito de identificar precocemente essas moléculas e facilitar o manejo de corpos d´água, bem como avaliar a qualidade da água. Dentre esses destacam-se os bioensaios com camundongos, testes imunoenzimáticos (ELISA) e derivados, teste de inibição de proteínas fosfatases, técnicas cromatográficas como Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE), Cromatografia de Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de alta Pressão acoplada à Espectrometria de Massas (CLAP)-MS/MS, Espectrometria de Massas (MS), análises moleculares por Reação de Cadeia Polimerase (PCR – "*Polymerase chain reaction"*), PCR em tempo real e, mais recentemente, análises com anticorpos ou aptâmeros em biossensores eletroquímicos, dentre outras (Lin et al., 2013; Weller et al., 2013; Xiang et al., 2014; Eissa and Zourob, 2017).

No entanto, visando o desenvolvimento de um sistema de detecção nacional, de baixo custo, simples, rápido, de alta sensibilidade e com potencial de análise "*in loco*" ou "*point of care*", foi estudado neste trabalho alguns métodos que pudessem permitir o desenvolvimento de um tipo de biossensor para a detecção de microcistinas com base no uso de aptâmeros.

Os aptâmeros são pequenas moléculas de ácidos nucleicos de fita simples ou polímeros de aminoácidos que se ligam com alta seletividade a moléculas-alvo como se fossem anticorpos monoclonais (Song et al., 2012; Xi-Hui et al., 2013). Estas moléculas possuem vantagens frente aos anticorpos que as fazem serem desejáveis para aplicação em sistemas de detecção, tais como: estabilidade à temperatura ambiente, fácil produção ("*in vitro"*) através de sintetizadores automáticos, baixo custo, quimicamente sintetizados sem variações de lote, baixa toxicidade e imunogenicidade, ligam-se a diversos tipos de moléculas-alvo (Homann & Göringer, 1999; Song et al., 2012), podem apresentar alta afinidade e especificidade e sua marcação não gera perda de afinidade, dentre outras (Mairal et al., 2008).

Em 2001 e 2012 foram desenvolvidos aptâmeros para a microcistina-LR (Nakamura et al, 2001 e Ng et al., 2012). Neste último trabalho, os pesquisadores conseguiram desenvolver

aptâmeros de alta afinidade e testaram a sua funcionalidade em um biossensor (aptasensor) eletroquímico de ouro através da técnica de voltametria de onda quadrada. Os resultados obtidos apontaram para uma faixa de linearidade entre 10 pM e 10 nM (Ng et al., 2012). Em 2014, o mesmo grupo aplicou um dos aptâmeros desenvolvidos no trabalho de 2012 supra-citado em um eletrodo comercial de grafeno e mesma técnica eletroquímica; neste caso, foi atingido o limite de detecção de 1,9 pM e máximo de detecção de 10 μM de microcistina-LR. Além disso, houve a recuperação de mais de 90% de microcistina-LR em água e mais de 98% da toxina em músculo de peixe, ambos fortificados com MC-LR (Eissa et al., 2014).

Xiang et al. (2014), por sua vez, desenvolveram um imunoensaio de aptâmero-anticorpo ("*aptamer-antibody immuneassay", AAIA*), em capilares de vidro e com detecção por quimioluminescência em um sistema portátil com o aptâmero RC6 (desenvolvido por Ng et al., 2012). Neste caso, foi possível quantificar a MC-LR na faixa de 0,5– 4,0 μg L^{-1} e a sensibilidade atingida foi de 0,3 μg L^{-1}. Este sistema foi testado em amostras de lagos fortificadas com MC-LR, apresentando recuperações acima de 90% e tempo total de análise de 35 min.

Assim, de acordo com as características dos aptâmeros que os tornam vantajosos para ensaios e pelo sucesso de seu uso em biossensores eletroquímicos, nesse trabalho foram escolhidos dois aptâmeros com alta afinidade para a microcistina-LR desenvolvidos por Ng et al. (2012), AN6 e RC6 – Figura 1. Para a detecção, foram selecionadas duas formas de ensaios: testes em microplaca de 96 poços, bastante difundidos na área biológica sob diversos formatos, e testes eletroquímicos. Além disso, alguns ensaios de interação molecular foram realizados para estabelecer as melhores condições para os ensaios; formatos de detecção utilizando anticorpos também foram realizados, para verificar a viabilidade das técnicas estudadas.

1.1 ENSAIOS PARA VERIFICAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES

A) Ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética ("Electrophoratic Mobility Shift Assay" – EMSA): trata-se de uma eletroforese de afinidade. Esta técnica é aplicada normalmente para avaliar qua interação molecular entre DNA-proteínas e RNA-proteínas através de corrida eletroforética. Assim, as moléculas de interesse e seus possíveis ligantes, como um aptâmero e sua molécula-alvo são incubadas em tampão que mantém a conformação nativa das moléculas e as permitem interagir. Após a incubação por determinado período, é realizada corrida eletroforética em gel preparado com um tampão similar, não desnaturante, o

que garante que as interações moleculares sejam preservadas. Como controle, as moléculas isoladas - sem o ligante complementar – e tratadas da mesma forma são corridas no mesmo gel. Ao final da corrida, é avaliado o atraso das bandas das moléculas agrupadas em comparação com as bandas das moléculas isoladas, sendo que o atraso na corrida indica uma massa molecular maior e, portanto, que há interação molecular.

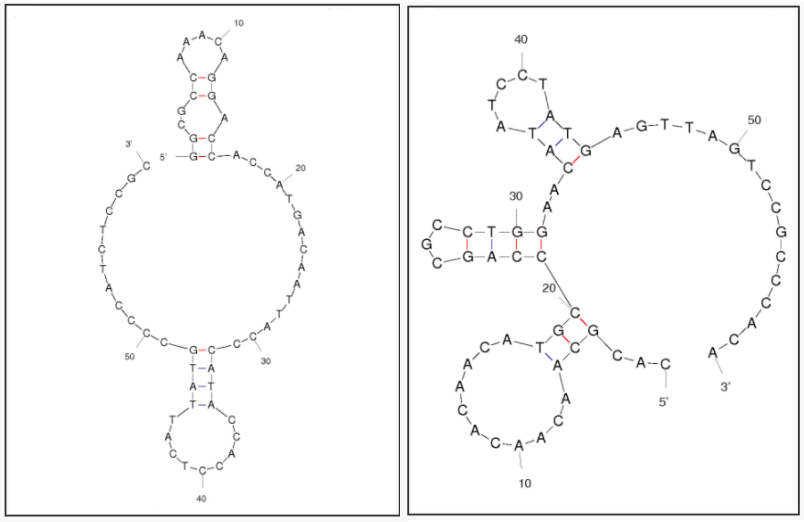


Figura 1. Estrutura secundária predita dos aptâmeros de fita simples de DNA AN6 e RC6 desenvolvidos por Ng et al. (2012) e utilizados neste trabalho. As letras A, T, C e G correspondem aos nucleotídeos adenina, timina, citosina e guanina, respectivamente. Fonte:www.aptagen.com

B) Dicroísmo Circular ("Circular Dichroism", CD): é uma técnica que utiliza de 2 ondas eletromagnéticas defasadas em 90º que, através de polarizadores, são orientadas para a direita e esquerda, formando uma luz polarizada circular. Os materiais opticamente ativos tem capacidade de absorver parte desta luz circular de forma diferente para a esquerda e direita, formando então, uma elipse (Woody, 1995). Assim, o resultado do ensaio é expresso como a elipsidade (mdeg) que é a diferença entre a luz polarizada à esquerda e direita. Dessa forma, um sinal negativo indica que a luz foi desviada para a direita e um sinal positivo, que a luz foi desviada para a esquerda pela amostra, em determinado comprimento de onda. Através deste ensaio é possível avaliar mudanças conformacionais nas moléculas, como as geradas no aptâmero pela ligação deste a um ligante (Woody, 1995). Eissa et al. (2014) também avaliaram a possível interação do aptâmero AN6 à microcistina utilizando concentrações equimolares de 0,67 µM e utilizando de uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

C) Testes em Ressonância Plasmônica de Superfície ("Surface Plasmon Resonance", SPR) com aptâmeros: nesta técnica, um campo eletromagnético evanescente é gerado

quando a luz plano-polarizada incide sobre um metal a um dado ângulo excitando os plásmons presentes em sua superfície. Então, este campo eletromagnético entra em ressonância e junto à radiação incidente gera um ângulo de SPR (θSPR) ao passar pela interface metal/dielétrico. Quando moléculas são imobilizadas sobre a superfície do metal, este ângulo sofre alterações que são detectadas pelo equipamento. Esta técnica permite a verificação de interação de moleculares como as interações entre biomoléculas, em tempo real e com alta sensibilidade (Damos et al., 2004).

1.2 ENSAIOS PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS

Os testes de detecção estudados possuem etapas comuns de imobilização de moléculas e incubação com moléculas-alvo. Os testes em microplaca utilizaram moléculas marcadas com fluoróforo ou revelação por fosfatase alcalina (AP) ou peroxidase (HRP), ao passo que os testes eletroquímicos realizados não necessitaram de marcações (Fig. 2).

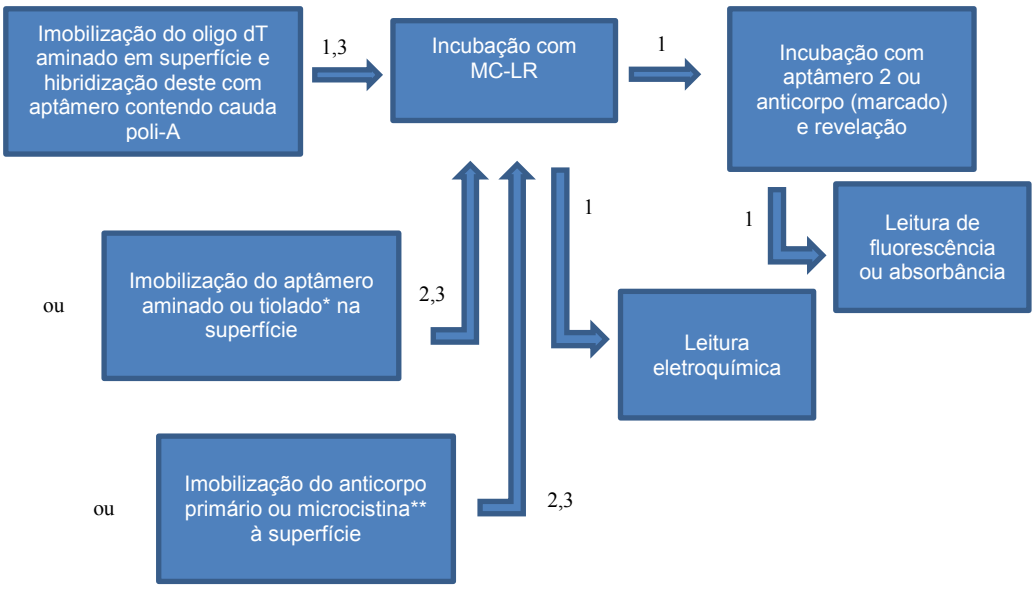


Figura 2. Representação esquemática das etapas realizadas para a detecção de microcistina pós etapa de funcionalização da superfície. O número 1 representa lavagens em tampão ou água, dependendo do ensaio, 2 representa incubações com EDC e/ou EDC/NHS e 3, as etapas de bloqueio da superfície.* sem necessidade de funcionalização prévia da superfície. ** realizado somente para os testes em microplaca.

A) ALISA ("Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay"):

É uma versão análoga ao método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) que utiliza, ao invés de anticorpos, 2 aptâmeros para capturar a molécula-alvo, sendo um deles marcado com biotina (ou outro marcador), fornecendo um sinal que poderá ser quantificado (Vivekananda & Kiel, 2006; Citartan, 2012). Segundo estes autores, o método ALISA é bastante confiável e rentável, uma vez que os aptâmeros podem ser reutilizados (pois desnaturam e renaturam após aquecimento à altas temperaturas) várias vezes sem perder a sensibilidade. Tal método pode ser considerado uma excelente alternativa ao ELISA tradicional, pois podem ser mais sensíveis e específicos devido às propriedades dos aptâmeros.

B) Métodos Eletroquímicos em Dispositivos de Papel:

Neste trabalho foram aplicadas duas técnicas eletroquímicas para o desenvolvimento de um biossensor sensível à microcistina: voltametria cíclica ("cyclic voltammetry", CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

Em superfícies metálicas, monocamadas auto-organizadas ("self-assembled monolayers", SAM) podem ser facilmente formadas com o uso de alcanotióis (Vericat et al., 2010, Newton et al., 2013). Esta camada formada pela adsorção do grupamento tiol em espaços entre as moléculas do metal, como o ouro (Newton et al., 2013), e pela organização das cadeias ligadas ao grupo funcional adsorvido, através de interações hidrofóbicas (Freire et al., 2003). Alcanotióis como o ácido mercaptopropiônico (MPA) possuem na extremidade oposta ao tiol, um ácido carboxílico, através do qual, biomoléculas contendo aminas primárias podem ser ancoradas por ligação amida (peptídica) na presença de carbodiimida, segundo o protocolo da ThermoFisher Scientific (2018). Assim, proteínas ou outras moléculas aminadas como aptâmeros aminados podem ser imobilizados sobre superfícies carboxiladas (Angeloni et al., 2013; Zheng et al., 2011). Através desta imobilização, pode-se construir um biossensor com transdução eletroquímica, por exemplo, sem a necessidade de utilização de marcadores para verificação de sua ligação a moléculas-alvo (label-free), permitindo, assim, que leituras diretas da molécula de interesse sejam realizadas em tempo real, tornando os ensaios mais rápidos e menos trabalhosos por não necessitarem de marcações moleculares.

A voltamétrica cíclica (CV-*"cyclic voltammetry"*) tem por característica a variação de potencial elétrico aplicado de forma linear, com valores crescentes e decrescentes. A

aplicação do potencial para regiões mais positivas (anódicas) gera oxidação de espécies eletroativas em solução, gerando um pico de corrente anódico (Ipa) proporcional à concentração destas no composto; a aplicação de potenciais para regiões negativas (catódicas), por outro lado, gera redução das espécies em solução e um pico de corrente catódica (Ipc), (Aleixo, 2003). A CV é bastante utilizada para fornecer informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, tais como: cinética de reações de transferência de elétrons, reações químicas acopladas a processos adsortivos e termodinâmica de reações redox (Wang, 2006; Pacheco, 2013). Desta forma, a CV é normalmente utilizada para avaliar a funcionalidade de eletrodos construídos. Por exemplo, utilizando uma sonda eletroquímica de perfil voltamétrico conhecido, como ferricianeto/ferrocianeto, é possível verificar o quanto um eletrodo construído é capaz de se aproximar de um funcionamento eletroquímico ideal de comportamento reversível, com correntes de pico anódica (Ipa) e catódica (Ipc) similares e variação de potencial entre tais correntes (ΔEp) de 59 mV (Silva, 1998; Vernasqui, 2017). Além disso, através desta técnica é possível verificar a presença de compostos com comportamento redox em solução sobre um eletrodo de trabalho ou de perturbações sobre a transferência de cargas entre a sonda eletroquímica (solução de leitura de comportamento conhecido) a partir da imobilização de moléculas sobre ele.

Por outro lado, a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica ("electrochemical impedance spectroscopy", EIS) é uma técnica que vem sendo utilizada em biossensores, apresentando alta sensibilidade - nanomolar à femtomolar, dependendo da construção do biossensor e analito (Xu et al., 2013; Sharma et al., 2016). Através desta técnica, é possível avaliar a resistência à transferência de elétrons entre o par redox presente na sonda eletroquímica e a superfície do eletrodo (*Rct*). Esta resistência de transferência de elétrons é proporcional ao bloqueio da superfície do eletrodo ocasionado pela presença de moléculas sobre ele, como: formação da monocamada, ligação de biomoléculas e de diferentes concentrações do analito. Assim, quanto mais bloqueada estiver a superfície do eletrodo pela presença de diferentes moléculas sobre ele, maior será a resistência encontrada pelo par redox para a transferência de elétrons com a solução e, portanto, maior será o seu sinal de impedância. Este sinal geralmente é representado como um semicírculo pela relação de duas componentes de impedância, Z'' versus Z, sendo que a resistência *Rct* corresponde ao diâmetro do semi-círculo formado (diagrama de Nyquist). Outra forma de representar o sinal de impedância é pelo diagrama de Bode, que relaciona o log de $|Z|$ pelo deslocamento de fase do sinal φ. Outros componentes do sinal referem-se à *Re, Cdc e Zw* (respectivamente,

resistência da solução eletrolítica, capacitância da dupla camada e impedância de Warburg). A partir destes dados do sistema, um circuito equivalente pode ser calculado para uma representação aproximada do comportamento da interface do eletrodo-solução.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

- Desenvolver um protótipo de sistema de detecção de microcistinas-LR utilizando aptâmeros e/ou anticorpos, visando contribuir para avaliação da qualidade de água de rios e reservatórios.

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a interação de aptâmeros com oligonucleotídeos com regiões complementares em ensaio de mudança de mobilidade eletroforética sob diversas condições de temperatura de incubação;
- Avaliar a interação de aptâmeros com microcistinas e outros aptâmeros para a verificação da funcionalidade de um sistema sanduíche em ensaio de mudança de mobilidade eletroforética;
- Avaliar a interação de aptâmeros com microcistinas em ensaio de dicroísmo circular e ressonância plasmônica de superfícies;
- Avaliar a funcionalidade de um sistema em microplacas utilizando aptâmeros fluorescentes para a revelação do sinal – ensaio ALISA sanduíche;
- Avaliar a funcionalidade de um sistema em microplacas utilizando aptâmeros fluorescentes ou anticorpos conjugados à HRP ou fosfatase para a revelação do sinal – ensaio AAIA;
- Avaliar a funcionalidade de dispositivos de papel e ouro para análises eletroquímicas através de ensaios em voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica – estabilidade de sinal, conjugação de biomoléculas (aptâmeros ou anticorpos) e detecção de microcistinas.

Neste Capítulo estão descritas brevemente as técnicas utilizadas e os principais resultados obtidos. Os protocolos para cada técnica estão detalhados no item 2.6 - Material e Métodos geral.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AQUISIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Os aptâmeros AN6 E RC6 para a microcistina-LR, cujas sequências estão descritas no artigo de Ng et al. (2012), foram selecionados por possuírem maior afinidade pela microcistina-LR e adquiridos da Biosearch Technologies™. Estes aptâmeros foram adquiridos ligados a iniciadores "primers", com marcação com fluoróforo 6-FAM (6-carboxifluoresceína) ou cauda de 20 adeninas (poli-A). Aptâmeros com sequências nucleotídicas embaralhadas "scramble" também foram adquiridos na mesma configuração, para a realização de testes de seletividade à microcistina (Tabela 1). Outros aptâmeros, somente contendo a sequência randômica, sem iniciadores, foram adquiridos ligados a grupamento tiol ou amino, com espaçador de 6 a 12 carbonos e estão representados na Fig. 3 para o aptâmero AN6. A mesma construção foi realizada para o aptâmero RC6.

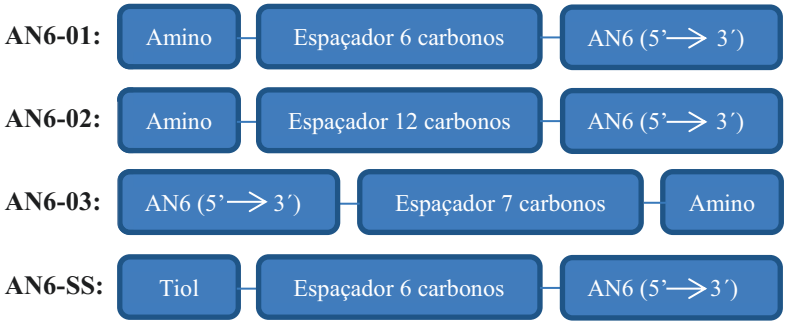


Figura 3. Representação esquemática dos aptâmeros aminados derivados do aptâmero AN6 (AN6-01, AN6-02, AN6-03) e tiolado (AN6-SS). Os espaçadores são hidrocarbonetos alcanos de 06 a 12 carbonos.

Para a ligação aos aptâmeros com cauda poli-A, uma sequência oligonucleotídica de 20 timinas foi adquirida, com espaçador de 12 carbonos e um grupamento amino na região 5' (oligo dT, Fig. 4). O grupamento amino, assim como o grupamento tiol quando ligados à biomoléculas servem para favorecer a ligação destes à determinadas superfícies, como superfícies aminadas ou carboxiladas, ou ainda, ao ouro, no caso do tiol (Gibbs, 2001). Também foram selecionados oligonucletídeos curtos, de até 15 nucleotídeos e ligados ao 6-FAM, de modo a permitir a verificação de aptâmeros na superfície através de emissão de fluorescência. Todos os oligonucleotídeos citados estão descritos na Figura 4.

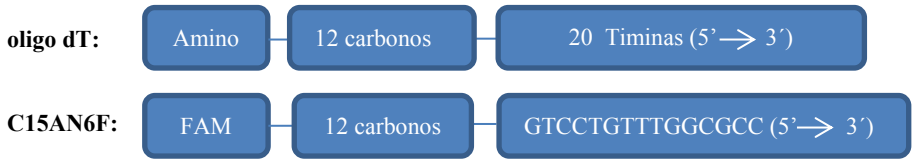


Figura 4. Representação esquemática dos oligonucleotídeos utilizados (oligo dT e C15AN6F).

Outras biomoléculas adquiridas foram: microcistina-LR – 10 µg com 99% de pureza, marca Enzo Life Sciences™; microcistina-LR – 500 mg com 95% de pureza, marca Abraxis™ e os anticorpos monoclonais para microcistina AD4G2 e MC10E7 da marca Enzo Life Sciences™.

2.2 ENSAIOS PARA VERIFICAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES

A) Ensaio de Desvio de Mobilidade Eletroforética:

Para avaliar a interação entre os aptâmeros contendo a cauda poli-A (aptâmero 1) e os oligo dT, assim como, para avaliar a ligação dos aptâmeros à microcistina, foi aplicada a técnica de EMSA. Ajustes no protocolo em relação ao tampão de corrida e do gel, presença ou ausência de EDTA e magnésio e concentração de poliacrilamida foram previamente testadas. Os detalhes do protocolo e da realização deste ensaio estão descritos 2.6 - Material e Métodos geral. Para estes ensaios não foi utilizado marcador de peso molecular, uma vez que a comparação direta entre as bandas era suficiente para a obtenção dos resultados desejados.

As condições de temperatura analisadas para a hibridização das moléculas (aptâmero com cauda poli-A e oligo dT) estão descritas abaixo, assim como os grupos analisados.

condição A: aptâmero 1 e oligo dT colocados juntos, desnaturados a 95°C por 5 min, em seguida aquecidos a 55°C por 30 min, esfriados a 4°C por 10 min e aquecidos novamente a 25°C.

condição B: aptâmero 1 e oligo dT colocados juntos, desnaturados a 95°C por 5 min, esfriados a 4°C por 10 min e aquecidos novamente a 25°C.

condição C: aptâmero 1 e oligo dT colocados juntos, desnaturados a 95°C por 5 min, em seguida esfriados a 4°C por 10 min, aquecidos a 55°C por 30 min e esfriados novamente a 25°C.

condição D: aptâmero 1 e oligo dT desnaturados a 95°C por 5 min separados, em seguida, colocados juntos e esfriados à temperatura ambiente.

As amostras testadas para todas as condições de temperatura compreenderam:

- AN6A1 com ou sem oligo dT;
- AN6A2 com ou sem oligo dT;

Para estes ensaios foram usados excesso de aptâmeros na relação (1:2, sendo 0,25 µM de oligo dT e 0,50 µM de aptâmero) ou concentrações equimolares de 0,25 µM;
Em seguida, foram realizados testes somente com as condições A e D para os grupos abaixo, os quais foram preparados com concentrações equimolares de 0,25 µM;

- AN6A1 com ou sem oligo dT;
- AN6A1 com MC;
- AN6A1 com RC6F1;
- AN6A1 com oligo dT, MC e RC6F1;
- RC6F1+MC
- RC6F2

Este mesmo desenho foi realizado para o aptâmero AN6A2 e RC6F2.

Tabela 1. Sequências de aptâmeros selecionados (destacados em vermelho) ligados aos seus iniciadores (em preto). A cauda poli–a é representada por polyA20 e a marcação por fluorescência por FAM.

Nome	Sequência 5’ → 3’
Iniciador 1 5’→3´ sentido direto	5’-ATACCAGCTTATTCAATT-3’
Iniciador 2 5’→3´- complementar ao iniciador reverso	5’-AGATAGTAAGTGCAATCT-3’
RC6A1	5′-polyA20-iniciador 1- ACACACGGCCACGCCGTACATAAGCCACCAATCATACCGGCTAGACCACTCCGATAATTG-iniciador 2-3′
AN6A1	5′-polyA20-iniciador 1-GGCGCCAAACAGGACCACCATGACAATTACCCATACCACCTCATTATGCCCCATCTCCGC-iniciador 2-3′
RC6Ax1	5′-polyA20-iniciador 1- ACACACGGCCACGCCGTACATAAGCCACCAATCATACCGGCTAGACCACTCCGATAATTG-iniciador 2-3′
AN6Ax1	5′-polyA20-iniciador 1- AGTCAACCAAGTCGAACGTAACCGCGCACAATCCTTACCACTCCTCTCGTCACCGACCAC-iniciador 2-3′
RC6F1	5′-iniciador 1- CACGCAACAACACAACATGCCCAGCGCCTGGAACATATCCTATGAGTTAGTCCGCCCACA-iniciador 2- FAM -3′
RC6Fx	5′-iniciador 1- ACACACGGCCACGCCGTACATAAGCCACCAATCATACCGGCTAGACCACTCCGATAATTG-iniciador 2- FAM -3′
AN6F1	5′-iniciador 1- GGCGCCAAACAGGACCACCATGACAATTACCCATACCACCTCATTATGCCCCATCTCCGC-iniciador 2- FAM-3′
AN6Fx1	5′-iniciador 1- AGTCAACCAAGTCGAACGTAACCGCGCACAATCCTTACCACTCCTCTCGTCACCGACCAC-iniciador 2- FAM-3′
RC6A2	5′-iniciador 1- ACACACGGCCACGCCGTACATAAGCCACCAATCATACCGGCTAGACCACTCCGATAATTG-iniciador 2- polyA20-3′
AN6A2	5′-iniciador 1- GGCGCCAAACAGGACCACCATGACAATTACCCATACCACCTCATTATGCCCCATCTCCGC-iniciador 2- polyA20-3′
RC6F2	5′- FAM -iniciador 1- CACGCAACAACACAACATGCCCAGCGCCTGGAACATATCCTATGAGTTAGTCCGCCCACA-iniciador 2-3′
AN6F2	5′- FAM-iniciador 1- GGCGCCAAACAGGACCACCATGACAATTACCCATACCACCTCATTATGCCCCATCTCCGC-iniciador 2-3′

B) Espectroscopia de dicroísmo circular:

Neste trabalho utilizou-se soluções de 0,5, 1 e 3 μM de aptâmeros, cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm e 2 acumulações (repetições de leitura); os demais parâmetros foram idênticos ao descrito por Eissa et al., (2014), como tampão de ligação utilizado e os demais parâmetros de configuração do equipamento, como segue: varredura entre 230 a 340 nm, com 0,1 nm de intervalo, velocidade de 50 nm/min, largura de banda de 1 nm e constante de tempo de 1 s. O equipamento utilizado foi o espectropolarímetro J-815 da Jasco™.

Foram testados vários conjuntos de amostras, como segue:

- Aptâmeros com cauda poli-A: AN6A1, AN6A2, RC6A1 ou RC6A2 em concentração equimolar de 1 μM com microcistina-LR e incubação por 45 min.
- Aptâmeros marcados com fluorescência: RC6F1 e RC6F2, AN6F1 e AN6F2 em concentração equimolar de 1 μM com microcistina-LR e incubação por 45 min.
- Combinações de aptâmeros: AN6A1+RC6F1, AN6A2+RC6F2, RC6A1+AN6F1 ou RC6A2+AN6F2 todos em concentração equimolar de 1 μM com microcistina-LR e incubação por 45 min.
- Grupo extra de 3 μM de AN6A1 e 1 μM de microcistina para comparação – incubada com MC por 45 min.
- Aptâmeros somente contendo a região randômica, um espaçador e grupamento amina (AN6-01, AN6-02 e AN6-03 ou RC6-01, RC6-02 e RC6-03), todos com concentração equimolar de 0,5 μM com microcistina-LR. A incubação com MC foi realizada momentos antes do ensaio (2 a 5 minutos). Após um período mínimo de 20 min, a solução foi lida novamente.

Todas as moléculas foram diluídas em tampão de ligação (50 mM tris, 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, pH 7.5).

Para o processamento dos dados de CD, descontaram-se as leituras obtidas de um tubo branco, contendo somente tampão. Em seguida, os dados foram tratados com filtro de Transformada de Fourier Rápida (FFT) para eliminação de ruídos, com percentual de "cutoff" de 1% através do programa Origin Pro 8.

C) Ressonância plasmônica de superfície (SPR):

Este ensaio foi realizado no departamento de Bioquímica da UFPR no equipamento SPR 220A da BIONAVIS Ltd. Para os ensaios, seguiu-se o protocolo de Zheng et al. (2011), com modificações. Brevemente, o chip (SPR Sensorchip Bionavis CMD 500 I – hidrogel carboximetildextrano – baixa densidade) foi lavado com água e álcool e as medidas angulares basais foram realizadas. Em seguida, a modificação da camada de ouro foi realizada com a utilização de ácido mercaptopropiônico (MPA), formando uma monocamada auto-organizada ("SAM ou self-assembled monolayer") deste reagente sobre o eletrodo. Então, esta camada foi modificada com 0,2 M de EDC [cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropril) carbodiimida] e 0,05 M de NHS (N-Hidroxisuccinimida) para favorecer o ancoramento do aptâmero AN6-01-2 (previamente desnaturado à camada de MPA, através de ligação peptídica. Neste ponto, o chip foi lavado novamente e medido. Na sequência do ensaio, o chip foi bloqueado com etanolamina e a microcistina foi injetada no equipamento, para analisar em tempo real a variação angular causada pela mesma sobre a superfície do chip (Fig. 5).

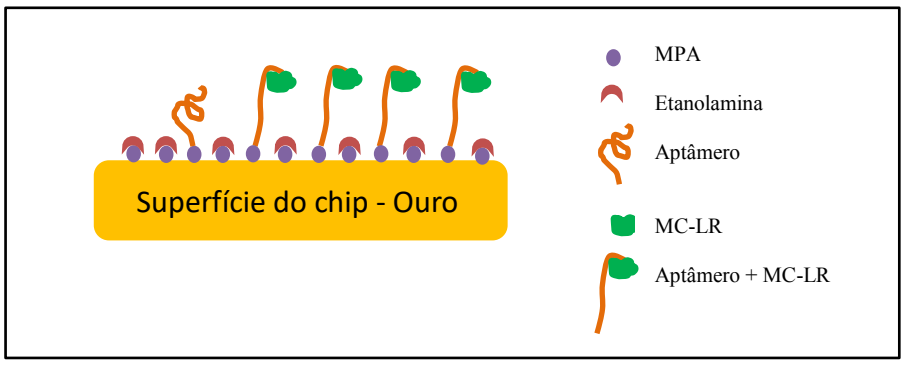


Figura 5. Diagrama esquemático da ligação das biomoléculas sobre a superfície do chip de ouro para o ensaio de SPR.

2.3 ENSAIOS PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS

A) Testes ALISA e outros formatos em microplaca:

Testes preliminares ao ALISA foram realizados para verificação de condições ótimas e a viabilidade para o desenvolvimento do teste ALISA tipo sanduíche, como proposto por Vivekananda & Kiel, (2006). Neste sentido, os principais protocolos realizados com por revelação por fluorescência encontram-se resumidas na Tabela 2. Os protocolos utilizados estão descritos com detalhes no item 2.6 - Material e Métodos geral.

Foram testados ainda alguns protocolos de diferentes formatos, conforme Figura 6, com revelação por aptâmero fluorescente: A) ALISA sanduíche com dois aptâmeros, B) testes competitivos - com microcistina ligada à ovalbumina (MC-ova) para a sensibilização das placas e relevação por I) aptâmero ou II) anticorpo marcado e C) teste AAIA (aptamer-antibody immunoassay). Este último foi testado com duas configurações diferentes: I) sensibilização da placa da placa por aptâmero e revelação com anticorpo ligado à fosfatase (AP) - anticorpo scFv3A8-AP marcado com fosfatase alcalina em extrato periplasmático ou por anticorpos comerciais de camundongo anti-MC-LR MC10E7 ou anti-ADDA AD4G2 ambos da Enzo Life Sciences™ e revelação por anticorpo secundário anti-camundongo-HRP.ste tipo de ensaio, ou II) por sensibilização da placa com anticorpo primário anti-MC-LR MC10E7 ou anti-ADDA AD4G2MC10E7 e revelação por aptâmero fluorescente. Para estes testes AAIA, ainda foram testadas diferentes concentrações de anticorpos. No caso dos testes competitivos utilizando MC-ova para a sensibilização das placas, a microcistina foi conjugada à ovalbumina através do uso de um protocolo padrão utilizando EDC e diálise (ThermoFisher Scientific, 2018). Esta conjugação foi necessária porque, como a microcistina é um hapteno, necessita de proteína carreadora para ser imobilizada sobre suportes sólidos.

B) Testes eletroquímicos:

Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com o Laboratório de Dispositivos e Sistemas Funcionais do LNNANO (Laboratório Nacional de Nanotecnologia do CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) que desenvolveu um dispositivo confeccionado à base de papel sulfite impermeabilizado com cera e tratado com uma fina camada ouro de 150 nm (Santhiago et al., 2017), (Fig. 7A).

Vários protocolos foram testados nos eletrodos construídos a partir da plataforma de papel sulfite e ouro, utilizando-se de adaptações de protocolos descritos na literatura – Figura 8. Inicialmente, foi testada a necessidade de condicionamento eletroquímico (ciclagens em voltametria cíclica antes dos ensaios) e concentrações de tampões. Em seguida, foram testadas a funcionalização da superfície através de ácido mercaptopropiônico (MPA), hidrocloreto de dopamina, albumina e ácido mercaptossuccínico para favorecer a imobilização de biomoléculas – anticorpos via ligação peptídica, na presença de EDC ([cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropril) carbodiimida] e NHS (N-Hidroxisuccinimida), ou de oligonucleotídeos dT ou aptâmeros aminados através do mesmo tipo de ligação na presença de EDC. Interações diretas da biomolécula de interesse (aptâmero tiolado) também foram estudadas, assim como,

testes com aptâmeros ligados à beads magnéticas, diferentes tampões para as incubações e diferentes concentrações de sonda eletroquímica. Testes de bloqueio com etanolamina e hexanetiol, assim como, para a remoção de ligações inespecíficas com ácido fosfórico e tween 20 em tampão PBS pH 7.4 também foram realizados. Basicamente, duas técnicas foram estudadas: voltametria cíclica, que fornece informações sobre a transferência de elétrons entre a sonda eletroquímica e a superfície do eletrodo e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). As principais condições testadas estão resumidas na Tabela 3 e os principais protocolos encontram-se detalhados no item 2.6 - Material e Métodos geral. Nas representações gráficas de voltametria cíclica, o eixo x indica o potencial aplicado no eletrodo de trabalho (Volts) em relação ao eletrodo calomelano de referência; o eixo y indica a corrente elétrica (microÀmperes). Nos gráficos de EIS, o eixo x corresponde à componente real da impedância (Ω), que se relaciona aos valores de transferência de carga, enquanto que o eixo y corresponde à componente imaginária da impedância (Ω), relativa à capacitância da dupla camada elétrica.

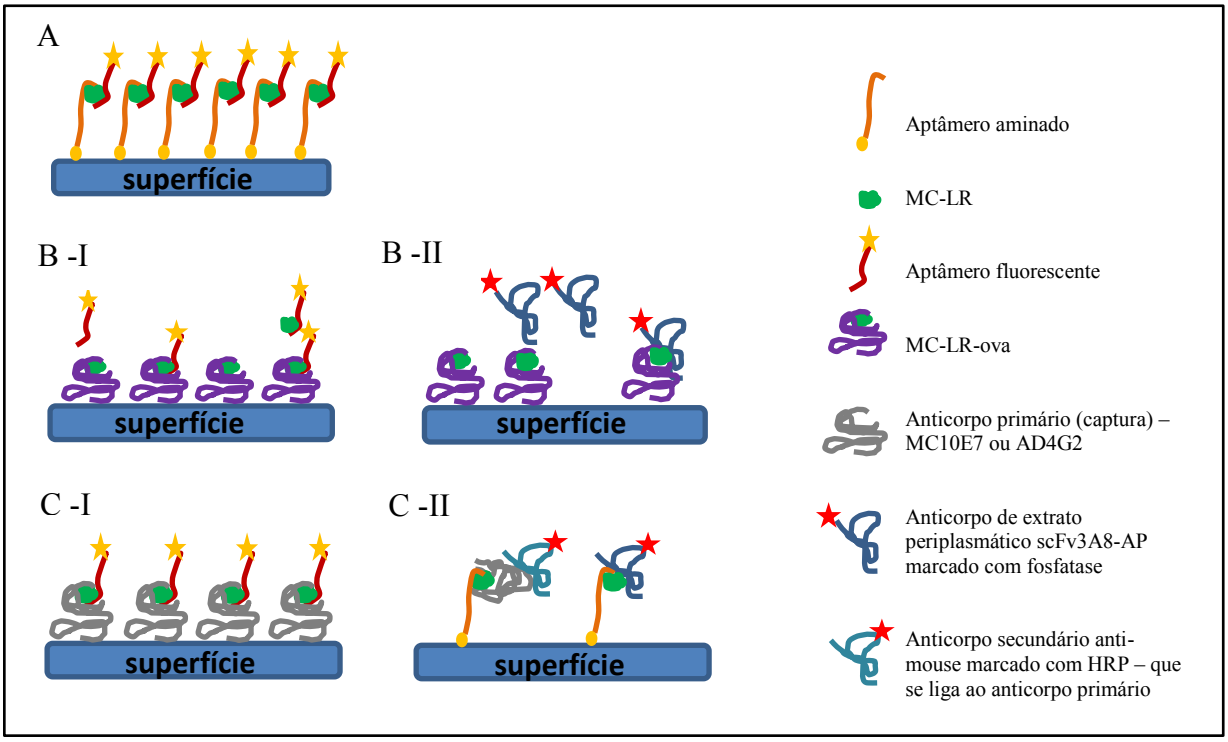


Figura 6. Diagramas esquemáticos das ligações de biomoléculas sobre o fundo das microplacas. A) Para testes com dois aptâmeros; B) testes com placa sensibilizada por microcistina-LR-ovalbumina. I- revelação por aptâmero fluorescente e II- relevação por anticorpo marcado com fosfatase. C) Testes híbridos com aptâmeros e anticorpos. I- revelação por aptâmero fluorescente e II – revelação por anticorpo marcado com fosfatase ou peroxidase.

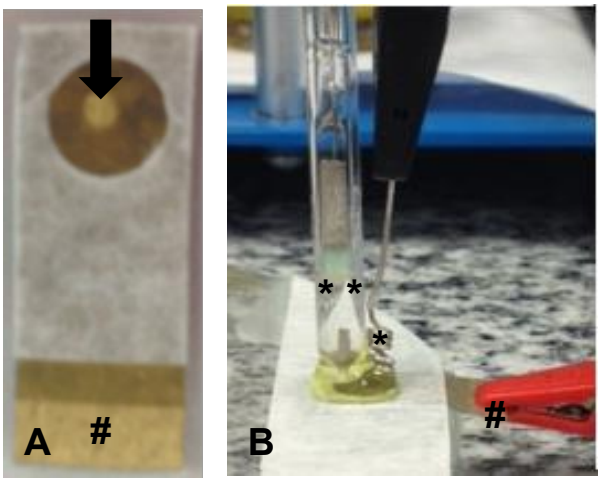


Figura 7. A) Dispositivo de ouro construído em papel sulfite já preparado para as análises voltamétricas; B) análise eletroquímica sendo realizada em uma gota de solução de oxi-redução Ferri/Ferro. Seta: eletrodo de trabalho - ponto de imobilização da amostra e leituras eletroquímicas -; #: ponto de ligação do potenciostato; *: eletrodo auxiliar (fio de platina); * *: eletrodo de referência (calomelano).

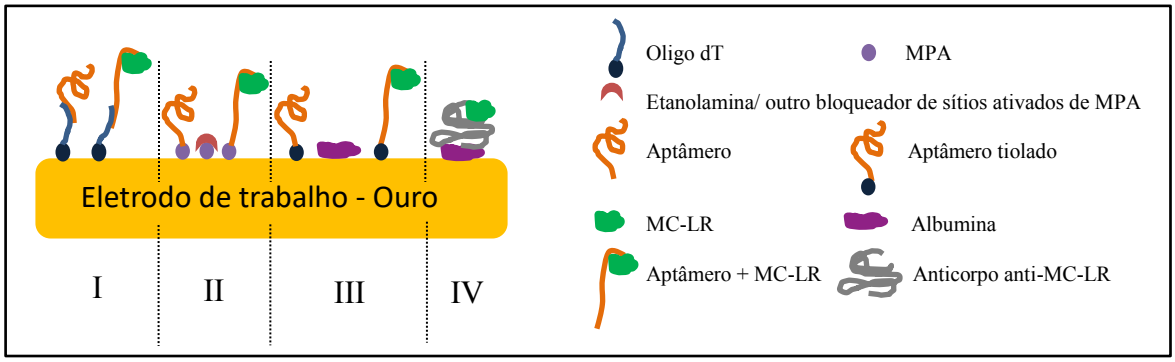


Figura 8. Diagrama esquemático das ligações de biomoléculas sobre o eletrodo de trabalho do dispositivo eletroquímico em plataforma de papel. Os tracejados indicam a separação entre formas alternativas das ligações das biomoléculas. I) ligações através da imobilização de oligonucleotídeos de timina aminados (oligos dT) e detecção por aptâmero; II) detecção por imobilização de aptâmero aminado em superfície funcionalizada com ácido mercaptopropiônico (MPA); III) detecção por aptâmero tiolado e IV) detecção por anticorpo comercial, através de imobilização do anticorpo por funcionalização da superfície por albumina.

Tabela 2. Resumo dos principais protocolos testados em microplaca com aptâmeros e revelação por fluorescência:

Teste	Objetivo	Sensibilização Aptâmero 1	Microcistina-LR	Revelação por fluorescência	Placa
1	Verificar a ligação do aptâmero à placa	AN6-02 (aminado) 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM e 1000 nM	----	C15AN6F curva: 1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 nM	Costar Corning
2	Verificar a inibição do sinal pela microcistina	AN6-02 (aminado) 500 nM	0,1; 0,5; 1 e 10 nM (0,1 a 1 ng/poço)	C15AN6F nos grupos com microcistina: 500 nM curva: 1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 nM	Costar Corning
3	Verificar a ligação do aptâmero à placa	AN6-02 (aminado) 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 M, 100 nM, 500 nM e 1000 nM	----	C15AN6F curva: 1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 nM	Nunc Immobilizer
4	Verificar a inibição do sinal pela microcistina	AN6-02 (aminado) 1000 nM	0,1; 0,5; 1 e 10 nM (0,1 a 1 ng/poço)	C15AN6F nos grupos com microcistina: 1000 nM curva: 1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 nM	Nunc Immobilizer

Nota: Detalhes dos aptâmeros e oligonucleotídeos estão descritos na Tabela 1 e Figuras 3 e 4. Os tampões e outras condições estão descritos no item 2.6 - Material e Métodos geral.

Tabela 3. Resumo dos principais ensaios eletroquímicos realizados.

Teste	Técnica	Objetivo	Funcionalização da superfície	Imobilização	Outras etapas	Microcistina-LR
preliminar	CV	Verificar a necessidade de condicionamento eletroquímico, estabilidade e concentração de tampões e sondas	----	----	----	----
1	CV	Verificar ligação do oligo dT à superfície e do aptâmero poliA (AN6A1) ao oligo dT	oligo dT – 30 µL (10 µM) Lavagens pós imobilização 0,02% de Tween 20, 0,1% SDS e tampão TE, pH 8.0	AN6A1 20-40 µL de 10 µM	Hibridização por aquecimento da solução de aptâmeros ou do eletrodo a 50ºC	----
2	CV/EIS	Verificar a ligação do aptâmero aminado e detecção da microcistina	MPA 10 mM 1,5 h – 18h	AN6-01-30 µL (10 µM) via EDC 10 mg mL^{-1}	Lavagens pós imobilização por 0,02% de Tween 20, 0,1% SDS e tampão TE, pH 8.0	10 ou 100 µg L^{-1}
3	CV/EIS	Verificar a ligação do aptâmero tiolado e detecção da microcistina	----	An6-01 – 8 µL (5 µM) a 37°C/10min	Bloqueios com Hexanetiol – diferentes tempos e concentrações	20 µg L^{-1}
4	CV	Verificar a ligação do anticorpo MC10E7, detecção da microcistina e testes de lavagens, bloqueios e duas concentrações de tampão fosfato, T1 e T2	MPA 10 mM 28 h	MC10E7 - 20 µL a 0,1 $mg.mL^{-1}$ via 2 mM de EDC/5 mM NHS-sulfa	Lavagens com tween-20 (0,1%) em PBS (PBST) e bloqueio por etanolamina 1 M/7 min	250 µg L^{-1}

Nota: CV= voltametria cíclica; EIS= espectroscopia de impedância eletroquímica. Detalhes dos aptâmeros e oligonucleotídeos estão descritos na Tabela 1 e Figuras 3 e 4. Os tampões e outras condições estão descritos no item 2.6 - Material e Métodos geral.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ENSAIOS PARA VERIFICAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES

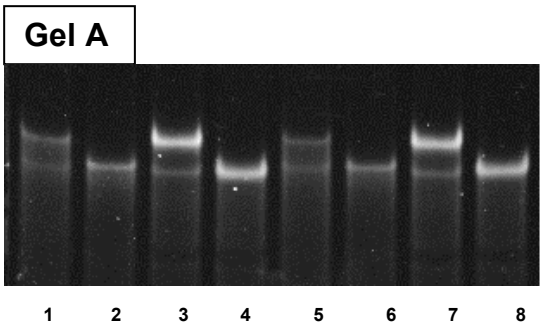
A) Teste de Desvio de Mobilidade eletroforética - EMSA:

Em relação à hibridização (ligação) do aptâmero 1 (contendo cauda poliA) ao oligo dT em gel nativo de poliacrilamida 12% foi observado que houve hibridização em todas as condições de temperatura testadas, identificadas pelo atraso da banda no gel do conjunto aptâmero+ oligo dT em relação a tais moléculas separadas (Fig. 9). Este atraso indica a formação do complexo através de seu maior peso molecular. Nos testes onde foi usado excesso de aptâmeros (Fig. 9A e B) observou-se a formação de duas bandas nos poços que continham o aptâmero e o oligo dT, sendo uma banda mais alta indicando que parte do aptâmero se ligou ao oligo dT e a outra, mais baixa, referente ao excesso de aptâmeros, conforme esperado.

Quando colocado o aptâmero 2 (marcado com FAM), o aptâmero RC6F1 não apareceu no gel (Fig. 9 – gel C) enquanto que o aptâmero RC6F2 apareceu, mas com baixo sinal (Fig. 9 – gel D). Provavelmente a fluorescência destes aptâmeros interferiu na revelação do sinal pelo corante fluorescente SYBR® Gold.

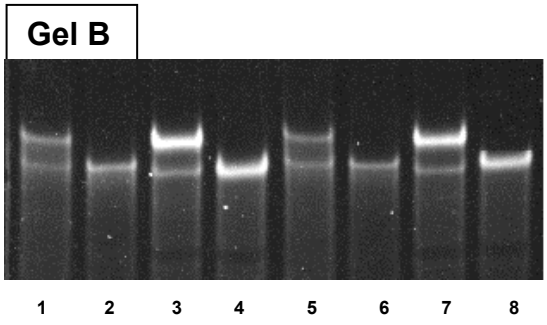
Não houve qualquer mudança nas bandas após incubação com microcistina, tanto nos testes com os aptâmeros isolados, como no conjunto aptâmero com cauda poli-A e aptâmero fluorescente. É provável que, como a microcistina tem baixo peso molecular (somente 995 Da), a resolução do gel não teria poder resolutivo o suficiente para indicar a ligação de uma molécula tão pequena. De qualquer modo, não foi observada a formação de um complexo molecular único composto pelo aptâmero 1, microcistina e aptâmero 2.

Ainda, foi observado que o aptâmero AN6A2 e RC6F2 responderam com maior fluorescência, possivelmente porque eram aptâmeros mais novos que o AN6A1 e RC6F1 (Fig. 9).



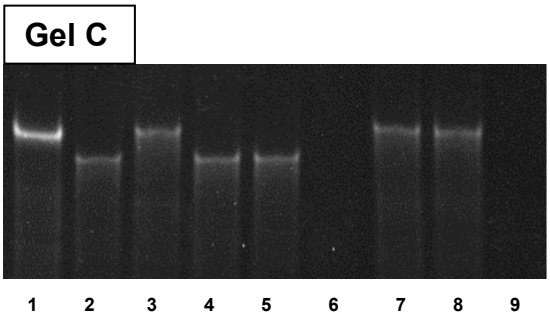
Legenda – Gel A:

1- AN6A1+ oligo dT – Condição A
2- AN6A1 – Condição A
3- AN6A2+ oligo dT – Condição A
4- AN6A2 – Condição A
5- AN6A1+ oligo dT – Condição C
6- AN6A1 – Condição C
7- AN6A2+ oligo dT – Condição C
8- AN6A2 – Condição C



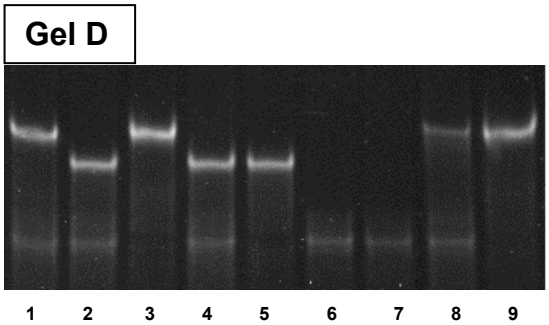
Legenda – Gel B:

1- AN6A1+ oligo dT – Condição B
2- AN6A1 – Condição B
3- AN6A2+ oligo dT – Condição B
4- AN6A2 – Condição B
5- AN6A1+ oligo dT – Condição D
6- AN6A1 – Condição D
7- AN6A2+ oligo dT – Condição D
8- AN6A2 – Condição D



Legenda – Gel C:

1- AN6A1+ oligo dT+ MC + RC6F1 – Condição A
2*- AN6A1+ MC + RC6F1
3- AN6A1+ oligo dT – Condição A
4*- AN6A1+ RC6F1
5*- AN6A1+ MC
6*- RC6F1+MC
7- AN6A1+ oligo dT+ MC + RC6F1 – Condição D
8- AN6A1+ oligo dT – Condição D
9- RC6F1+olido dT – Condição D



Legenda – Gel B:

1- AN6A2+ oligo dT+ MC + RC6F2 – Condição A
2*- AN6A2+ MC + RC6F2
3- AN6A2 oligo dT – Condição A
4*- AN6A2+ RC6F2**5***- AN6A2+ MC
6*- RC6F2+MC
7- RC6F2+oligo dT – Condição A
8 -AN6A2+ oligo dT+ MC + RC6F2 – Condição D
9- AN6A2+ oligo dT – Condição D

Figura 9. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA). Géis A e B: verificação da ligação entre 0,50 µM do aptâmero AN6A1 ou AN6A2 com 0,25 µM do oligo dT nas condições de temperatura A, B, C e D – Gel A) Condições A e C; Gel B) Condições B e D. Géis C e D: verificação de ligação em condições equimolares de 0,25 µM do aptâmero AN6A1, AN6A2, RC6F1 e RC6F2 ao oligo dT, na presença ou ausência de microcistina e nas condições de temperatura A e D – Gel C) AN6A1 e/ou RC6F1; Gel D) AN6A2 e/ou RC6F2. Corante: SYBR GOLD. As condições de temperatura estão descritas no item Material e Métodos. * - nos poços sem indicação de condição, os aptâmeros foram somente desnaturados a 90ºC por 5 min e esfriados à temperatura ambiente.

Os testes de hibridização em gel com os aptâmeros RC6A1 e RC6A2 não foram realizados porque o tipo de interação esperada entre estes e os oligos é o mesmo dos testados para o AN6A1 e AN6A2, ou seja, via pareamento da das adeninas presentes na cauda poli-A com a sequência de timinas do oligo dT.

Em resumo, por esta técnica foi possível verificar a interação do aptâmero com cauda de adeninas ao oligo dT e a não formação de um conjunto molecular único quando dois aptâmeros foram adicionados juntos à microcistina, indicando que a microcistina não conseguiu se ligar aos dois aptâmeros ao mesmo tempo. Devido ao pequeno tamanho da microcistina (995 Da) é possível que esteja ocorrendo impedimento estérico, com as regiões de ligação a um dos aptâmero sobreposta pelo outro aptâmero. Outra hipótese é que devido ao longo tempo de ensaio, a microcistina tenha se desligado dos aptâmeros.

B) Realização de testes de interação entre a microcistina e os aptâmeros em dicroísmo circular (CD):

Todos os aptâmeros testados em dicroísmo circular (CD), independente das suas construções e modificações apresentaram um pico negativo de elipsidade na região de 250 nm e um pico positivo de elipsidade na região de 275 nm (Figs. 10 e 11), elipsidade próximas às dos picos (245 nm e 276 nm) observados por Eissa et al. (2014) para o aptâmero AN6. A fluorescência dos aptâmeros ligados ao FAM interferiu no sinal apresentando grande redução na elipsidade especialmente para a região de 250 nm (dados não mostrados). Dessa forma optou-se por avaliar somente os aptâmeros não fluorescentes para evitar interpretações equivocadas.

Na presença de microcistina, os aptâmeros contendo cauda poli-A (AN6A1, AN6A2 e RC6A1) após interagirem com a microcistina por 45 min apresentaram, ainda que de forma sutil, redução na elipsidade nas regiões de 250 nm e 275 nm (Fig. 10 - A,B,C); já para o aptâmero RC6A2, houve redução mais evidente de sinal na região de 275 nm e pouquíssima variação na região de 250 nm (Fig. 10 – D). Tais variações na elipsidade da molécula são originadas pela mudança na conformação do aptâmero ao se ligar à microcistina (Eissa et al., 2014). Porém, estes autores observaram aumento na elipsidade na faixa de ambos os comprimentos de onda mencionados ao trabalhar com o aptâmero AN6 (somente a região randômica) e microcistina na concentração equimolar de 0,67 μM.

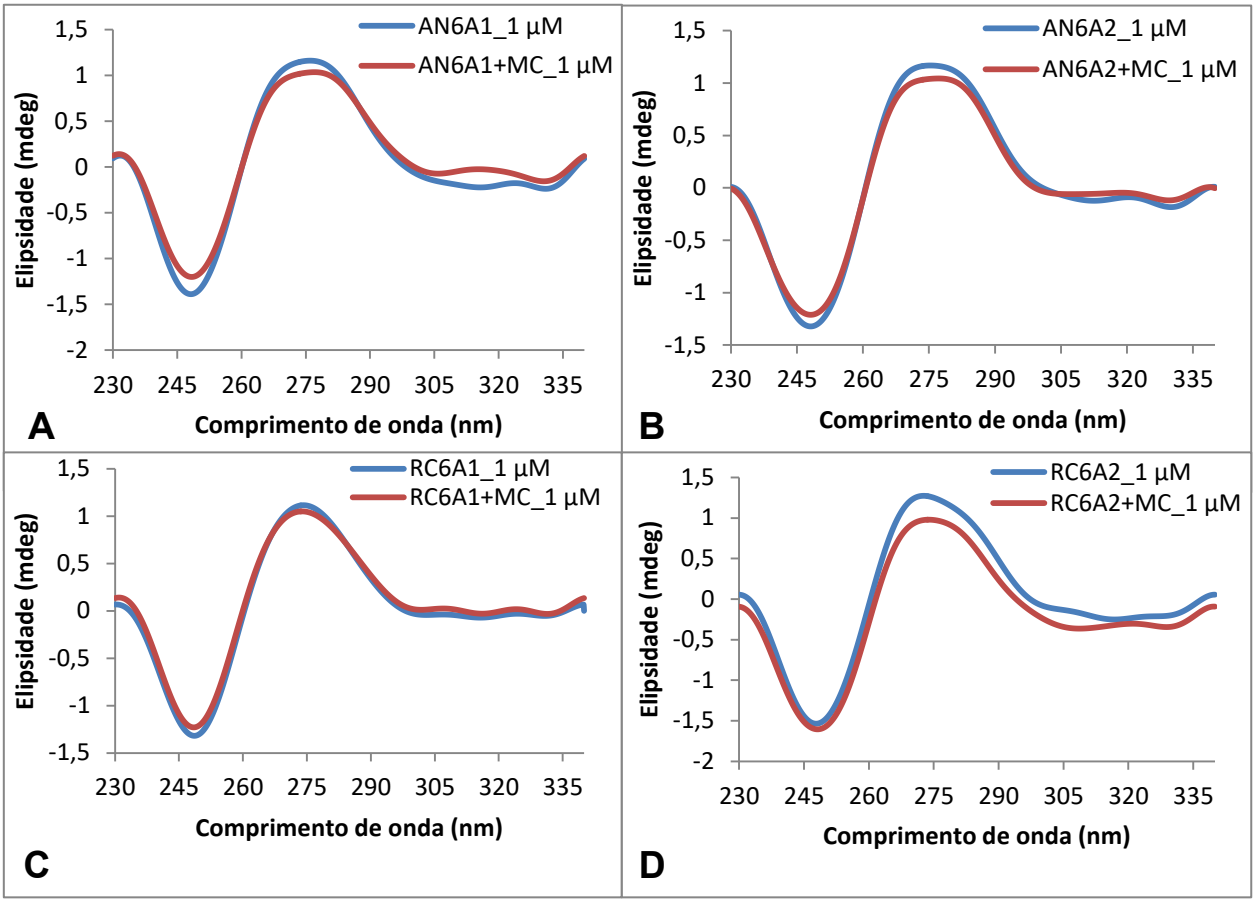


Figura 10. Elipsidade dos aptâmeros contendo cauda poli-A obtidas em dicroísmo circular antes e após incubação com microcistina por 45 min. A: Aptâmero AN6A1; B: Aptâmero AN6A2; C: RC6A1 e D: RC6A2. Todas as interações foram realizadas em concentrações equimolares de 1 µM em tampão de ligação.

Para os aptâmeros aminados AN6-01, AN6-02, AN6-03, na concentração de 0,5 µM após tempos curtos de interação (abaixo de 10 min) houve aumento na elipsidade na região de 250 nm e redução na elipsidade na região de 275 nm (Fig. 11 – A, B, C). Contudo, após 20 min, outra mudança foi observada na elipsidade destes aptâmeros, com aumento da elipsidade na região de 275 nm e redução na região de 250 nm, indicando nova conformação do aptâmero (exceto para o aptâmero AN6-01, Fig. 11A). Este resultado sugere que a ligação do AN6-01 à microcistina seja mais estável dentre os 3 aptâmeros do grupo.

Por outro lado, os aptâmeros aminados RC6-01e RC6-02 apresentaram redução de sinal na região do comprimento de onda de 250 nm e 270 nm após 3 min, mas sinal variável após 20 min. RC6-03 apresentou mesma resposta dos demais em 3 min, mas após 20 min sua elipsidade voltou à valores próximos aos do aptâmero sem microcistina, indicando que o aptâmero teria se desligado desta e voltado à conformação original (dados não mostrados).

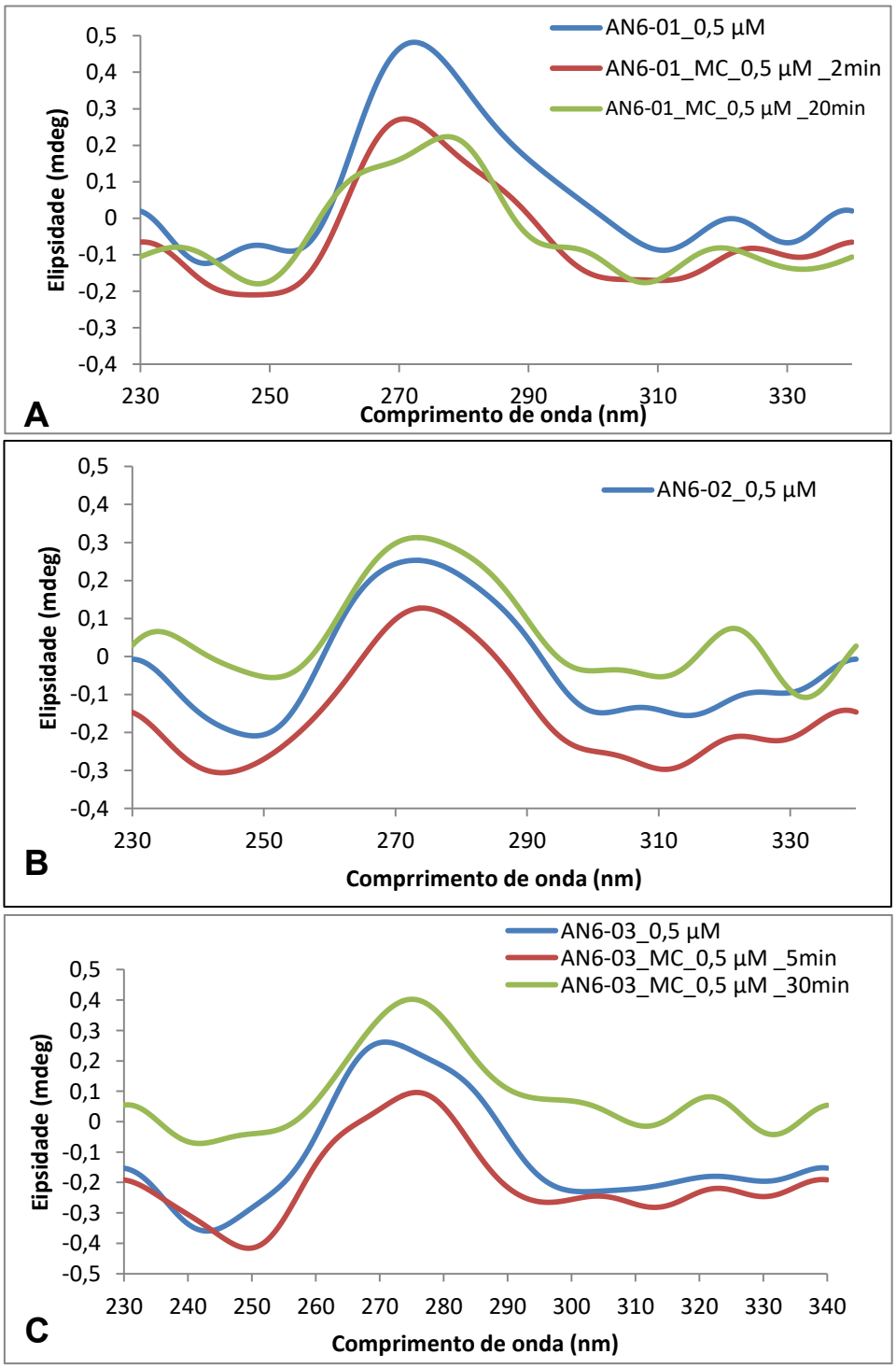


Figura 11. Elipsidade dos aptâmeros AN6 aminados em dicroísmo circular antes e após incubação com microcistina por tempos inferiores a 5 min e após 20 min de interação. A: Aptâmero AN6-01; B: Aptâmero AN6-02; C: AN6-03. Todas as interações foram realizadas em concentrações equimolares de 0,5 µM em tampão de ligação.

Além disso, foi observado que o sinal encontrado está muito abaixo – cerca de 20x - do observado por Eissa et al. (2014), que utilizaram concentrações equimolares de 0,67 µM para o aptâmero AN6 (sem modificação) e microcistina e cubeta de 1 cm. Neste trabalho,

foram realizados principalmente experimentos com concentrações equimolares de aptâmeros e microcistinas de 0,5 ou 1 μM, e cubeta de 0,1 cm. Assim, acredita-se que a quantidade de moléculas presentes na cubeta de caminho óptico de 0,1 cm possa ser muito pequena e por isso, o sinal observado foi reduzido se comparado ao trabalho de Eissa et al. (2014).

Em resumo, os ensaios em CD sugerem que o aptâmero de maior interação molecular e maior estabilidade de ligação à microcistina foi o aptâmero aminado AN6-01. Para comprovar este resultado, foi realizado o teste de ressonância plasmônica de superfícies.

C) Testes em ressonância plasmônica de superfície (SPR) com aptâmeros:

Neste ensaio, o sinal do aptâmero imobilizado no chip não estava sendo detectado e por isso, várias tentativas foram realizadas. Por fim, foi observado que a partir de 250 μM de microcistina houve um ligeiro aumento no sinal no chip, o que poderia indicar a ligação do aptâmero à microcistina. Porém, após a leitura do branco para esta condição (tampão contendo 2,5% de metanol), mesmo sinal foi observado, indicando que o aumento de sinal não se devia à ligação da microcistina ao aptâmero, mas sim, à interferência do metanol (dados não mostrados).

Em resumo, o ensaio não indicou a ligação do aptâmero de forma inequívoca ao chip e à microcistina. Como a presença do metanol afetou o resultado, os ensaios de detecção foram realizados com microcistina proveniente do extrato algal de *Microcystis aeruginosa* ou de microcistina-LR padrão, ambas diluídas em água e, posteriormente, em tampão. Com a falta de comprovação de quais aptâmeros eram mais reativos à microcistina, optou-se por utilizar preferencialmente o aptâmero AN6-01, considerando o resultado do CD.

3.2 ENSAIOS PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS

A) Testes ALISA e outros formatos em microplacas:

Os 4 testes preliminares (Tabela 2) para verificação se 1) o aptâmero estaria sensibilizando a placa e 2) a intensidade de fluorescência gerada seria suficiente para apresentar um teste discriminativo do nível de microcistinas, não apresentaram bons resultados. Foram testadas várias concentrações de aptâmero AN6-02 (até 1000 nM por poço) e os resultados tanto da placa Costar Corning DNA Bind™ como da placa NUNC Immobilizer™ apresentaram ligação do aptâmero. Porém, a intensidade máxima de

fluorescência atingida nos controles positivos (aptâmero+oligo complementar ao aptâmero, marcado com FAM, C15AN6F) foi baixa em ambas as placas e, portanto, sem poder discriminativo para a detecção de microcistinas. Neste sentido, somente a placa Corning apresentou redução da intensidade de fluorescência após a colocação da microcistina (0,1 a 10 nM), mas sem discriminar seus níveis (Fig. 12).

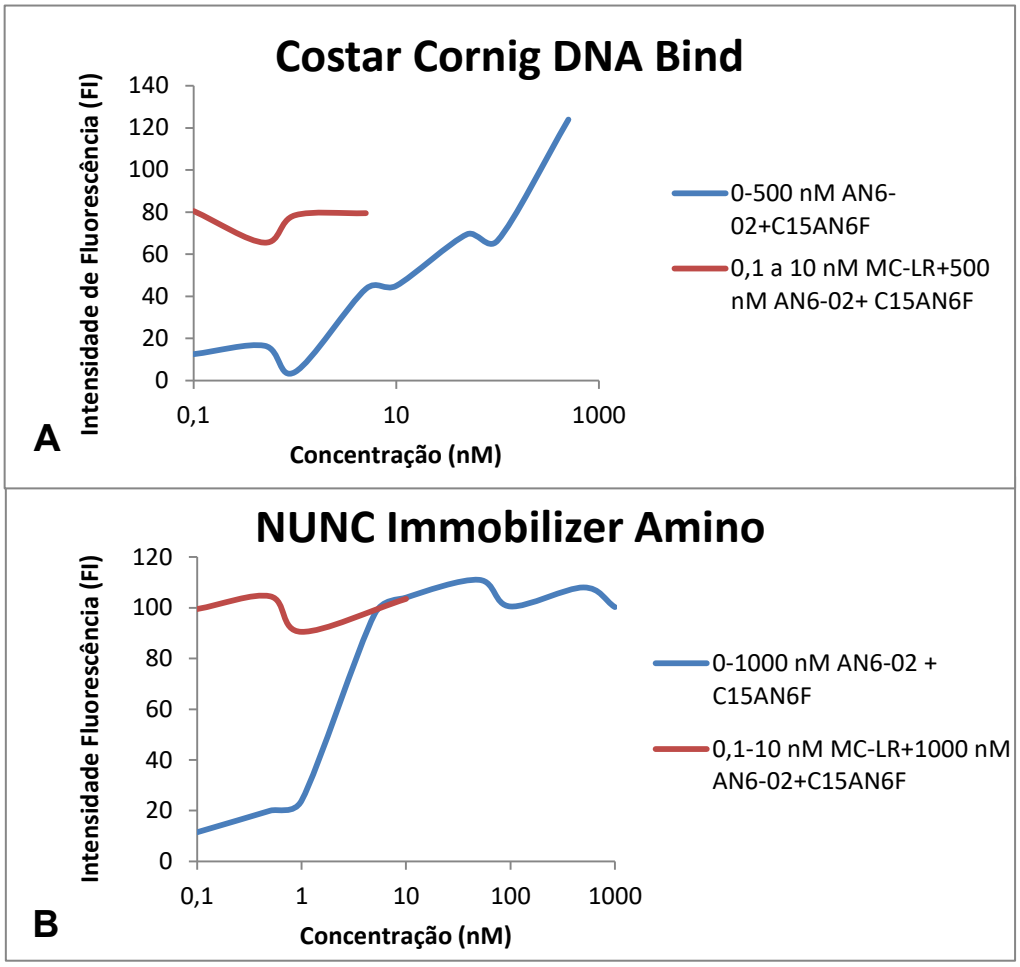


Figura 12. Avaliação das placas Costar Corning DNA Bind e Nunc Immobilizer Amino para revelação por fluorescência. A: Aptâmero AN6-02 e C15AN6F em concentrações equimolares de 0-500 nM – em azul e em vermelho: após a adição de MC-LR (0,1-10 nM) a 500 nM AN6-02 +C15AN6F na placa Corning; B: mesmos grupos de A, porém, com 0-1000 nM de aptâmero e oligo-FAM – em azul e em vermelho: após a adição de MC-LR (0,1-10 nM) a 1000 nM AN6-02 +C15AN6F na placa Nunc.

Outros testes neste mesmo formato foram realizados com outros aptâmeros aminados, inclusive com concentrações destes de até 2000 nM e com tempos maiores de incubação com o oligo-FAM (de até 1 h), porém não houve melhora no sinal gerado (dados não-mostrados).

Nos testes realizados no formato ALISA, AAIA, ambos no formato sanduíche e no competitivo direto não foram observadas respostas evidentes de fluorescência ou de resposta enzimática pela revelação da fosfatase alcalina ou da peroxidase (dados não mostrados). Isto

provavelmente se deve à presença de poucos epítopos na microcistina e à impedimento estérico para a realização de ensaios em formato sanduíche (Xiang et al., 2014). Além disso, a revelação por aptâmero (caso do ALISA e do competitivo direto) como já mencionada nos testes preliminares, não mostrou intensidade de fluorescência adequada para dados discriminativos.

Assim, pelos dados obtidos, concluiu-se que tais formatos não foram adequados para a detecção de microcistinas. Até o momento, somente um ensaio sanduíche entre o aptâmero e o anticorpo anti-MC-LR (MC8C10) foi realizado com sucesso (Xiang et al., 2014), porém, com detecção por quimioluminescência catalisada por HRP em capilares de vidro.

B) Testes eletroquímicos:

B.1 Teste preliminar - Condicionamento e concentrações de tampões:

Nos testes de condicionamento do eletrodo, observou-se que o condicionamento em 10 ciclos de voltametria cíclica favoreceu a estabilização do sinal. Inicialmente, os eletrodos foram condicionados por 5 ciclos. Em seguida, foram condicionados por mais 5 ciclos e ambos os grupos de sinais foram comparados. Houve aumento da corrente de pico e estabilização da mesma durante a segunda etapa de ciclagem (Fig. 13A). Após este segundo condicionamento, os eletrodos permaneceram secos por até 4 dias, quando foram testados novamente e apresentaram exatamente o mesmo sinal, indicando alta estabilidade. Este padrão de resultado se repetiu para 4 de 5 eletrodos testados.

Nestes mesmos eletrodos, foram testados tampões com concentrações diferentes de sais após os 4 dias que permaneceram secos. Verificou-se que os tampões não afetaram a variação de potencial de pico (ΔEp) (Fig. 13B). Assim, ficou evidente que, havendo necessidade de se utilizar tampões para se trabalhar com proteínas, é possível diluir o ferri/ferro e KCl em tampões fosfato de diferentes concentrações, sem comprometer os resultados.

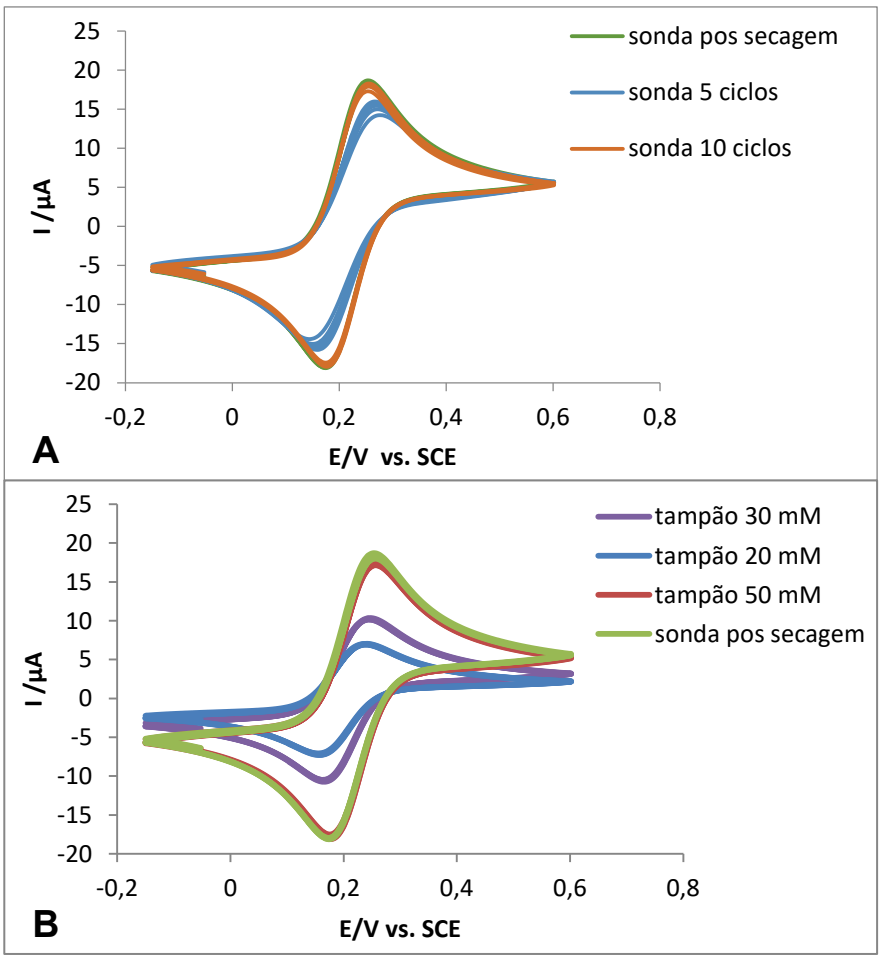


Figura 13. Dispositivo 4 - A) leituras em voltametria cíclica em sonda 5mM ferri/ferro com 0,5 M KCl. Após 1 varredura (5 ciclos) – em azul; após 2 varreduras (10 ciclos) - em laranja; sonda pós 4 dias de secagem – em verde. B) após 4 dias, leituras realizadas em sonda (mesma acima), em verde; em tampão fosfato 20 mM pH 7.4 com 2 mM ferri/ferro com 0,2 M KCl (tampão 20 mM em azul claro); em tampão fosfato 30 mM pH 7.4 com 3 mM ferri/ferro com 0,3 M KCl (tampão 30 mM em roxo); em tampão fosfato 50 mM pH 7.4 com 5 mM ferri/ferro com 0,5 M KCl (tampão 50 mM em azul claro).

B.2 Construção do biossensor eletroquimico:

Teste 1: Imobilização do oligonucletídeo dT aminado sobre os eletrodos: o oligo dT aminado foi imobilizado sobre o eletrodo pós funcionalização com MPA e utilização de EDC, conforme adaptação do protocolo de Angeloni et al. (2013). Porém, para garantir a ligação posterior do oligo dT com o aptâmero (via pareamento de bases), seria necessário um aquecimento do dispositivo, já que a ligação entre bases ocorre em temperaturas mais elevadas (acima de 30 graus, dependendo do número e proporções de nucleotídeos envolvidos). Pelo resultado obtido, o oligo dT se ligou ao eletrodo, dificultando a transferência de elétrons entre a sonda e a superfície do eletrodo de trabalho. Esse efeito pode ser qualitativamente atribuído devido ao aumento da ΔEp (Fig. 14). Este resultado de redução na corrente faradáica (conforme esperado) e aumento da ΔEp foi mais evidente após a incubação com a solução de aptâmero aquecido sobre o oligo dT, ou ainda, quando o conjunto (eletrodo+oligo+aptâmero) foi aquecido sobre uma chapa a 50 °C (Fig. 14 – em vermelho e

roxo, respectivamente). Neste último caso, também foi observado escurecimento da superfície do eletrodo. Sendo assim, o escurecimento da superfície do eletrodo está relacioando à uma degradação do eletrodo de trabalho e não devido a imobilização efetiva da molécula. Devido a esse escurecimento e para evitar aquecimentos que poderiam levar a aumentos na corrente capacitiva, e ainda, para reduzir uma etapa para a imobilização do aptâmero, optou-se por utilizar diretamente aptâmeros aminados sobre o eletrodo nos próximos testes.

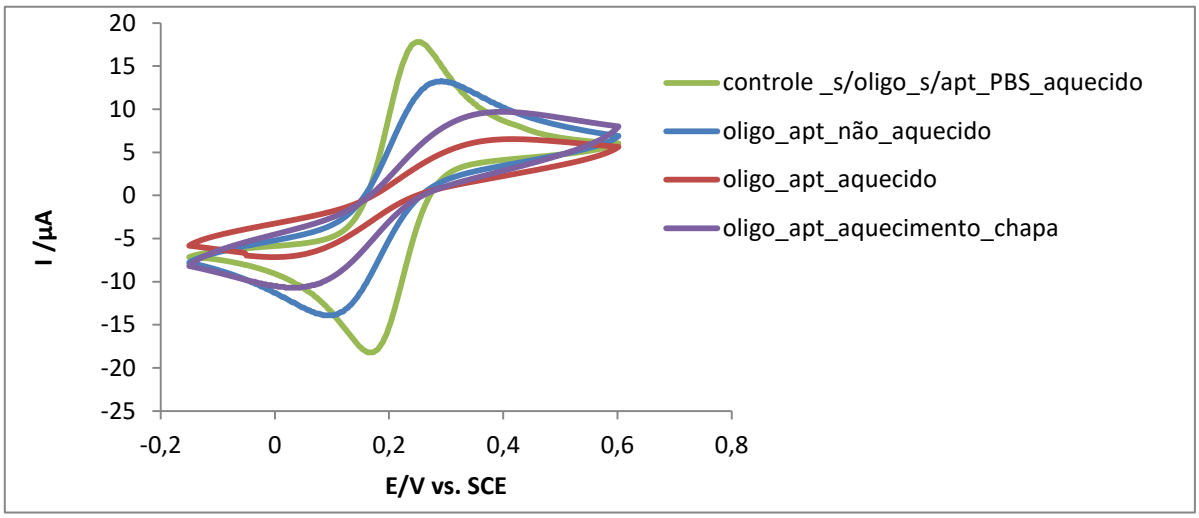


Figura 14. Influência da imobilização das moléculas e aquecimento dos eletrodos ou aptâmeros. Em verde: eletrodo controle, sem oligo dT, sem aptâmero (apt) e com tampão PBS aquecido; em azul: eletrodo com oligo, aptâmero sem processo de aquecimento; em vermelho: eletrodo com oligo e aptâmero aquecido; em roxo: eletrodo com oligo e aptâmero aquecidos sobre chapa quente a 50º C. E: Potencial elétrico aplicado; I: corrente elétrica gerada no sistema; SCE: eletrodo Calomelano (eletrodo de referência).

Teste 2 - Imobilização do aptâmero aminado sobre os eletrodos: o resultado de ligação de AN6-01 e RC6-01 pós etapas de modificação com o MPA apresentou o mesmo perfil do ensaio com o oligo dT no ensaio de CV, porém, não apresentou responsividade à 10 µg L^{-1} de microcistina ver concentração (dados não mostrados).

Em EIS foi observado redução da impedância após a colocação de 5 µM do aptâmero RC6-01, indicando a modificação da superfície do eletrodo pela ligação do aptâmero. Porém, após a incubação com 10 µg L^{-1} de microcistina por 30 min não houve alteração do sinal, indicando a não ligação da microcistina (Fig. 15
). Embora o aptâmero RC6-01 tenha mostrado resultados de menor interação no ensaio de CD, há relatos de seu uso com sucesso em dispositivos (Xiang et al., 2014). Assim, acredita-se que o aptâmero não se ligou à microcistina por estar interagindo de forma inespecífica com o ouro do eletrodo, como observado por Ng et al., 2012. Possivelmente os bloqueios e remoção de ligações inespecíficas realizados aqui (1 M etanolamina e 100 mM de ácido fosfórico) não foram eficientes.

Estes mesmos eletrodos foram avaliados quanto à secagem total da gota de água da última lavagem após a realização das leituras supra-citadas. Em todos os casos foi observado um grande aumento de impedância após a secagem completa, indicando que para o ensaio de impedância neste dispositivo é necessário manter a região do eletrodo de trabalho umedecida para garantia de sua estabilidade durante as leituras (Fig. 15).

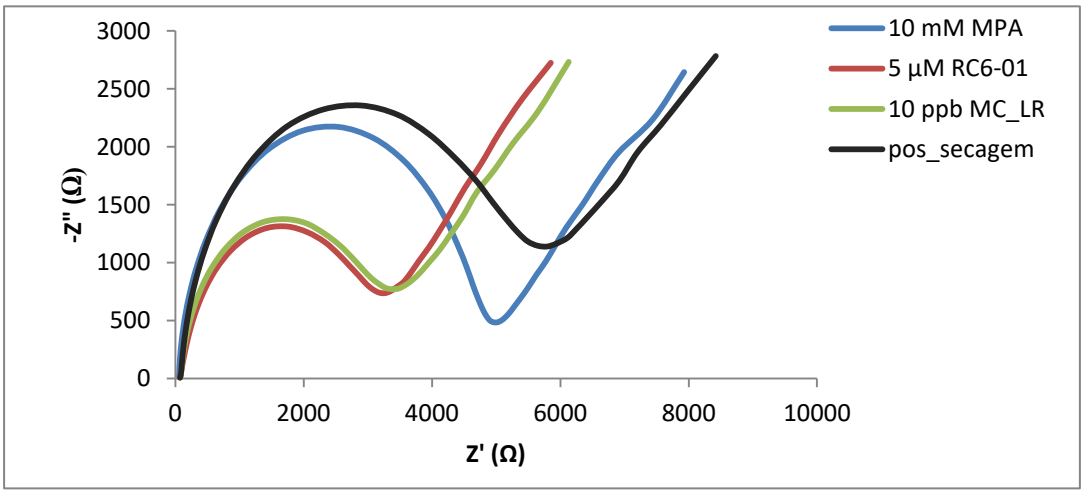


Figura 15. Diagrama de Nyquist (gráfico Z" vs. Z') para o dispositivo 2. Em azul: após MPA por 1,5 h; em vermelho: 5µM do aptâmero RC6-01 por 40 min; em verde: após microcistina em tampão TL por 30 min (10 µM ou ppb); em preto: nova leitura após a secagem do eletrodo. A sonda redox utilizada foi ferri/ferro 5 mM em 0,5 M KCl. Cada medida foi obtida em potencial aplicado. Z'(Ω): componente real da impedância; -Z"(Ω): componente imaginária da impedância.

Teste 3 – Imobilização do aptâmero tiolado e detecção da microcistina:

Neste experimento, testou-se a ligação do aptâmero tiolado AN6-SS e RC6-SS diretamente sobre o eletrodo de ouro. Houve grande aumento do sinal de impedância, mostrando a interação do aptâmero com o ouro, porém, na presença da microcistina, o resultado não se mostrou inequívoco.

Acreditando-se que tal inespecificidade se devesse à interação do corpo do aptâmero com o ouro da superfície do eletrodo dificultando a sua interação com a microcistina (como citado por Ng et al., 2012), vários testes de bloqueio foram realizados. Para tal, utilizou-se 1-hexanetiol ou albumina, porém, sem sucesso. A Figura 16 mostra que no caso do bloqueio com 0,1% de albumina (BSA) após 30 min, o sinal de impedância aumentou, indicando o bloqueio da superfície. Contudo, ao se incubar com o tampão de ligação TL por 40 min, houve redução de impedância. Provavelmente, o tampão de ligação, que deveria favorecer a ligação da microcistina com o aptâmero, removeu parte do BSA da superfície do eletrodo. Ao se colocar 10 μgL^{-1} de MC-LR, não houve alteração do sinal (Fig. 16). Com este resultado,

acredita-se que os bloqueios não tenham sido eficientes ou que o aquecimento do dispositivo a 37 °C para a imobilização do aptâmero pode ter afetado a estabilidade deste dispositivo.

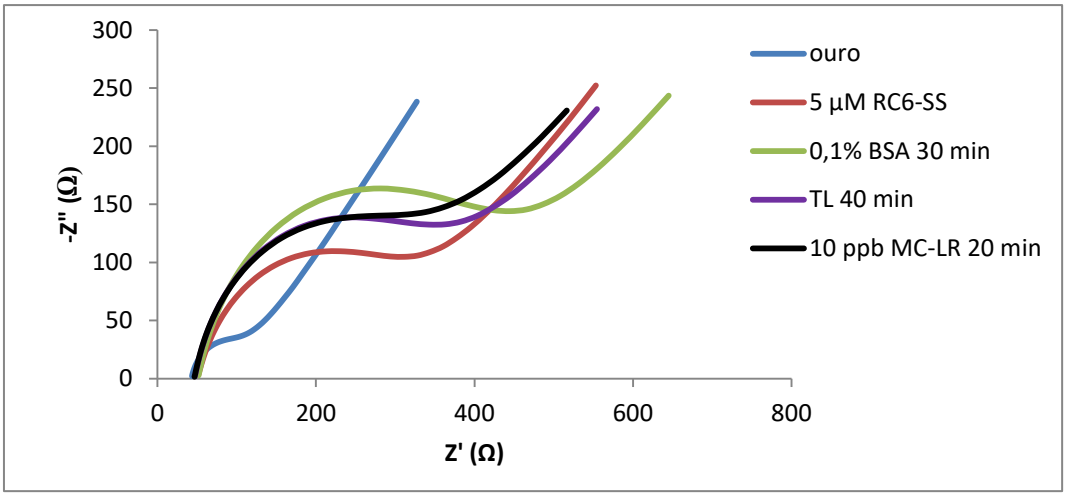


Figura 16. Diagrama de Nyquist (gráfico Z" vs. Z') para o dispositivo 3. Em azul: antes da modificação do eletrodo; em vermelho: após 5 µM aptâmero RC6 tiolado por 40 min; em verde: após o bloqueio com BSA (0,1%) por 30 min; em roxo: tampão de ligação incubado por 40 min; em preto: 10 µM (ppb) em tampão TL por 20 min. A sonda redox utilizada foi ferri/ferro 5 mM em 0,5 M KCl. Cada medida foi obtida em potencial aplicado. Z'(Ω): componente real da impedância; -Z"(Ω): componente imaginária da impedância.

Teste 4 - Imobilização do anticorpo e detecção da microcistina:

Neste experimento com anticorpos, além da ligação do anticorpo MC10E7 e da detecção da microcistina, também foram testadas lavagens com PBST e bloqueios com etanolamina, assim como, dois tampões diferentes para as medições. Estes teste foi realizado em continuidade aos testes de condicionamento e concentrações de tampões descritos em B.1., nos mesmos dispositivos.

Como resultado em voltametria cíclica, a presença do anticorpo causou aumento de sinal de corrente elétrica comparativamente ao sinal do ácido mercaptopropiônico (MPA) – Fig. 17 A – em azul e verde, respectivamente. Embora o anticorpo seja uma molécula grande – e, portanto, que poderia dificultar a transferências de elétrons entre a sonda e a superfície do eletrodo, com consequente redução da corrente de pico e aumento da separação de picos, provavelmente este anticorpo apresente muitas cargas positivas, facilitando assim, a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e a sonda negativa de ferri/ferro. Além disso, uma diminuição da Ep é um indicativo dessa interação eletrostática, porém, experimentos adicionais seriam necessários para confirmar essa hipótese.

Dentre as condições de bloqueio com etanolamina e lavagens com PBST (PBS-tween 20), foi observado redução na corrente de pico após o uso do PBST - Fig. 17 A- em roxo. O

tween 20, como agente surfactante, tem a capacidade de reduzir interações eletrostáticas e apolares. Em anticorpos, a presença de Tween 20 é importante para remoção de moléculas ligadas de forma inespecífica, permitindo a ocorrência de sua forma nativa e favorecendo a sua ligação com o antígeno ou molécula-alvo (Johnson, 2018). Estas lavagens com PBST parecem ter contribuído para a detecção da microcistina, pois somente nos eletrodos que receberam PBST, mas não etanolamina, houve mudança de sinal após a colocação da microcistina (Fig. 17 A- em vermelho). A etanolamina, por sua vez, é um reagente bastante utilizado em imunossensores (Zheng et al., 2011) e tem como característica o bloqueio de grupos carboxílico sobressalentes, ativados pelo EDC e não ocupados.

Na Figura 17B são representadas as mesmas medidas de 17A, porém, com um tampão e sonda eletroquímica com o dobro da concentração (tampão fosfato 20 mM, pH 7.4, 2 mM de ferri/ferro e 0,2 M KCl) foi mais adequado que o tampão com metade das concentrações destes sais, pois apresentou valores mais altos de corrente - na presença da microcistina, a variação na corrente foi cerca de 2 μA em relação à medida anterior. Níveis mais altos de corrente para análise de voltametria cíclica são desejáveis, pois aumentam os níveis de corrente, o que poderia favorecer a discriminação de concentrações diferentes da molécula-alvo. Entretanto, a concentração muito alta da sonda redox poderia mascarar uma pequena atenuação no sinal causada pela molécula-alvo. Desta forma, ainda é necessário um estudo de concentração da sonda, de forma a melhorar a resolução do sinal sem comprometer a detecção.

Além disso, é necessária a realização de testes com anticorpos ou antígenos (molécula-alvo) inespecíficos para avaliar se a redução da corrente observada neste teste foi devida mesmo à ligação da microcistina ao anticorpo. Estes ensaios não puderam ser repetidos, pois os eletrodos apresentaram comportamento anômalo na sequência, com falta de estabilidade já nas etapas de condicionamento.

B.5) Outras moléculas e outros formatos:

Alterações dos principais protocolos descritos também foram testadas: variação de tempo de incubação com MPA, concentração de anticorpos, diferentes aptâmeros, tempos de incubação, concentrações de microcistina e ainda, alteração na molécula de funcionalização da superfície do dispositivo - hidrocloreto de dopamina, albumina, ou ácido mercaptossuccínico. Todas estas tentativas não mostraram promissoras para a detecção da microcistina (dados não mostrados).

Outro formato de ensaio também foi realizado, a fim de reduzir o tempo com modificações da superfície do eletrodo de trabalho. Assim, aptâmeros foram conjugados à microesferas magnéticas ("beads" magnéticas) segundo protocolo padrão para ligação descrito por Ávila et al. (2013), com modificações. Tais beads foram presas ao eletrodo de trabalho através de um pequeno ímã de neodímio para as medições. Porém, neste caso, qualquer movimentação das microesferas sobre os eletrodos gerava um deslocamento dos sinais de impedância. Devido a esta falta de estabilidade do sinal, esta técnica foi considerada inadequada, sendo que o ensaio neste formato necessitaria de aprimoramento (dados não mostrados).

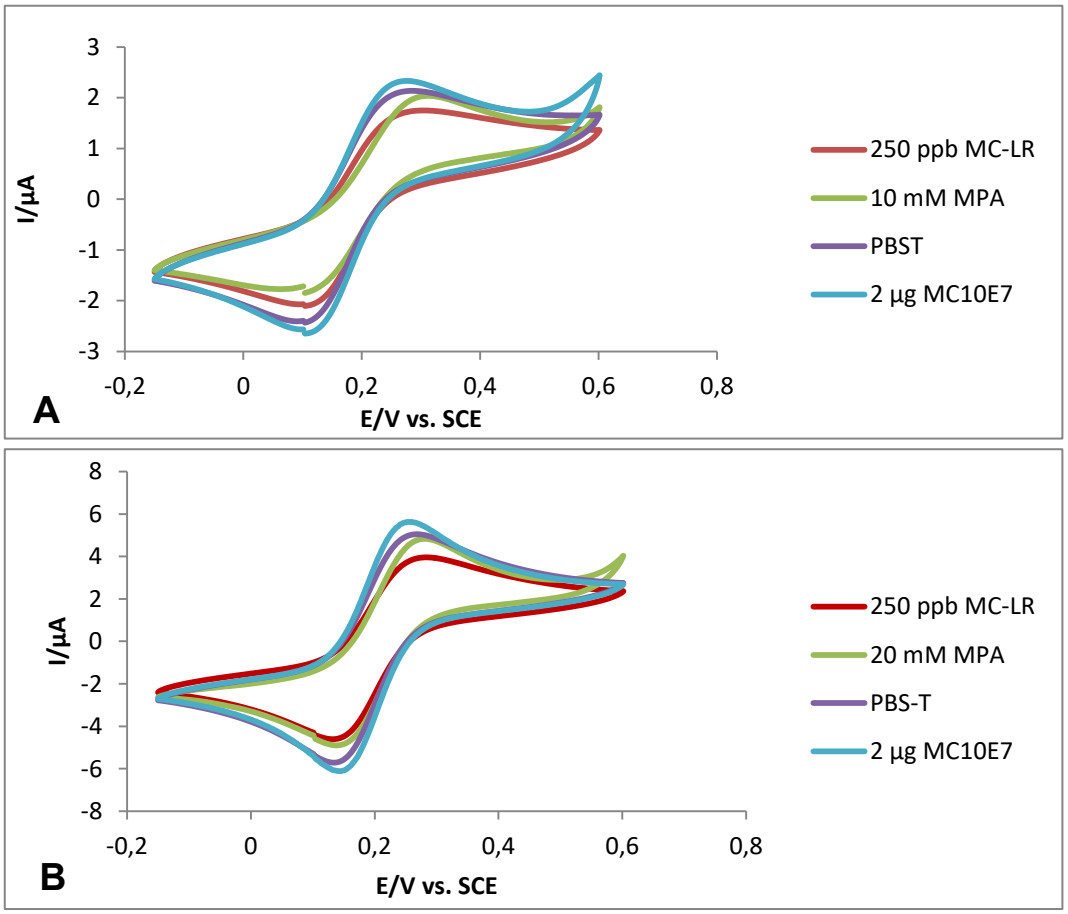


Figura 17. Dispositivo 4 - A) leituras em voltametria cíclica em tampão 10 mM fosfato, 1 mM ferri/ferro e 0,1 M KCl: em verde: após 10 mM MPA; em azul: após 2 µg do anticorpo MC10E7; em roxo: PBST; em vermelho: 250 µg L^{-1} de MC-LR. B) leituras em voltametria cíclica em tampão 20 mM fosfato, 2 mM ferri/ferro e 0,2 M KCl: em verde: após 10 mM MPA; em azul: após 2 µg do anticorpo MC10E7; em roxo: PBST; em vermelho: 250 µg.L^{-1} de MC-LR.

Por fim, o grupo do Laboratório de Dispositivos e Sistemas Funcionais – LNNANO – CNPEM, que desenvolveu o dispositivo, refez alguns dos experimentos descritos aqui com os eletrodos. Este grupo investigou cada etapa de ligações sobre os eletrodos por outras técnicas, como microscopia confocal e XPS (espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X). Por

esta última técnica foi observado que não estava ocorrendo a ligação do enxofre presente no ácido mercaptopropiônico (MPA) ao ouro. O pH da solução foi então modificado para 2,0 para que o grupo carboxílico do MPA ficasse protonado, o que permitiria que o enxofre se ligasse ao ouro e formasse a monocamada (SAM), de acordo com o boletim técnico da Sigma Aldrich (2018). A partir deste ponto, foi verificada a presença do enxofre na técnica de XPS e também através de experimentos eletroquímicos, como dessorção redutiva utilizando KOH e em experimentos de voltametria cíclica com sonda positiva (complexo cloreto de hexaminorutênio (III), $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$), que fornece um sinal característico ao se ligar ao ácido carboxílico.

Porém, após a funcionalização com o MPA em pH 2.0 foi observada a presença de alguns pontos enegrecidos sobre o eletrodo e, ao se observar em lupa e microscopia confocal, foi verificada a ocorrência de delaminação do eletrodo. Assim, os dispositivos foram reavaliados em relação à sua construção e, para evitar a delaminação, foi depositada uma camada de titânio de 50 nm entre as camadas de papel sulfite e de ouro, e uma nova etapa de recozimento do ouro/titânio foi realizada. Em relação a essa etapa, houve ainda necessidade de otimização de tempo e temperatura, para que a cera de impermeabilização do papel não comprometesse a camada de ouro. Dessa forma, o problema da delaminação foi resolvido.

Atualmente, novos testes estão sendo realizados, tanto com aptâmeros tiolados, como com rotas de funcionalização por MPA. Para confirmar cada ligação, além de medidas em voltametria cíclica e por EIS, técnicas de dessorção e XPS também estão sendo utilizadas. Até o momento, foi possível verificar a ligação do aptâmero AN6 tiolado ao eletrodo e a redução do sinal de impedância eletroquímica na presença de 20 $\mu g\ L^{-1}$ de microcistina (Fig. 18). Esta redução de impedância poderia indicar que a microcistina se ligou ao aptâmero, pois ao mudar de conformação para se ligar à microcistina, o aptâmero poderia se sobrepor menos ao eletrodo de trabalho, permitindo maior transferência de elétrons com a sonda eletroquímica.

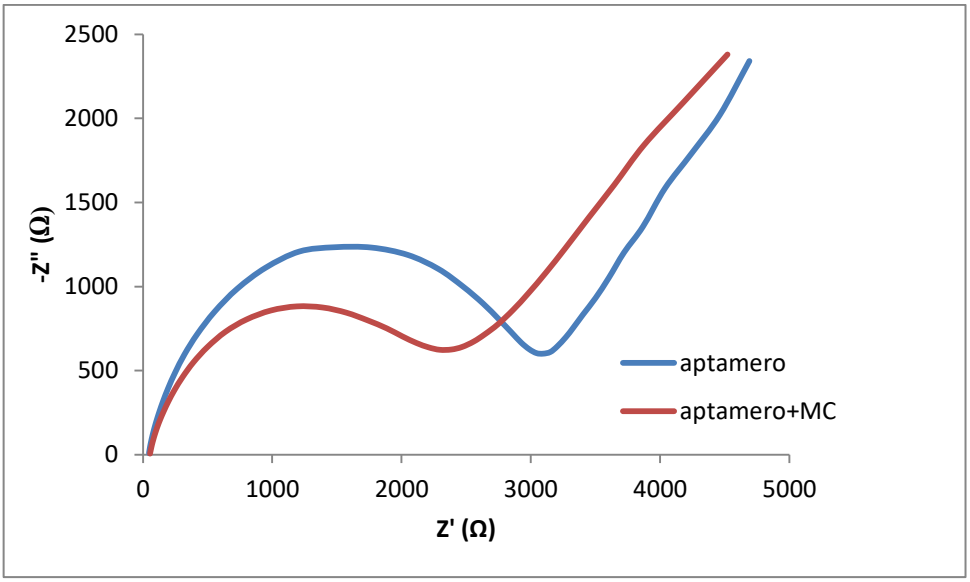


Figura 18. Diagrama de Nyquist (gráfico Z'' vs. Z') para o dispositivo 2. Em vermelho: aptâmero 5 µM de AN6 tiolado; em azul: após 20 µg.L^{-} de MC-LR por 30 min. A sonda redox utilizada foi ferri/ferro 5 mM em 0,5 M KCl. Cada medida foi obtida em potencial aplicado.

Contudo, há necessidade de mais testes para confirmar os resultados, elaborar os circuitos-equivalentes dos ensaios de impedância e realizar estudos para estabelecer os limites de detecção, quantificação, assim como, realizar os processos de validação.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível avaliar o funcionamento de alguns aptâmeros desenvolvidos para a microcistina (por Ng et al., 2012), sua aplicabilidade em ensaios em microplacas e em dispositivos de ouro desenvolvidos em plataforma de papel sulfite. Os resultados indicaram quais aptâmeros, após algumas modificações para a sua ligação em outras moléculas, seriam os mais interativos com a microcistina e confirmaram que poderiam ser imobilizados via a utilização de oligonucleotídeos com regiões complementares. Por outro lado, os testes de detecção em microplacas mostraram que a revelação por aptâmeros fluorescentes ou por testes tipo sanduíche não foram adequados para um hapteno como a microcistina. Em relação aos dispositivos construídos na plataforma de papel, foram observados alguns sinais indicativos de funcionamento, porém, sem sensibilidade e seletividade. Após uma alteração no dispositivo e ajustes no protocolo pelo CNPEM, fabricante do dispositivo, foi possível observar detecção da microcistina em 20 µg L^{-1}. Entretanto, há necessidade de mais testes para confirmar os resultados, verificar os limites de detecção, quantificação e realizar os processos de validação.

Como perspectivas futuras, espera-se continuar a colaboração com o grupo do Laboratório de Sistemas e Dispositivos Funcionais do CNPEM para a conclusão do desenvolvimento do biossensor para a microcistina.

O funcionamento completo deste biossensor poderá preencher os critérios almejados para um sistema de detecção de microcistinas: alta sensibilidade - devido às técnicas eletroquímicas, alta seletividade - devido ao reconhecimento molecular da microcistina pelo aptâmero, baixo custo e reciclável – por ser construído sobre papel, simples e de rápida análise após a montagem do sistema e com possibilidade de ser miniaturizado e utilizado em análises em campo, dependendo da técnica eletroquímica empregada.

Referências

Aleixo, L.M., 2003. Voltametria: Conceitos e Técnicas. Disponível em: <http://usuarios.upf.br/~gobbi/CADA%20UMA%20DAS%20DISCIPLINAS/QUIMICA%20ANALITICA%20INSTRUMENTAL/voltametria-vf.pdf>. Acesso: abri/2018.

Angeloni, S., Cordes, R., Dunbar, S., Garcia, C., Gibson, G., Martin,C., Stone, V. xMAP® Cookbook: A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. **Luminex xMAP® Technology**, 1st Ed.,116 pp., 2013.

Ávila, B.E.-F., Escamilla-Gómez,V., Campuzano, S.Pedrero, M., Pingarrón, J.M., 2013. Disposable amperometric magnetoimmunosensor for the sensitive detection of the cardiac biomarker amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide in human sérum. **Analytica Chimica Acta,** v. 784, p. 18– 24.

Belenger, V., Martinez-Capel, F., Masiá, A., Picó, Y., 2014. Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (Eastern Spain). **J. Hazard. Mater,** v. 265, p. 271– 279.

Brasil. Portaria nº 2914/MS de 11 de dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. 14 dez. 2012.

Citartan, M.; Gopinathb, S.C.B.; Tominagab, J.; Tanc, S-C.;Tanga, T-H., 2012. Assays for aptamer-based platforms. **Biosens Bioelectron,** v. 34,p.1– 11.

Damos, F.S., Mendes, R.K., Kubota, L.T, 2010. Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors. **Quim. Nova,** v. 27, p. 970-979.

Eissa, S., Ng, A., Siaj, M., Zourob, M. , 2014. Label-Free Voltammetric Aptasensor for the Sensitive Detection of Microcystin-LR Using graphene-Modified Electrodes. **Anal. Chem,** v. 86, p. 7551-7557.

Eissa, S.; Zourob, M. , 2017. Aptamer- Based Label-Free Electrochemical Biosensor Array for the Detection of Total and Glycated Hemoglobin in Human Whole Blood. **Scientific Reports** 7, art. n° 1016. DOI:10.1038/s41598-017-01226-0. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41598-017-01226-0.pdf. Acesso: jan/2018.

Freire, R.S., Pessoa, C.A., Kubota, L.T., 2003. Revisão. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. Quim. Nova, v. 26, p. 381-389. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000300016.

Gibbs, J. ELISA Technical Bulletin No. 1: Immobilization Principles: Selecting the Surface. **Corning Life Sciences Technical Library.** 8 pp., 2001.

Homann, M., Göringer, H.U., 1999. Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. **Nucleic Acids Res,** v. 27, n. 9, p. 2006-2014.

Joshi, R., Janagama, H., Dwivedi, H.P., Senthil Kumar,T.M.A., Jaykus, L.A., Schefers, J., Sreevatsan, S., 2009. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica serovars*. **Mol Cell Probe,** v. 23, p. 20–28.

Johnson, M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. Labome- Synatom Research. Princeton, New Jersey. Disponível em: <https://www.labome.com/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.htmL>. Acesso: jan/2018.

Lin; Z.; Huang, H. Xu, Y.; Gao,X.; Qiu, B; Chen, X.; Chen, G., 2013. Determination of microcystin-LR in water by a label-free aptamer based electrochemical impedance biosensor. **Talanta,** v. 103, p. 371–374.

Mairal, T.; Özalp, V.C.; Sánchez, P.L.; Mir, M.; Katakis, L.; O'Sullivan, C.K., 2008. Aptamers: molecular tools for analytical applications. **Anal Bioanal Chem,** v. 390, p. 989–1007.

Nakamura, C.; Kobayashi. T.; Miyake, M.; Shirai, M.; Miyake, J., 2001. Usage of a DNA aptamer as a ligand targeting microcystin. **Mol Crysr And Liq Crysf,** v. 371, p. 369-374.

Newton, L., Slater, T., Clark, N., Vijayaraghavan,A., 2013. Self assembled monolayers (SAMs) on metallic surfaces (gold and graphene) for electronic applications. **J. Mater. Chem. C.,** v. 1, p. 376-393.

Ng, A.; Chinnappan, R.; Eissa, S.; Liu, H.; Tilli, C.; Zourob, M., 2012. Selection, characterization, and biosensing application of high affinity congener-specific microcystin-targeting aptamers. **Environ Sci Technol**, v.46, n.19, p. 10697–10703.

Pacheco, W.F., Semaan, F.S., Almeida, V.G.K., Ritta, A.G.S.L.; Aurélio, R.Q., 2013. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Rev Virtual Quim**, v.5, n.4, p. 516-537.

Santhiago, M., Strauss, M., Pereira, M.P., Chagas, A.S., Bufon, C.C.B., 2017. Direct drawing of grafite onto paper for high-performance flexible electrochemical sensor. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v.9, p. 11959-11966.

Sharma, R., Deacon, S.E., Nowak, D., George, S.E. Szymonik, M.P. , Tang, A.A.S. , TomLinson, D.C., Davies, A.G., McPherson, M.J., Wälti, C., 2016. Label-free electrochemical impedance biosensor to detect human interleukin-8 in serum with sub-pg/mL sensitivity. **Biosensors and Bioelectronics,** v. 80, p. 607–613.

Sigma-Aldrich. Technical Bulletin AL-266 Preparing Self-Assembled Monolayers (SAMs) A Step-by-Step Guide for Solution-Based Self-Assembly. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Aldrich/Instructions/1/al-266.pdf?utm_source=redirect&utm_medium=promotional&utm_campaign=insite_al_techbull_al266>. Acesso: jan. 2018.

Silva, M.F.C.G., 1998. **Voltametria Cíclica**—Aplicações ao Estudo de Mecanismos de Reacções Induzidas por Transferência Electronica. Técnicas Experimentais, 70, p. 20-26.

Song, K.M.; Lee, S.; Ban, C., 2012. Aptamers and Their Biological Applications. **Sensors**, v. 12, p. 612-631.

Thermofisher Scientific. Instructions EDC. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22980>. Acesso: jan/2018.

Vericat, C., Vela, M.E., Benitez, G., Carro, P., Salvarezza, R.C., 2010. Critical Review. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system**. Chem. Soc. Rev**., v. 39, p. 1805–1834.

Vernasqui, L.G. Análise do fenol por voltametria cíclica: elétrodos compósitos de resina epoxílica, grafite e óxidos de metal. **.** 44 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental através do acordo de Dupla Diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Bragança, 2017). Disponível em:<https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/14423/1/Tese2017_LAIS_Voltametria.pdf>. Acesso: jan/2018.

Vivekananda, J.; Kiel, J.L, 2006. *Anti-Francisella tularensis DNA* aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay Laboratory Investigation. **Lab Invest**, v. 86, n. 6, p. 610-618.

Wang, J. **Analytical electrochemistry.** 3trd Ed., New Jersey: John Wiley e Sons, 2006. 262 pp.

Weller, M.G., 2013. Review. Immunoassays and Biosensors for the Detection of Cyanobacterial Toxins in Water. **Sensors,** v.13, p. 15085-15112.

Woody, R.W., 1995. Circular dichroism. **Methods Enzymol**, v. 246, p. 34–71.

World Health Organization, 1999. **Toxic cyanobacteria in water**: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus, I.; Bartram, J (Eds). eds E & FN Spon on behalf of WHO, London.

Xiang, A., Lei, X., Ren, F., Zang, L., Wang, Q., Zhang, J., Lu, Z., Guo, Y, 2014. An aptamer-based immunoassay in microchannels of a portable analyzer for detection of microcystin-leucine-arginine. **Talanta**, v. 130, p. 363–369.

Xi-Hui, Y.; Wei-Jun, K.; Mei-Hua, Y.; Ming, Z.; Zhen, O., 2013. Application of Aptamer Identification Technology in Rapid Analysis of Mycotoxins. **Chinese J Anal Chem**, v. 41, n. 2, p. 297-306.

Xu, H.; Gorgy, K.; Gondran, C.; Le Goff, A.; Spinelli, N.; Lopez, C., 2013. Label-free impedimetric thrombin sensor based on poly (pyrrole-nitriacetic acid)-aptamer film. **Bionsen Bioelectron**, v. 41, p. 90-95.

Zheng, R., Park, B-W., Kim, D-S; Cameron, B.D., 2011. Development of a highly specific amine-terminated aptamer functionalized surface plasmon resonance biosensor for blood protein detection. **Biomed Opt Express**, v. 2, p. 2731-2740.

DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho teve por principal objetivo avaliar os efeitos da exposição subcrônica a baixos níveis da cianotoxina microcistina e do pesticida piriproxifem em diferentes estágios do ciclo de vida em peixes teleósteos. Foram ainda investigadas as possíveis interação entre as moléculas sobre os estágios iniciais de desenvolvimento de peixes, considerando doses/concentrações realísticas de ambos os contaminantes. Os resultados foram promissores e inéditos visto que foi observado o efeito desregulador endócrino da MC-LR, destacando um efeito maior para os indivíduos expostos ao extrato algal. Nesse caso, uma discussão sobre o papel de outros componentes celulares das cianobactérias na determinação dos efeitos faz-se necessária, despertando a oportunidade para outros estudos. A possibilidade de outras moléculas presentes no extrato algal interferir aumentado o efeito tóxico da molécula alvo, foi também destacado por Silva et al. (dados submetidos) para a cilindrospermopsina, outro tipo de cianotoxina hepatotóxica.

No caso das doses/concentrações testadas, os resultados mostram que embora os efeitos fisiológicos encontrados na exposição de indivíduos juvenis de *Oreochromis niloticus* a ambos as moléculas não demonstrem danos à saúde geral dos animais, isso não significa que outros níveis de organização biológica e estágios do ciclo de vida não sejam afetados. Tornou-se evidente que a MC-LR é uma substância com papel desregulador endócrino para *O. niloticus* mesmo sob doses muito baixas, da mesma forma que afeta o desenvolvimento dos estágios iniciais em *Rhamdia quelen*. Igualmente, os resultados mostram que embora o piriproxifem seja uma molécula que age sob o desenvolvimento larval de insetos e outros artrópodes, esse composto não apresentou indícios de alterar o sistema hormonal de peixes, mas é capaz de interferir com o desenvolvimento normal dos estágios iniciais do desenvolvimento em *R. quelen*. Esses dados evidenciam um efeito posterior aos mecanismos de reprodução, como observado também para a MC-LR. Nesse contexto, a MC-LR afeta a reprodução de peixes em dois níveis, diferente do piriproxifem que atua apenas em um nível pós-fecundação.

O que merece destaque nesses dois tipos de abordagens descritas acima, é o fato de ter sido adotado níveis de exposição compatíveis aos definidos pelas agências internacionais de regulação e, com áreas impactadas por níveis abaixo do considerado sustentável para ambientes aquáticos, o que é um fator minimamente preocupante e deve despertar o interesse para mais estudos. Mesmo as maiores concentrações testadas no presente estudo são passíveis de serem encontrados durante as florações algais (WHO, 1999). Quanto ao piriproxifem, as

concentrações testadas foram calculadas com base na concentração de uso recomendada para este produto, considerando a água de consumo humano e 10 vezes esta concentração, o que seria passível de ocorrer em caixas de água residenciais onde o volume máximo para o qual o produto foi calculado fosse reduzido (Brasil, 2014). Contudo, o valor medido analiticamente do piriproxifem na água, tanto no experimento das tilápias quanto dos ELS do jundiá, mostrou-se muito abaixo do calculado e previsto pelos órgãos fiscalizadores. Assim, pelo exposto fica evidente que as concentrações testadas desse pesticida representam uma exposição muito mais realística e dessa forma mais preocupante, pois pela forma de exposição hídrica da molécula é improvável que a concentração em solução e testada atinja a dose permitida (WHO, 2008). Nesse contexto, a concentração permitida é maior que a testada nesse trabalho, fazendo com que os efeitos observados podem estar sendo subavaliados, visto que concentrações maiores podem potencialmente ser encontradas nos ambientes tratados, e já se encontram próximos às encontradas em ambientes naturais (Belenger et al., 2014).

A possibilidade das microcistinas e do piriproxifem ocorrerem simultaneamente no ambiente natural é real, haja vista que este produto poderia estar presente em esgoto doméstico, como também, serem provenientes de despejos da agricultura devido ao seu uso no combate a pragas no campo (WHO, 2008). Ambos, esgoto doméstico e despejos da agricultura, podem atingir corpos de água, eutrofizando os mesmos e levando à florações com a liberação de microcistinas, possibilitando assim simultaneamente a exposição aos dois compostos. Dessa maneira, os resultados apresentados nos colocam novamente em uma situação de realismo e os dados de modelagem que apresentam projeções matemáticas para essas misturas destacam dentro de outra abordagem, o real significado da presença dessas moléculas nos ambientes naturais.

Embora a escolha das espécies para esse estudo possa parecer discrepante, foi na verdade uma limitação ao estudo que se propôs. Foi previsto avaliar diferentes estágios de vida em peixes dada a natureza das moléculas estudadas, no entanto, ao mesmo tempo em que a utilização de *O. niloticus* possibilitaria estudos moleculares mais aprofundados se fosse necessário, o mesmo não seria possível com a espécie *R. quelen*. Da mesma forma que não seria possível a abordagem com os estágios iniciais de desenvolvimento com a espécie *O. niloticus*, visto que o protocolo já desenvolvido com a apresentação de uma modelagem matemática, só seria possível com a espécie *R. quelen*. Além disso, *O. niloticus* se reproduz muito bem naturalmente, então poucos autores relatam a desova artificial, sendo está técnica ainda pouco utilizada em piscicultura. Outro aspecto importante e que limita o uso dessa espécie nos experimentos com os estágios iniciais de desenvolvimento, é o fato de ser uma

espécie de desenvolvimento embrio-larval longo, atingindo a fase de pós-larva entre 12 e 13 dias (Fujimura e Okada, 2007).

No entanto, essas são duas espécies amplamente utilizadas como modelo de estudo para avaliar o efeito de poluentes, sendo ambas de fácil manutenção laboratorial e com biologia bastante conhecida. Esses aspectos garantem que seja possível futuramente executar estudos com essas mesmas espécies explorando os diferentes estágios do ciclo de vida das mesmas.

Os resultados mostraram ainda que os parâmetros adotados para avaliar a condição de saúde dos animais jovens expostos às substâncias teste foram determinantes, pois demonstraram que as concentrações testadas de fato são baixas ao ponto de não demonstrarem, nos níveis utilizados, danos aos indivíduos. Em geral, o uso de parâmetros que avaliam o estado óxido-redutor em hepatócitos bem como os índices somáticos, ou os efeitos histopatológicos constituem sinais importantes de dano fisiológico e que pode auxiliar no estabelecimento do risco de exposição para a espécie, bastante consolidados na literatura. Foi observado que nenhum dos dois produtos alteraram esses parâmetros significativamente, levando a concluir que para esses níveis de organização biológica tanto a microcistina-LR como o piriproxifem não são tóxicos para *O. niloticus* nas concentrações e tempo de exposição avaliados. Entretanto, a ocorrência da expressão de vitelogenina (vtg) em machos pela exposição à MC-LR apontam, ao contrário, para uma resposta de efeito. Nesse caso, os estudos com os biomarcadores mais convencionais, ao invés de afirmar um estado de não toxicidade, na realidade destaca o valor desse trabalho em termos toxicológicos, pois mesmo sob condições fisiologicamente estáveis, o papel de desregulador endócrino revelado pela MC-LR a classifica como tóxica para um evento específico e de suma importância para a manutenção da espécie. O que é mais interessante e promissor, é o fato desses achados terem sido determinados sob baixos níveis de exposição, traçando aqui um novo horizonte de estudos para essas moléculas ainda não revelados.

Quanto aos efeitos nos estágios iniciais de desenvolvimento, estes demonstraram que embora para os indivíduos jovens os danos não se mostraram tão evidentes para ambos os contaminantes, o mesmo não se revela com este outro tipo de abordagem. O piriproxifem que não se mostrou tóxico para os indivíduos juvenis de *O. niloticus*, se apresenta com grande potencial tóxico para a manutenção da população adulta da espécie *R. quelen* principalmente quando expostos à menor concentração (referente à concentração utilizada em água de consumo humano), reduzindo a taxa de sobrevivência e comprometendo a previsão de média populacional com a aplicação do modelo matemático. Esses dados são igualmente

reveladores, pois instiga a discussão de que os estudos em apenas um estágio do ciclo de vida para uma determinada espécie, não esgota totalmente as informações sobre o risco de exposição para a população. Por outro lado, os dados mostram também que os estudos de avaliação dos efeitos tóxicos de agentes químicos poluidores sobre a biota, devem ser encarados em um nível de complexidade maior, antes de se estabelecer um diagnóstico mais conclusivo quanto ao real risco de exposição para os organismos vivos.

Os efeitos observados nas misturas entre os dois compostos estudados, destacam a complexidade encontrada nos efeitos possíveis de serem encontrados em ambientes naturais, dada a miríade de substâncias que podem estar presentes principalmente nos ecossistemas aquáticos. Esses dados revelam ainda a grande dificuldade que é encontrada nos estudos com misturas, principalmente as complexas, pois quanto maior é a matriz de associações entre poluentes, mais inviável fica o diagnóstico e a conclusão sobre os efeitos. Em uma interpretação dualista como a apresentada no presente estudo, os resultados ainda são de fácil interpretação, e apesar de pouco representativos em termos ambientais, são importantes pois estabelecem uma discussão sobre os efeitos sinérgicos ou antagônicos, ao mesmo tempo que destacam a necessidade de adotar e investigar melhor esse tipo de abordagem. Com a aplicação do modelo matemático ficou evidente na maioria das associações do piriproxifem com a microcistina que houve previsão de redução populacional significativa, sendo que o grupo com cerca de 0,10 $\mu g\ L^{-1}$ de piriproxifem e 10 $\mu g\ L^{-1}$ de microcistina-LR apresentou previsão de extinção do grupo após 5 anos de exposição. Obviamente que se trata de um modelo matemático apoiado por experimentos controlados, e que mesmo considerando variáveis naturais na sua formulação, pode ainda ser questionado pois não tem como ser comprovado. Por outro lado, é inegável que constitui uma ferramenta poderosa, principalmente para as ações de manejo e argumentos fortes para decisões sobre a conservação das espécies e da própria biodiversidade. Essas informações tornam-se mais promissoras quando os efeitos são encontrados dentro de limites protegidos pelas agências reguladoras como limites seguros de exposição.

Outro foco no presente estudo foi a investigação e aplicação de métodos que permitissem desenvolver um sistema de detecção de microcistina-LR, de forma a contribuir com a construção de um protótipo de detecção na identificação da MC-LR em ambientes aquáticos, de forma rápida, com baixo custo e simples de utilizar. Esse tipo de iniciativa é necessário pois, cada vez mais, os ambientes naturais encontram-se eutrofizados e passíveis de florações. Nesse contexto, a imediata detecção da cianotoxina é essencial para o estabelecimento de políticas de conservação, saúde coletiva e preservação dos mananciais e

reservatórios, principalmente aqueles relacionados com o abastecimento público. As várias tentativas realizadas em testes como microplacas e também utilizando testes eletroquímicos em um dispositivo feito a partir de uma plataforma de papel serviram para mostrar que é uma área multidisciplinar de difícil execução. Embora não tenha sido possível o estabelecimento completo de um protocolo funcional para o biossensor, os últimos resultados apontaram para o seu funcionamento para a detecção da MC-LR. No entanto, não foi possível realizar os testes necessários para a certificação dessas mudanças em prol de um biossensor de sucesso, mas abre-se uma possibilidade que deve ser testada futuramente, concluindo assim esse trabalho como planejado inicialmente.

CONCLUSÕES GERAIS

1. A MC-LR no extrato algal ou purificada atua como uma substância desreguladora endócrina para *O. niloticus* adultos sob as condições testadas;
2. Os dados com a exposição à MC-LR no extrato algal sugerem que essa é mais tóxica se comparado com os efeitos observados para a MC-LR purificada para a espécie *O. niloticus* sob as condições testadas;
3. A MC-LR purificada altera a atividade da acetilcolinesterase na sua maior dose em músculo de *O. niloticus* sob as condições testadas;.
4. O piriproxifem não mostrou evidências de toxicidade para *O. niloticus* adultos sob as condições testadas;
5. A MC-LR no extrato algal e o piriproxifem interferem com as taxas de sobrevivência e no desenvolvimento dos estágios iniciais pós fertilização de *R. quelen* sob as condições testadas;
6. As misturas entre a MC-LR no extrato algal e o piriproxifem interferem em diferentes níveis na previsão populacional de *R. quelen* quando aplicado o modelo matemático; especificamente a mistura de 0,10 $\mu g\ L^{-1}$ de piriproxifem e 10 $\mu g\ L^{-1}$ de MC-LR no extrato algal apresentou previsão de extinção do grupo após 5 anos de exposição;

   Os protocolos aplicados para o desenvolvimento de um biosensor para a MC-LR não foram definitivos, porém, os últimos ensaios indicaram bom funcionamento do sistema. Dessa forma, mais ensaios são necessários para a confirmação de seu funcionamento, assim como, para o estabelecimento de limites de detecção e realização de processos de validação.

REFERÊNCIAS

4th WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES). **Review of IR3535, KBR3023, (RS)-methoprene 20%EC, pyriproxyfen 0.5%GR and lambda-cyhalothrin 2.5%CS. 4—5. December 2000, Ref:WHO/CDS/WHOPES/2001.2**, 2001. Geneva. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66683/1/WHO_CDS_WHOPES_2001.2.pdf?ua=1. Acesso em: janeiro 2018.

Abdel-Latif, H.M.R., Khashaba, A.M.A., 2017. Subchronic toxicity of Nile tilapia with different exposure routes to *Microcystis aeruginosa*: Histopathology, liver functions, and oxidative stress biomarkers. **Veterinary World**, v.10, p. 955-963. doi: 10.14202/vetworld.2017.955-963.

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. **Method Enzymol**, v.105, p.121-126.

Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR). Bula do produto Cordial 100. Disponível em: http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/CORDIAL100.pdf. Acesso em: janeiro 2018.

Aleixo, L.M., 2003. Voltametria: Conceitos e Técnicas. Disponível em: http://usuarios.upf.br/~gobbi/CADA%20UMA%20DAS%20DISCIPLINAS/QUIMICA%20ANALITICA%20INSTRUMENTAL/voltametria-vf.pdf. Acesso em: abri 2018.

Amado, L.L., Monserrat, J.M., 2010. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. Review article. **Environ Int**, 36, 226–235.

Andersen, T., 2018. **Thermo Scientific Nunc Immobilizer Amino Instruction protocol,** Thermo Fisher Scientifc, Roskilde, Denmark, 2012. Disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/D20692.pdf. Acesso em: janeiro 2018.

Angeloni, S., Cordes, R., Dunbar, S., Garcia, C., Gibson, G., Martin,C., Stone, V., 2013. **xMAP® Cookbook: A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology.** Luminex xMAP® Technology. 1st Ed.,116 pp., 2013.

Ankley, G.T., Johnson, R.D., 2004. Small Fish Models for Identifying and Assessing the Effects of Endocrine-disrupting Chemicals. **Ilar Journal**, v. 45, p. 470-483.

Arcand-Hoy, L.D., Benson, W.H., 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. **Environ Toxicol Chem**, v. 17, 49–57.

Ates, M., Dermi, V.I.Mehtmet, Arslan, Z., Kaya, H., Yilmaz, S., Camas, M. 2016. Chronic exposure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to iron oxide nanoparticles: Effects of particle

morphology on accumulation, elimination, hematology and immune responses. **Aquat Toxicol**, v.177, p.22-32.

Ávila, B.E.-F., Escamilla-Gómez,V., Campuzano, S.Pedrero, M., Pingarrón, J.M., 2013. Disposable amperometric magnetoimmunosensor for the sensitive detection of the cardiac biomarker amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide in human sérum. **Analytica Chimica Acta,** v. 784, p. 18– 24.

Azevedo, S.M.F.O.; Carmichael, W.W.; Jochimsen, E.M.; Rinehart, K.L.; Lau, S.; Shaw, G.R.; Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, v.181-182, p.441-446.

Belenger, V., Martinez-Capel, F., Masiá, A., Picó, Y., 2014. Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (Eastern Spain**). J Hazard Mater,** v.265, p.271– 279.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollu- tion. **J Fish Dis,** v. 22, p. 25–34. doi:10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x

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

Brasil. Portaria nº 2914/MS de 11 de dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 de dezembro de 2012.

Brasil. Ministério da Saúde, 2014. **Orientações técnicas para utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de Aedes aegypti.** Disponível em: http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/30/Instrucoes-para-uso-de-pyriproxyfen-maio-2014.pdf. Acesso em: dezembro 2017.

Brasil. Ato N° 1/ MAPA de 22 de janeiro de 2016. Define os critérios adotados para seleção, bem como os produtos priorizados para atendimento as pragas de maior importância econômica no Brasil descritas na Portaria DSV nº 5 de 21 de agosto de 2015. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 27 de janeiro de 2016. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/ato-no-1-2016-dfia-prioridades-de-registro. Acesso em: abril 2018.

Brito, I.A.A., López-Barrera, E.A., S.B.L., Oliveira Ribeiro, C.A., 2017. Modeling the exposure risk of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae) to wastewater. **Ecol Model** , v. 347, p.40-49.

Caixeta, E.S., Silva, C.F., Santos, V.S., Campos Júnior, O. E., Pereira, B.B., 2016. Ecotoxicological assessment of pyriproxyfen under environmentally realistic exposure conditions of integrated vector management for Aedes aegypti control in Brazil**. J Toxicol Environ Health,** v.79A, p.799-803.

Castro, N.O., Moser, G.A.O., 2012. Florações de algas nocivas e seus efeitos ambientais. **Oecol Australis**, v. 16, n. 2, p. 235-264.

Ccanccap, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., 2016. Pesticides in the Ebro RIver basin: Occurrence and risk assessment. **Environ Pollut,** v. 211, p. 414-424.

Chen**,** Y-W., Wu, P-S., Yang, E-C., Nai, Y-S., Huang, Z.Y., 2016. The impact of pyriproxyfen on the development of honey bee (*Apis mellifera* L.) colony in field. **J Asia Pac Entomol**, v.19, p.589–594.

Citartan, M., Gopinathb, S.C.B., Tominagab, J., Tanc, S-C., Tanga, T-H., 2012. Assays for aptamer-based platforms. **Biosens Bioelectron**, v. 34, n. 1, p.1– 11.

Clemente, Z; Busato, R. H.; Oliveira Ribeiro, C.A.; Cestari, M.M.; Ramsdorf, W.A.; Magalhães, V.F.; Wosiack, A. C.; Silva de Assis, H.C.S., 2010. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. **Toxicon**, v. 55, p. 396–406.

Colovic, M.B., Kristi, D.Z., Lazarevi -Past, T.D., Bondzic, A., M. Vasic, V., 2013. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Cur Neuropharmacol**, v.11, p.315-335.

Dahlmann, J., Budakowski ,W. R., Luckas, B., 2003. Liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins, **J Chromatogr**, v. 994, p. 45-57.

Damos, F.S., Mendes, R.K., Kubota, L.T, 2010. Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors. **Quim. Nova,** v. 27, p. 970-979.

Davidson, A.D., et al. 2009. Multiple ecological pathways to extinction in mammals. **Proc Natl Acad Sci USA,** v. 106, p. 10702-10705.

Diamanti-Kandarakis, E., 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. **Endocr Revies**, v. 30, p.293–342.

Diretoria de Vigilância Epidemiológica (DIVE) – Governo do Estado de Santa Catarina, 2014. **Orientações para uso do larvicida Pyriproxyfen 0,5G no Programa de Controle da Dengue em Santa Catarina**. Disponível online em: http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Orientacao%20Tecnica%20Pyriproxyfen.pdf. Acesso em: dezembro 2017.

Dzieciolowska, S., Larroque, A-L, Kranjec, E-A., Drapeau, P., Samarut, E., 2017. The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. **Scientific Reports**, 7, art. no. 40067. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep40067>. Acesso em: janeiro 2018.

Eissa, S., Ng, A., Siaj, M., Zourob, , 2014. M. Label-Free Voltammetric Aptasensor for the Sensitive Detection of Microcystin-LR Using graphene-Modified Electrodes. **Anal Chem** v. 86, p. 7551-7557.

Eissa, S.; Zourob, M. , 2017. Aptamer- Based Label-Free Electrochemical Biosensor Array for the Detection of Total and Glycated Hemoglobin in Human Whole Blood. **Scientific Reports** 7, art. n° 1016. DOI:10.1038/s41598-017-01226-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-01226-0.pdf>. Acesso: Jan/2018.

Ellman, G.L., Courtney D., Andres Jr., V., Feathersthone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v.7, p. 88-96.

EPA, 2009. "**Method 538: Determination of Selected Organic Contaminants in Drinking Water by Direct Aqueous Injection-Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (DAI-LC/MS/MS)**," Revision 1.0, U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, EPA/600/R-09/149, November 2009.

EPA, 2015. **Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins**. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, Health and Ecological Criteria Division Washington, DC, June 2015.

FAO/WHO - Pesticide residues in food, 1999. **Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO** Core Assessment Group- Toxicological Evaluations. Rome, 1999.

Fent, K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicol Lett**, v. 140-141, p.353-365.

Fernandes, V.O., Cavati, B., Oliveira, L.B., Souza, B.D., 2009. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. **Oecol Bras**, v. 13, n. 2, p. 247-258.

Ferrão-Filho, A.S., Molica, R., Azevedo, S.M.F.O., 2009. Ecologia, Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, **Oecol Bras**, v. 13, n. 2, p. 225-228.

Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Gonçalves, F.J.M., Pereira, M.J., 2004. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. **Ecotox Environ Safe**, v. 59, p.151–163.

Fishbase.org, 2018. Disponível em: http://www.fishbase.org. Acesso em: jan 2018.

Freire, R.S., Pessoa, C.A., Kubota, L.T., 2003. Revisão. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. **Quim Nova**, v. 26, p. 381-389. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000300016.

Fujimura, K., Okada, N., 2007. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. **Develop Growth Differ***,* v.49, 301–324. doi: 10.1111/j.1440-169x.2007.00926.x

Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R., Andrinolo, D., 2011. An Acute Case of Intoxication with Cyanobacteria and Cyanotoxins in Recreational Water in Salto Grande Dam, Argentina. **Mar. Drugs.** v.9, p. 2164-2175; doi:10.3390/md9112164.

Gibbs, J. ELISA Technical Bulletin No. 1: Immobilization Principles: Selecting the Surface. **Corning Life Sciences Technical Library.** 8 pp., 2001.

Gomes, A.M.A., Sampaio, P.L., Ferrão-Filho, A.S., Magalhães, V.F., Marinho, M.M., Oliveira, A.C.P. Santo, V.B., Domingos, P., Azevedo, S.M.F.O., 2009. Florações de cianobactérias tóxicas em uma lagoa costeira hipereutrófica do Rio de Janeiro/RJ (Brasil) e suas consequências para saúde humana. **Oecol Bras**, v. 13, p. 329-345.

Graeff, A., Segalin, C.A., Pruner, E.N., Amaral Junior. H. Produção de alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Boletim Técnico da Epagri**, Santa Catarina. Disponível em: http://intranetdoc.epagri.sc.gov.br/producao_tecnico_cientifica/DOC_4125.pdf. Acesso em: feveveiro 2018.

GraphPad Prism™, 2017. Disponível em: https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?comparing_three_or_more_groups.htm. Acesso em: dezembro 2017.

Guiloski, I. C.; Rossi, S. C.; Silva, C. A.; Silva De Assis, H. C. , 2013. Insecticides biomarker responses on a freshwater fish *Corydoras paleatus* (Pisces: Callichthyidae). **J Environ Sci Health B**. v. 48, p. 272-277.

Gutteridge, J.M., Halliwell, 2000. B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136–147.

Henle, K., Sarre, S., Wiegand, K., 2004. The role of density regulation in extinction processes and population viability analysis. **Biodivers Conserv**, v. 13, p. 9-52.

Hilborn, E.D., Carmichael, W.W., Yuan, M., Azevedo, S.M.F.O., 2005. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. **Toxicon**, v. 46, p.218–221.

Homann, M., Göringer, H.U., 1999. Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. **Nucleic Acids Res,** v. 27, n. 9, p. 2006-2014.

Huynh-Delerme, C., Edery, M., Huet, H., Puiseux-Dao, S., Bernard, C., Fontaine, J.J., Crespeau, F., Luze, A., 2005. Microcystin-LR and embryo-larval development of medaka fish, Oryzias latipes. I: effects on the digestive tract and associated systems. **Toxicon**, v. 46, p. 16–23.

Ibelings, B.W., Chorus, I., 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater ‘‘seafood’’ and its consequences for public health: A review. **Environ Pollut**, v. 150, p. 177-192.

Invest, J.F. and Lucas, J.R, 2008. **Pyriproxyfen as a mosquito larvicide.** In: Robinson W.H., Bajomi D. (Eds). Proc. 6th Int. Conf. on Urban Pests, Budapest, pp. 239-245.

Jacinavicius, F.R., Gama-Júnior, W.A., Paiva Azevedo, M.T., Sant’anna, C.L., 2018. **Manual para o Cultivo de Cianobactéria**s. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Instituto de Botânic a- Núcleo de Pesquisa em Ficologia. Disponível online em: http://www.ambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/files/2013/09/virtuais_4cianobact%C3%A9rias.pdf. Acesso em: fevereiro 2018.

Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., Wolff, S. P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Anal Biochem**, v.202, p. 384–389.

Jiang, Z. Y., Woollard, A. C., Wolff, S. P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids** v. 26, p. 853–856.

Joshi, R., Janagama, H., Dwivedi, H.P., Senthil Kumar,T.M.A., Jaykus, L.A., Schefers, J., Sreevatsan, S., 2009.Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica serovars*. **Mol Cell Probe**, v. 23, p. 20–28.

Johnson, M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. **Labome- Synatom Research.** Princeton, New Jersey. Disponível em: https://www.labome.com/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.htmL. Acesso em: janeiro 2018.

Kannan Maharajana , K., Muthulakshmia, S., Natarajb, B., Ramesha, M. Kadirvelu. K., 2018. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquat Toxicol**, v. 196, p. 132–145. doi:10.1016/j.aquatox.2018.01.010.

Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H., 1996. **Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop.** Environ. Health Perspect. 104 Suppl, pp. 715–740. doi:10.1289/ehp.96104s4715

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B, 1976. Mechanism for several activities of the gluthatione S-transferases. **J Biol Chem**, v.251, 6183–6188.

Kist, L.W., Rosemberg, D.B., Pereira, T.C.B., Azevedo, M.B., Richetti, S.K., Leão, J.C., Yunes, J.S., Bonan, C.D.B., Bogo, M.R.B, 2012. Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional *ache* activation in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Comp. Biochem Phys**, v.155 C, p. 247–252.

Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Anziliero, D., Martins, D., Lorenson, M., Marteninghe, A., Silva, L.B., 2008. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 1050-1055.

Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., & Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–57. Retrieved from http://www. ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015469.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**. v. 233, p. 346– 357.

Lin; Z., Huang, H. Xu, Y., Gao, X., Qiu, B., Chen, X., Chen, G., 2013. Determination of microcystin-LR in water by a label-free aptamer based electrochemical impedance biosensor. **Talanta**, v.103, p.371–374.

Liu, Y., Song, L., Li, X., Liu, T., 2002. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, Misguruns mizolepis Gunthe. **Toxicon,** v.40, p. 395–399.

MacPhail, R.C., Brooks J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D., Padilla, S., 2009. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. **Neurotoxicology**, v. 30, p.52–58.

Magalhães, V.F., Soares, R.M., Azevedo, S.M., 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. **Toxicon**, v. 39, n. 7, p. 1077-85.

Mairal, T., Özalp, V.C., Sánchez, P.L., Mir, M., Katakis, L., O'Sullivan, C.K. 2008 Aptamers: molecular tools for analytical applications. **Anal Bioanal Chem**, v. 390, p. 989–1007.

Malbrouck, C., Kestemont, P., 2006. Effects of microcystins on fish**. Environ Toxicol Chem** v.25, p.72–86.

Matte, S., Ennis,C., Tanner, A. Technical Parameters for the Use of Corning® DNA-BIND™ Products in High-Throughput Screening-Application Note Innovative Techniques in Drug Discovery. Disponível em: <http://csmedia2.corning.com/LifeSciences//media/pdf/an_techpara_dnabind.pdf. Acesso em:Acesso: jan 2018).

Mayumi, T., Kato,H., Imanishi, S., Kawasaki, Y., Hasegawa, M., Harada, K., 2006. Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under ion trap conditions**. J Antibiot**, v.59, n.11, p.710-719.

McKenney, C.L., 2005.The influence of insect juvenile hormone agonists on metamorphosis and reproduction in estuarine crustaceans. **Integr Comp Biol** v.45, p. 97-105.

Medri, V., Medri, W., Caetano Filho, M., 2009. Growth of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* Fed Diets with Different Levels of Proteins of Yeast. **Braz Arch Biol Techn**, v.52, p.721-728.

Mela M., Randi, M.A.F., Ventura, D.F., Carvalho, C.E.V., Pelletier, E., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 68, p. 426–35, doi:10.1016/j.ecoenv.2006.11.013.

Mela, M., Guiloski, I.C., Doria, H.B., Randi, M.A.F., de Oliveira Ribeiro, C.A., Pereira, L., Maraschi, A.C., Prodocimo, V., Freire, C.A., Silva de Assis, H.C., 2013. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 93, p. 13–21.

Metcalf, J.S., Codd, G.A., 2004. Cianobacterial toxins in the water environment: A review of current knowledge. **Foundation for water research**. University of Dundee, Nethergate, UK. 2004.

Miyamoto, J., M. Hirano, Y. Takimoto, and Hatakoshi, M., 1993. Insect growth regulators for pest control, with emphasis on juvenile hormone analogues. Present status and future prospects. Ch. 11. *In*: Duke, Menn and Plimmer (eds). **Pest Control with Enhanced Environmental Safety**, American Chemical Society, Washington, 1993.

Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C, Costa, A.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, v.4, 743–753.

Muñoz, L., Weber, P., Dressler, V., Baldisserotto, B., Vigliano, F.A., 2015. Histopathological biomarkers in juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to a sublethal lead concentration. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 113, p. 241–247.

Nakamura, C., Kobayashi. T., Miyake, M., Shirai, M., Miyake, J., 2001. Usage of a DNA aptamer as a ligand targeting microcystin. **Mol Crysr And Liq Crysf**, v. 371, 369-374,.

Neilan, B.A., Pearson, L.A., Muenchhoff, J., Moffitt, M.C., 2013. Dittmann, E. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. **Environ Microbiol**, v.15, n.5, p.1239–1253 1-15, doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x

Newton, L., Slater, T., Clark, N., Vijayaraghavan,A., 2013. Self assembled monolayers (SAMs) on metallic surfaces (gold and graphene) for electronic applications. **J Mater Chem C,** v. 1, p. 376-393.

Ng, A.; Chinnappan, R.; Eissa, S.; Liu, H.; Tilli, C.; Zourob, M.; Selection, characterization, and biosensing application of high affinity congener-specific microcystin-targeting aptamers. ***Environ Sci Technol***, v.46, n.19, p. 10697–10703, 2012.

Niemuth, N.J., Klaper, R.D., 2018. Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes. **Aquat. Toxicol**, v.95, p. 33–40.

O'Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.B., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**, v. 14, p. 313–334.

Oliveira Ribeiro, C.A.O., dos Reis Filho, H.S.; Grötzner, S.R**. Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia.** Santos: Livraria Santos Editora Ltda, Curitiba, BR, 2012. pp. 442.

Osman, A.G.M., 2012. Biomarkers in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) to Assess the Impacts of River Nile Pollution: Bioaccumulation, Biochemical and Tissues Biomarkers **J Environ Prot**, v. 3, p. 966-977.

Pacheco, W.F., Semaan, F.S., Almeida, V.G.K., Ritta, A.G.S.L.; Aurélio, R.Q., 2013. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Rev Virtual Quim**, v.5, n.4, p. 516-537.

Paerl, H.W., Hall, N.S., Calandrino, E.S., 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change – Review. **Sci Total Environ**, v.409, p. 1739–1745.

Palikova, M., Krejc, R., Hilscherov, K., Babica, P., Navratil, D., Kopp, S., Ludek, B., 2007. Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicol**, v.81, p. 312–318.

Pavagadhi, S., Balasubramanian, R., 2013. Toxicological evaluation of microcystins in aquatic fish species: current knowledge and future directions. **Aquat Toxicol**, v.142- 143, p. 1–16.

Pimm, S.L., Jones, L., Diamond, J., 1988. On the risk of extinction. **Am Nat,** v.132, p. 757-785.

Pimpão, C.T., Moura, E., Fredianelli, A.C., Galeb, L.G., Rocha, R.M.V.M., Montanha, F.M., 2013. **Evaluation of Toxicity in Silver Catfish**, in: Türker, H (Ed), New Advances and Contributions to Fish Biology. InTech, Croatia, pp 197-220. doi: 10.5772/45635.

Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, v. 97, p. 55-74.

Poste, A.E., Hecky, R.E., Guildford, S.J., 2011. Evaluating microcystin exposure risk through fish consumption. **Environ Sci Technol**, v. 45, p. 5806–5811.

Powers, C.M., Slotkin, T.A., Seidler, .F.J., Badireddy, S.P., 2011. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition**. Neurotoxicol Teratol**, v, 33, 708–714.

Properties Pesticides Database (PPBD). Disponível em: http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/574.htm#3. Acesso em: janeiro 2018.

Puddick, J., Prinsep, M.R., Wood, S.A., Kaufononga, S.A., Cary, S.C., Hamilton, D,P., 2014. High levels of structural diversity observed in microcystins from Microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. **Mar Drugs**, v. 13, p. 5372-95.

Qiao, Q., Liu, W., Wu,K., Song,T., Hu,J., Huang, X., Wen,J., Chen, L., Zhang,X. 2013.Female zebrafish (*Danio rerio*) are more vulnerable than males to microcystin-LR exposure, without exhibiting estrogenic effects**. Aquat Toxicol**, v.142– 143, p. 272– 28.

Ribeiro, C.A.O., dos Reis Filho, H.S.; Grötzner, S.R. **Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia.** Santos: Livraria Santos Editora Ltda, 2012. pp. 442.

Rodrigues-Galdino, A.M., A.M., Maiolino, C.V., Forgati, M., Donatti, L.,Mikos, J.D., Falanghe Carneiro, P.C., Sant'Anna Rios, F., 2010. Development of the neotropical catfish Rhamdia *quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote**, v. 8, p. 131–144.

Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Werner, V.R., Dogo, C.R., Rios, F.R., Carvalho, L.R., 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algol Stud**, v.126, 251-265.

Santos, D.R., Yamamoto, F., Filipak Neto, F., Randi, M.A.F., Moura-Costa, D.D., Liebel, S., Xavier, S., Voigt, C.L., Oliveira Ribeiro, C.A., 2016.The applied indicators of water quality may underestimate the risk of chemical exposure to human population in reservoirs utilized for human supply-Southern Brazil. **Environ Sci Poll Res Int**, v. 23, p. 9625-9639.

Santhiago, M., Strauss, M., Pereira, M.P., Chagas, A.S., Bufon, C.C.B., 2017. Direct drawing of grafite onto paper for high-performance flexible electrochemical sensor. **ACS Appl Mater Interfaces**, v.9, p. 11959-11966.

Saraf, S.R., Frenkel, A., Harke, M.J., Jankowiak, J.G., Gobler, C.J., McElroy, A.E., 2018. Effects of Microcystis on development of early life stage Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Comparative toxicity of natural blooms, cultured Microcystis and microcystin-LR. **Aquat Toxicol**, 194, p. 18–26.

Scholz, S., Mayer, I., 2008. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. **Mol Cell Endocrinol**, v.293, p. 57–70.

Schug, T.T., Janesick, A., Blumberg, B., Heindel, J.J., 2011 Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 127, 204-215. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.08.007.

Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, p. 192–205. doi:10.1016/0003-2697(68)90092-4.

Sihuincha, M., Zamora-Perea, E., Orellana-Rios, W., Stancil, J.D.,, López-Sifuentes, V., Vidal-Oré, C., Devine, G.J., 2005. Potential use of pyriproxyfen for control of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Perú. **J Med Entomol,** v.42, p. 620-30.

Silva, M.F.C.G., 1998. Voltametria Cíclica—Aplicações ao Estudo de Mecanismos de Reacções Induzidas por Transferência Electronica. **Técnicas Experimentais**, v.70, p. 20-26.

Silva-Stenico, M.E., Cantúsio Neto,Alves, I.R., Moraes, L.A.B., Shishido, T.K., Fiore, M.F., 2009. Hepatotoxin Microcystin-LR Extraction Optimization. **J Braz Chem Soc**, v. 20, p. 535-542.

Sigma-Aldrich. Technical Bulletin AL-266. **Preparing Self-Assembled Monolayers (SAMs): A Step-by-Step Guide for Solution-Based Self-Assembly**. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Aldrich/Instructions/1/al-266.pdf?utm_source=redirect&utm_medium=promotional&utm_campaign=insite_al_techbull_al266. Acesso em: janeiro 2018.

Sharma, R., Deacon, S.E., Nowak, D., George, S.E. Szymonik, M.P. , Tang, A.A.S. , TomLinson, D.C., Davies, A.G., McPherson, M.J., Wälti, C., 2016. Label-free electrochemical impedance biosensor to detect human interleukin-8 in serum with sub-pg/mL sensitivity. **Biosensors and Bioelectronics,** v. 80, p. 607–613.

Song, K.M., Lee, S., Ban, C., 2012. Aptamers and Their Biological Applications. **Sensors**, v. 12, p. 612-631.

Su, Y., Li, L., Hou, J., Wu, N., Lin, W., Li, G, 2016. Life-cycle exposure to microcystin-LR interferes with the reproductive endocrine system of male zebrafish. **Aquat Toxicol**, v.175, p. 205–212.

Sumivector, 2018. **Sumilarv – Informação Técnica**. Disponível online em: http://sumivector.com/sites/default/files/site-content/pdf/Sumilarv-informacao-2012.pdf. Acessado em: dez 2017.

Suzuki, Y.J., Carini, M., Butterfield, D.A., 2010. Protein Carbonylation. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, 323-325, doi: 10.1089/ars.2009.2887.

Thermofisher Scientific. Instructions EDC. Disponível em: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22980. Acesso em: janeiro 2018.

Trinchet, I., Djediat, C., Huet, H., Dao, S.P.,Edery, M. 2011. Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. **Reprod Toxicol**, v. 32, p. 329– 340.

Truong, L., Gonnerman, G., Simonich, M.T., Tanguay, R.L., 2016. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish, **Environ Pollut**, v. 218, p. 1089–1093.

Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M. F., Park, H.D., Chen, G.C., Chen, G., Yus, S.Z., 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, n.6, v.17, p. 1317-1321.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.13, 57-149.

Vericat, C., Vela, M.E., Benitez, G., Carro, P., Salvarezza, R.C., 2010. Critical Review. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system**. Chem Soc Rev**, v. 39, p. 1805–1834.

Vernasqui, L.G. Análise do fenol por voltametria cíclica: elétrodos compósitos de resina epoxílica, grafite e óxidos de metal. **.** 44 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental através do acordo de Dupla Diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Bragança, 2017). Disponível em: https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/14423/1/Tese2017_LAIS_Voltametria.pdf. Acesso em: janeiro 2018.

Vivekananda, J.; Kiel, J.L., 2006. *Anti-Francisella tularensis DNA* aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay Laboratory Investigation. **Lab Invest**, v. 86, n. 6, p. 610-618.

von Hippel, F.A., Miller, P.K., Carpenter, D.O., Dillon, D., Smayda, L., Katsiadaki, I., Titus, T.A., Batzel, P., Postlethwait, J.H., Buck, C.L., 2018. Endocrine disruption and differential gene expression in sentinel fish on St. Lawrence Island, Alaska: Health implications for indigenous residents. **Environ Pollut**, v. 234, p. 279-287.

Wang, P., Chien, M., Wu, F., Chou, H., Lee, S., 2005. Inhibition of embryonic development by microcystin-LR in zebrafish, Danio rerio. **Toxicon**, v**.** 45, p.303–308.

Wang, J. **Analytical electrochemistry.** 3^{trd} Ed., New Jersey: John Wiley e Sons, 2006. 262 pp.

Wang, Q., Xie, P., Chen, J., Liang, G., 2008. Distribution of microcystins in various organs (heart, liver, intestine, gonad, brain, kidney and lung) of Wistar rat via intravenous injection. **Toxicon**, v. 52, p.721–727.

Weller, M.G., 2013. Review. Immunoassays and Biosensors for the Detection of Cyanobacterial Toxins in Water. **Sensors**, v.13, p. 15085-15112.

WHO, IPCS, I.P. on C.S., 2002. **Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors**, International Programme on Chemical Safety. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/>. Acesso: jan/2018.

Wiegand, C.; Pflugmacher, S.,2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites - a short review. **Toxicol Appl Pharm**, v. 203, p. 201– 218.

Winterbourn, C.C., 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicol Lett**, v. 82/83, p. 969-974.

Woody, R.W., 1995. Circular dichroism. **Methods Enzymol**, v. 246, p. 34–71.

World Health Organization, 1999. **Toxic cyanobacteria in water**: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus, I.; Bartram, J (Eds). eds E & FN Spon on behalf of WHO, London, 1999.

World Health Organization, 2003. **Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality**. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cyanobactoxins.pdf. Acesso em: dezembro 2017.

World Health Organization, 2008. **Pyriproxyfen in drinking-water: Use for vector control in drinking-water sources and containers. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality**. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/pyriproxyfen-background.pdf. Acesso em: dezembro 2017.

Woźny, M. Lewczuk, B., Ziółkowska, N., Gomułka, P., Dobosz, S. Łakomiak, A., Florczyk, M., Brzuzan, P., 2016. Intraperitoneal exposure of whitefish to microcystin-LR induces rapid liver injury followed by regeneration and resilience to subsequent exposures. **Toxic Appl Pharm**, v. 313, p. 68–87.

Xiang, A., Lei, X., Ren, F., Zang, L., Wang, Q., Zhang, J., Lu, Z., Guo, Y, 2014. An aptamer-based immunoassay in microchannels of a portable analyzer for detection of microcystin-leucine-arginine. **Talanta**, v. 130, p. 363–369.

Xi-Hui, Y., Wei-Jun, K., Mei-Hua, Y., Ming, Z., Zhen, O. **2013.** Application of Aptamer Identification Technology in Rapid Analysis of Mycotoxins. **Chinese J Anal Chem**, v.41, n. 2, p. 297-306.

Xu, H.; Gorgy, K.; Gondran, C.; Le Goff, A.; Spinelli, N.; Lopez, C., 2013. Label-free impedimetric thrombin sensor based on poly (pyrrole-nitriacetic acid)-aptamer film. **Bionsen Bioelectron**, v. 41, p. 90-95.

Yamamoto, F.Y., Garcia, J.R.E., Kupsco, A., Oliveira Ribeiro, 2017. Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu River - Southern Brazil. **Chemosphere,** v. 186, p. 88-99.

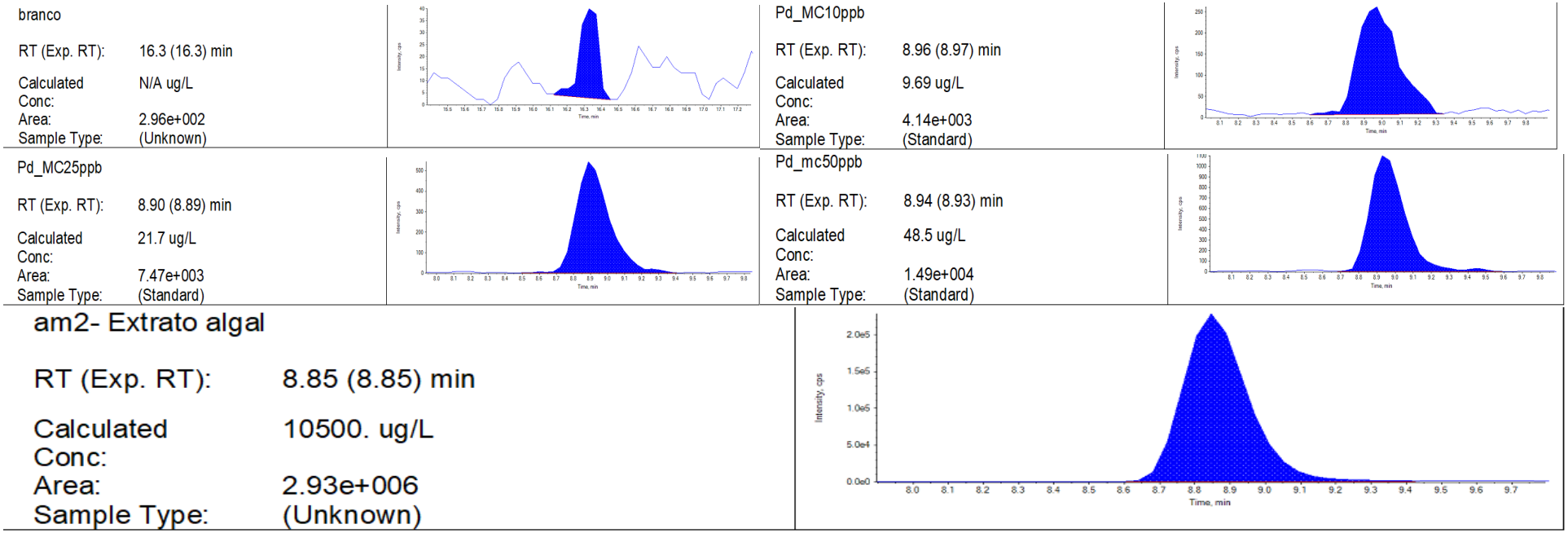
Yapabandara, AM., Curtis, CF, 2004. Control of vectors and incidence of malaria in an irrigated settlement scheme in Sri Lanka by using the insect growth regulator pyriproxyfen. J **Am Mosq Control Assoc**, v.20, p.395-400.

Zablonsky, J.R., 2012. **Avaliação da remoção de cianobactérias e cianotoxinas de ambientes eutrofizados por coagulação e membranas filtrantes.** 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

Zheng, R., Park, B-W., Kim, D-S; Cameron, B.D., 2011. Development of a highly specific amine-terminated aptamer functionalized surface plasmon resonance biosensor for blood protein detection. **Biomed Opt Express**, v. 2, n. 9, p. 2731-2740.

ANEXOS

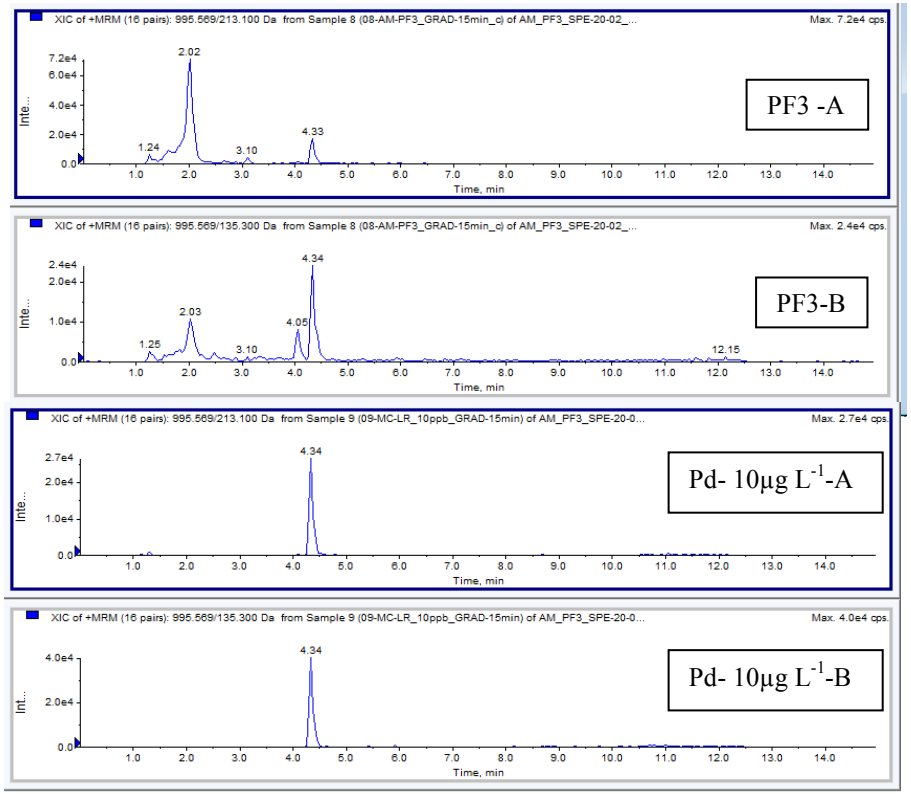
Anexo 1. Cromatograma de detecção e quantificação de microcistina-LR em amostra de extrato algal concentrado – utilizada posteriormente como solução-estoque para as contaminações com microcistina-LR do extrato algal nos experimentos do Capítulo I e II:



Legenda: Am2= amostra do cultivo 2 – a toxina da massa de cianobactérias foi extraída 3 x por sonicação, seguida por e centrigação e separação do sobrenadante para a quantificação; Branco= amostra sem contaminação; Pd= padrão.

Nota: as condições experimentais para a determinação da microcistina-LR em tecido de peixe estão descritas no item 2.2 do M&M geral.

Anexo 2. Cromatogramas de detecção e quantificação de microcistina-LR no fígado de *Oreochromis niloticus* exposto por via trófica à MC-LR na maior dose (4 µg L^{-1} dia^{-1}) por 60 dias – Capítulo I:

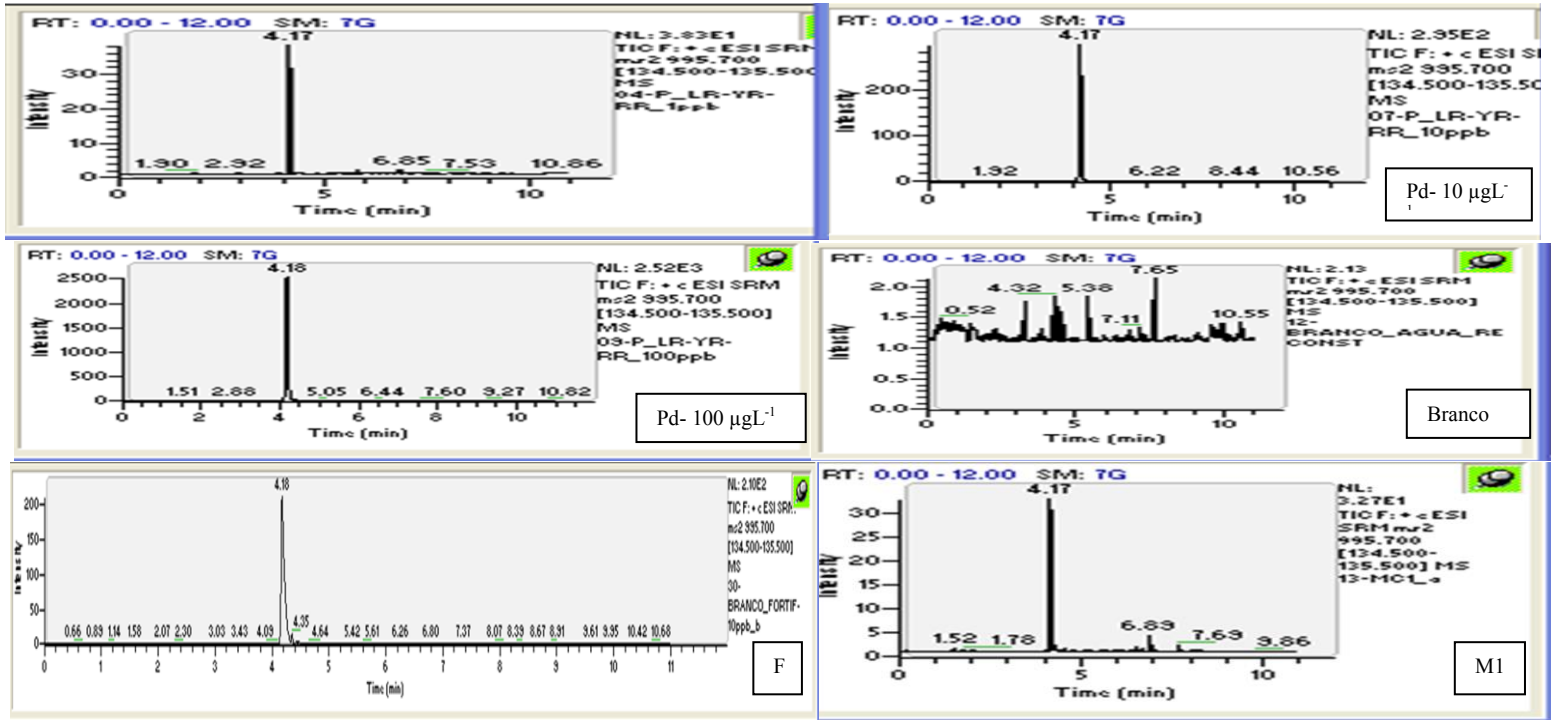


Legenda:PF3= amostra de fígado de *O. niloticus* exposto por via trófica à MC-LR na maior dose (4 µg L^{-1} dia^{-1}) por 60 dias de exposição; Pd= padrão. A= Transição 995.569/213.100 Da e B= Transição 995.569/135,500 Da.

Nota: as condições experimentais para a determinação da microcistina-LR em tecido de peixe estão descritas no item 2.2 do M&M geral.

Anexo 3: Cromatogramas da medição de microcistina-LR e piriproxifem em água – Experimento de exposição hídrica de embriões/larvas de *Rhamdia quelen* à microcistina e piriproxifem–Capítulo II:

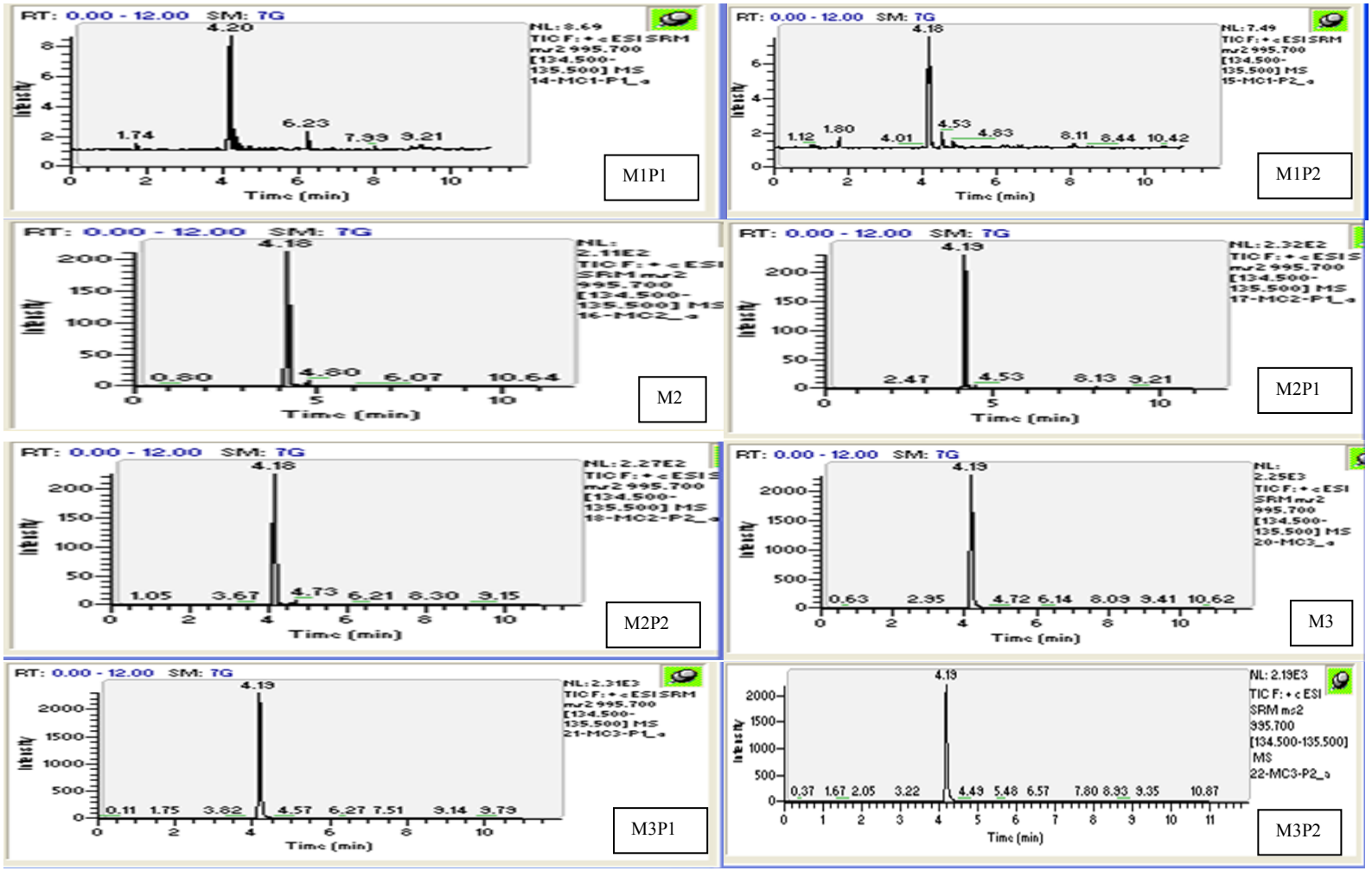
a) Resultados para a detecção e quantificação da Microcistina-LR em M1, M2 e M3 – respectivamente: 1, 10 e 100 µg L^{-1}, isoladamente ou em misturas com o piriproxifem em duas concentrações (P1= 10 µg L^{-1} e P2= 100 µg L^{-1}):



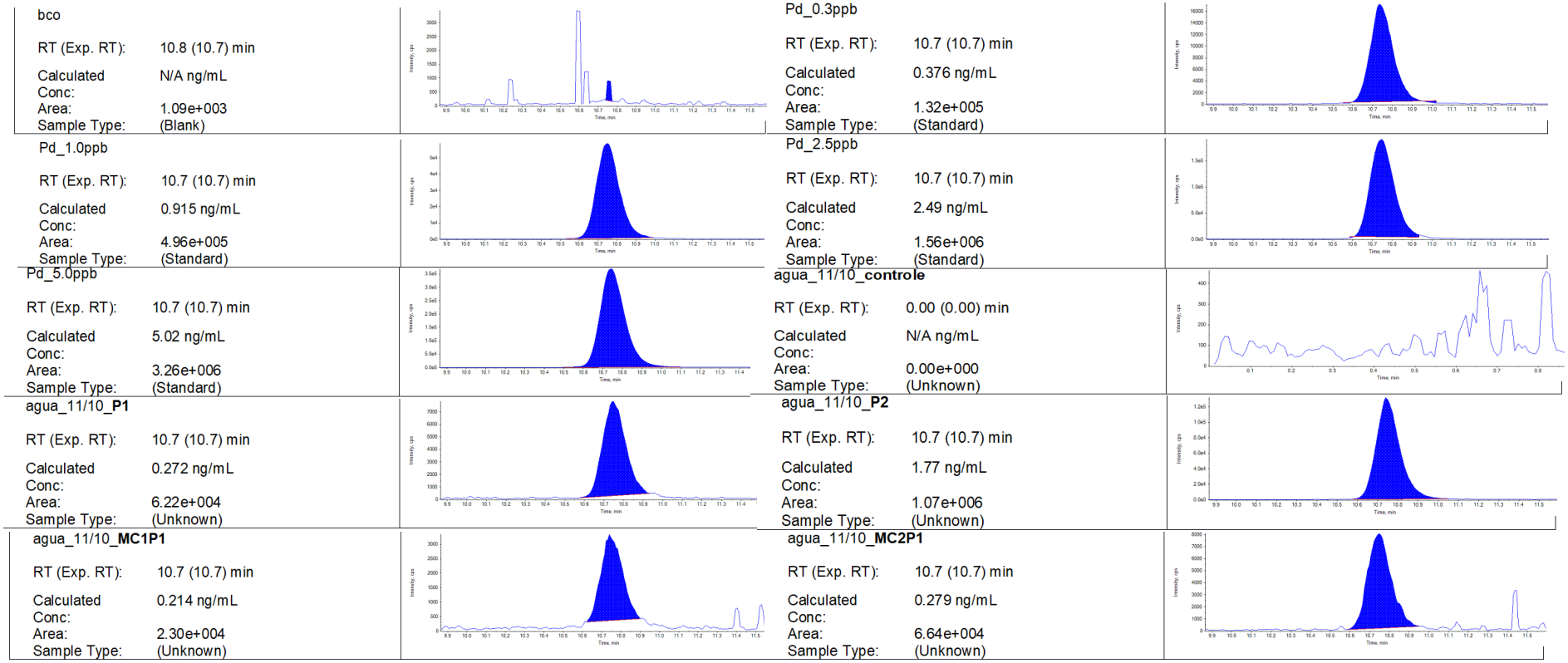
Legenda: Branco= amostra sem contaminação; Pd= padrões; F= fortificação da amostra com microcistina-LR para avaliar a recuperação.

Nota: as condições experimentais para a determinação da microcistina-LR nas amostras, assim como os grupos estão descritas no item 2.2 do M&M geral.

Continuação do Anexo 3.a)



b) Resultados para a detecção e quantificação do piriproxifem em P1 e P2, respectivamente, calculado para 10 µg L^{-1} e 100 µg L^{-1}), isoladamente ou em misturas com a microcistina-LR em três concentrações (M1= 1 µg L^{-1}, M2= 10 µg L^{-1} e M3=100 µg L^{-1}):



Legenda: Bco= amostra branca, sem contaminação; Pd= padrões; F= fortificação da amostra com piriproxifem para avaliar a recuperação.

Nota: as condições experimentais para a determinação do piriproxifem estão descritas no item 2.3 do M&M geral.

Continuação do anexo 3b)

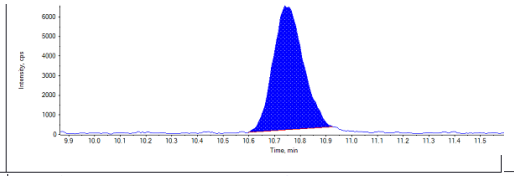
agua_11/10_**MC3P1**

RT (Exp. RT): 10.7 (10.7) min

Calculated Conc: 0.257 ng/mL

Area: 5.16e+004

Sample Type: (Unknown)



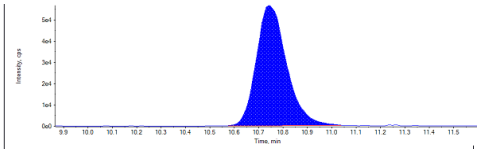
agua_11/10_**MC1P2**

RT (Exp. RT): 10.7 (10.7) min

Calculated Conc: 0.908 ng/mL

Area: 4.91e+005

Sample Type: (Unknown)



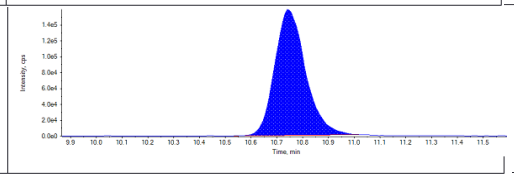
agua_11/10_**MC2P2**

RT (Exp. RT): 10.7 (10.7) min

Calculated Conc: 2.14 ng/mL

Area: 1.32e+006

Sample Type: (Unknown)



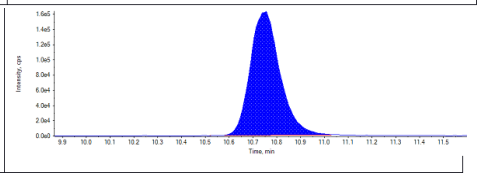
agua_11/10_**MC3P2**

RT (Exp. RT): 10.8 (10.7) min

Calculated Conc: 2.29 ng/mL

Area: 1.42e+006

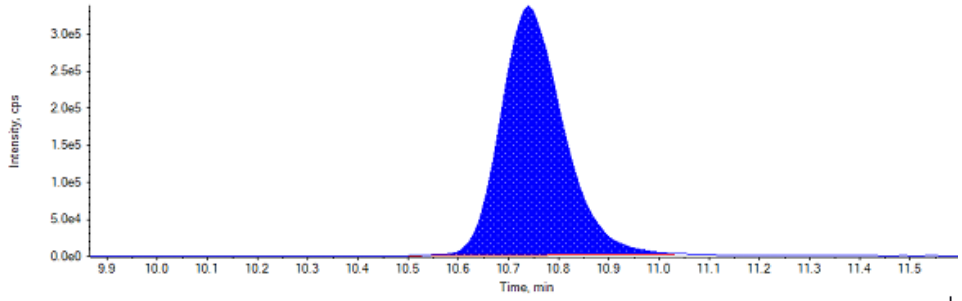
Sample Type: (Unknown)



agua_24/10_F

RT (Exp. RT): 10.7 (10.7) min

Calculated Conc: 4.48 ng/mL

Area: 2.90e+006

Sample Type: (Quality Control)