

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

**Éryka Costa de Almeida**

EFEITOS BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO PARA  
*Astyanax altiparanae* (TELEOSTEI: CHARACIDAE)

Itajubá - MG

2016

**ÉRYKA COSTA DE ALMEIDA**

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO PARA  
*Astyanax altiparanae* (TELEOSTEI: CHARACIDAE)**

Dissertação a ser apresentada para obtenção  
do título de Mestre em Meio Ambiente e  
Recursos Hídricos na Universidade Federal  
de Itajubá - MG.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Fonseca  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Cláudia B. R.  
Martinez

Itajubá - MG

2016

Aos meus pais, por todo o incentivo e  
confiança.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Fonseca, pela orientação neste trabalho, pelo conhecimento transmitido, por toda a confiança em mim depositada e por não me deixar desistir deste projeto.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, pela co-orientação, pela excelente recepção em seu ambiente de trabalho e por sua disponibilidade em fazer com que este projeto pudesse ser realizado e finalizado da melhor maneira possível.

Ao Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela oportunidade e pelas ótimas condições oferecidas para realização deste trabalho.

Ao pessoal do LEFA (e agregados): Paulo, Bruna, Carol, Taís, Rita, Lu, Laura, Millena, Cássia, Wagner, Laís, Monique, Angélica, Armando, Ju (e suas alunas de IC), e em especial, ao Carlos Eduardo por toda a ajuda em meus experimentos, pela ótima recepção e convivência no laboratório e por fazerem me sentir parte desta família!

À Prof<sup>a</sup> Dra. Cassiana Carolina Montagner Raimundo e seu orientando de mestrado Raphael Danna Acayaba do Laboratório de Química Analítica (LQA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), pela recepção em seu laboratório e pela análise dos compostos orgânicos presentes na água da microbacia do Ribeirão José Pereira, Itajubá – MG.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Raquel Moraes Soares e a sua aluna Lorena dos Santos Santiago do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela recepção em seu laboratório e pela ajuda em meu projeto.

Ao Prof. Dr. George Shigueki Yasui, Dr. Leonardo Luiz Calado e demais funcionários do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA) pela recepção, treinamento, dicas e doação de peixes e produtos para minha pesquisa.

Ao Oswaldinho, João Vitor, Elaine, Xandinho e demais funcionários da Universidade Federal de Itajubá (Unifei), pelo auxílio nas diversas tentativas de realização de meus experimentos.

Aos colegas de laboratório: Caroline, Ivan, Taís, Jéssica, Kelly, Katiúcia e Amanda, pela ajuda no projeto e convivência durante este período.

Aos colegas de mestrado, em especial aos amigos João Paulo, Maria da Penha, Tatiana e Kelly, pela amizade e apoio durante o curso.

Ao meu pai, Júlio, por toda a ajuda sempre que precisei! A minha mãe, Cláudia, irmãos, Marco Túlio e Juliana e, cunhados, Leandro e Josi, que também me ajudaram no que puderam e sempre me incentivaram em meus objetivos, apesar das preocupações e de minha ausência em diversos momentos.

Ao Otto e sua família: Hirene, tia Cida, Braz, Klaus (e Carol) e Max, por entenderem as exigências e as dificuldades para a realização deste trabalho e sempre me apoiarem, em especial ao Otto, pela ajuda e paciência!

Aos demais amigos e familiares que não foram citados, pelo apoio e amizade.

À Unifei pelo oferecimento do curso de Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos (MEMARH).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e de auxílios financeiros através do Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP).

*“A obrigação de tolerar, de suportar, dá-nos o direito de saber”.*

*(Jean Rostand)*

## RESUMO

O imidacloprido, um neonicotinóide, é o primeiro inseticida e o segundo agrotóxico mais vendido no mundo. Devido a sua elevada toxicidade para as abelhas e outros organismos não-alvo, já foi banido de alguns países e teve seu uso proibido na União Europeia. No Brasil, estudos já verificaram sua presença em recursos hídricos em concentrações acima dos valores de referência para proteção da vida aquática em água doce, utilizados pelo Canadá e Estados Unidos, sendo assim passível de causar efeitos subletais nestes organismos. Neste trabalho, espécimes do peixe neotropical *Astyanax altiparanae* foram expostos a quatro concentrações de uma formulação comercial deste agrotóxico (3, 30, 300 e 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ou apenas à água (controle), por 96 h. A fim de avaliar os efeitos genotóxicos e bioquímicos deste inseticida, amostras de sangue, brânquias, fígado, músculo e cérebro foram coletadas após a exposição. Como biomarcadores de genotoxicidade, a porcentagem de danos ao DNA e a frequência de micronúcleos (MN) e outras anormalidades nucleares (AENs) foram estimadas nos eritrócitos. Como biomarcador de biotransformação, a atividade da glutatona S-transferase (GST) foi determinada no fígado, brânquias, músculo e cérebro. Como biomarcadores de estresse oxidativo, a concentração da glutatona (GSH), a peroxidação lipídica (LPO) e a carbonilação proteica (PCO) foram quantificadas nos mesmos tecidos. Como biomarcador de neurotoxicidade, a atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi medida no cérebro e no músculo. Verificou-se que, dependendo da concentração, este inseticida pode causar alterações no status oxidativo que resultaram em danos oxidativos, como peroxidação lipídica, além de aumento na frequência de alterações eritrocíticas nucleares. Observou-se também que o órgão mais sensível à ação do imidacloprido foi o músculo, indicado pelos resultados dos ensaios de GSH, LPO e AChE, seguido das brânquias (pela LPO e PCO) e do cérebro (GST e LPO). Os biomarcadores mais sensíveis à ação deste neonicotinóide em *A. altiparanae* foram de GSH no músculo, LPO nas brânquias e de alterações nucleares nos eritrócitos. A concentração que causou mais alterações e danos significativos nos lambaris foi a de 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . No entanto, este resultado refere-se a uma exposição aguda de 96 h e exposições crônicas poderão fornecer resultados mais precisos no que se refere aos danos genotóxicos e bioquímicos do imidacloprido usando o *A. altiparanae* como modelo de investigação.

**Palavras-chaves:** Neonicotinóide; Lambari-do-rabo-amarelo; Biomarcadores Bioquímicos; Biomarcadores de Genotoxicidade.

## ABSTRACT

Imidacloprid, a neonicotinoid, is the first insecticide and the second pesticide best-selling in the world. Due to its high toxicity to bees and to other non-target organisms, it has been banned in some countries and had its use forbidden in the European Union. In Brazil, studies have verified its presence in water at concentrations above the reference values for the protection of aquatic life in freshwater, used by Canada and the United States, and thus likely to cause sublethal effects on these organisms. In this study, specimens of the neotropical fish *Astyanax altiparanae* were exposed to four concentrations of a commercial formulation of the pesticide (3, 30, 300 and 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) or only water (control) for 96 h. In order to evaluate the genotoxic and biochemical effects of this insecticide, samples of blood, gills, liver, muscle and brain were collected after the exposure. As genotoxicity biomarkers, the percentage of DNA damage and the frequency of micronuclei (MN) and other nuclear abnormalities (ENAs) were estimated in erythrocytes. As biomarker of biotransformation, the activity of glutathione S-transferase (GST) was determined in liver, gill, muscle and brain. As biomarkers of oxidative stress, the concentration of glutathione (GSH), lipid peroxidation (LPO) and protein carbonylation (PCO) were quantified in the same tissues. As biomarkers of neurotoxicity, acetylcholinesterase (AChE) activity was measured in brain and muscle. It has been found that, depending on the concentration, the insecticide may cause changes in oxidative status resulting in oxidative damage, such as lipid peroxidation, and increased frequency of erythrocytic nuclear abnormalities. It was also observed that the most sensitive organ to the action of imidacloprid was the muscle, indicated by the results of GSH, LPO and AChE assays, followed by the gills (indicated by PCO and LPO) and the brain (indicated by GST and LPO). The biomarkers most sensitive to the action of this neonicotinoid in *A. altiparanae* were GSH in the muscle, LPO in the gills and nuclear abnormalities in erythrocytes. The concentration that caused more significant alterations and damages in the lambaris was 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . However, this result refers to an acute exposure of 96 h and chronic exposures may provide more accurate results regarding the biochemical and genotoxic damage of imidacloprid using *A. altiparanae* as a research model.

**Key words:** Neonicotinoid; Lambari-do-rabo-amarelo; Biochemical biomarkers; Genotoxicity biomarkers.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Alguns processos que afetam o destino ambiental dos agrotóxicos.
- Figura 2 - Estruturas moleculares da nicotina e dos neonicotinóides.
- Figura 3 - Diagrama de uma sinapse no nervo colinérgico destacando o modo de ação dos neonicotinóides.
- Figura 4 - Hierarquia biológica e resposta a poluentes.
- Figura 5 - Quebra enzimática da acetilcolina.
- Figura 6 - Citosol e organelas de célula eucariótica animal.
- Figura 7 - Inter-relação entre as fases I, II e III do metabolismo de xenobióticos.
- Figura 8 - Conjugação da glutatona com um xenobiótico catalisada pela glutatona S-transferase.
- Figura 9 - Fórmula estrutural da glutatona.
- Figura 10 - Mecanismo da peroxidação lipídica.
- Figura 11 - Rotas de formação de carbonilas proteicas (em destaque).
- Figura 12 - Princípios dos efeitos genotóxicos.
- Figura 13 - Princípio do ensaio cometa.
- Figura 14 - Representação de alterações eritrocíticas nucleares (AENs).
- Figura 15 - Formação de micronúcleos em células com dano ao DNA.
- Figura 16 - *Astyanax altiparanae* (lambari-do-rabo-amarelo).
- Figura 17 - Tanque de aclimatação dos peixes.
- Figura 18 - Sistema de exposição dos peixes *A. altiparanae* ao Imidacloprido.
- Figura 19 - Alteração da cor do corante *Comassie Brilliant Blue G-250* em presença de proteínas.
- Figura 20 - Reação da GSH com DTNB.
- Figura 21 - Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDNB.
- Figura 22 - Reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e malondialdeído (MDA).
- Figura 23 - Reação de carbonilas com DNPH, formando hidrazonas.
- Figura 24 - Método de determinação da atividade da acetilcolinesterase.
- Figura 25 - Micrografias dos tipos de dano ao DNA verificados no ensaio cometa.
- Figura 26 - Diferentes tipos de anormalidades observadas nos eritrócitos de *A. altiparanae*.
- Figura 27 - Conteúdo de GSH nos tecidos hepático, branquial e muscular de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido:  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI

3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300), 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96 h.

Figura 28 - Atividade da GST nos tecidos hepático, branquial, cerebral e muscular de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300), 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96h.

Figura 29 - Quantificação da peroxidação lipídica (LPO) nos tecidos hepático, branquial, cerebral e muscular de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300), 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96h.

Figura 30 - Quantificação da carbonilação proteica (PCO) nos tecidos hepático, branquial, cerebral e muscular de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300), 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96h.

Figura 31 - Atividade da AChE no cérebro e músculo de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300), 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96h.

Figura 32 - Escore de danos no DNA em eritrócitos de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300), 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96h.

Figura 33 - Frequência de AENs nos peixes expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300), 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96h.

Quadro 1 - Exemplos de estudos utilizando biomarcadores para avaliar os efeitos de agrotóxicos em peixes.

Quadro 2 - Espécies reativas de oxigênio (ERO).

Quadro 3 - Determinação das diferentes classes de dano do ensaio cometa.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições para homogeneização dos tecidos.

Tabela 2 - Parâmetros físicos e químicos da água de aclimação e de exposição dos peixes por grupo experimental.

Tabela 3 - Quantidade de cada tipo de dano e total de nucleóides danificados nos peixes expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300), 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96h.

Tabela 4 - Quantidade de cada tipo de alteração eritrocítica e frequência de EI, MN e AEN em 3000 eritrócitos analisados nos peixes expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300), 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96h.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
5-OH-IMI	5-Hidroxi-Imidacloprido
ABCVP	Associação Brasileira de Controle de Vetores e Pragas
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AENs	Anormalidades Eritrocíticas Nucleares
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CB	Células Binucleadas
CDNB	1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno
CEPTA	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal para 50% da população teste
CYP	Citocromo P450
Cys	Cisteína
CTR	Controle
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DL <sub>50</sub>	Dose Letal para 50% da população teste
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
DP	Desvio Padrão
DTNB	Ácido 5,5-Ditiobis 2-Nitrobenzóico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EI	Eritrócitos Imaturos
EP	Erro Padrão
EPI	Equipamento de Proteção Individual
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FAO	Órgão das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
Gly	Glicina

Glu	Ácido Glutâmico
GSH	Glutathiona Reduzida
GST	Glutathiona S-Transferase
GSTNB	Aduto Glutathiona - Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Iniciação Científica
IMI	Imidacloprido
LC-MSMS	Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas
LEFA	Laboratório de Ecofisiologia Animal
LETC	Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias
LMP	Baixo Ponto de Fusão
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LPO	Lipoperoxidação ou Peroxidação Lipídica
LQA	Laboratório de Química Analítica
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA	Malondialdeído
MEMARH	Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MN	Micronúcleo
MS	Ministério da Saúde
nAChR	Receptor Nicotínico de Acetilcolina
NL	Núcleo Lobulado
NMP	Ponto de Fusão Normal
NR	Núcleo em Forma de Rim
NS	Núcleo Segmentado
NTU	Unidade de Turbidez Nefelométrica
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PCO	Carbonilação Proteica
pH	Potencial Hidrogeniônico
PROAP	Programa de Apoio à Pós-Graduação

PUFA	Ácido Graxo Insaturado de um Fosfolípídeo
Sinan	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SNCR	Sistema Nacional de Crédito Rural
SPE	Extração em Fase Sólida
SST	Sólidos Solúveis Totais
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
Tris	Tris (Hidroximetil) Aminometano
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
Unifei	Universidade Federal de Itajubá

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	17
2.1 AGROTÓXICOS	17
<b>2.1.1 Neonicotinóides</b>	22
2.2 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	28
2.3 BIOMARCADORES	29
<b>2.3.1 Biomarcadores Bioquímicos</b>	32
<b>2.3.2 Biomarcadores de Genotoxicidade</b>	39
2.4 ORGANISMO-TESTE	43
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	46
3.1 ACLIMATAÇÃO	46
3.2 EXPOSIÇÃO AO IMIDACLOPRIDO	46
3.3 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA	47
3.4 AMOSTRAGEM DOS EXEMPLARES DE <i>A. altiparanae</i>	47
3.5 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	48
3.6 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE	51
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
<b>4 RESULTADOS</b>	55
4.1 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS	55
4.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	55
4.3 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE	59
<b>5 DISCUSSÃO</b>	62
<b>6 CONCLUSÃO</b>	67
<b>REFERÊNCIAS</b>	68
<b>ANEXO A</b>	80

## 1 INTRODUÇÃO

A monocultura extensiva propicia o crescimento de espécies que a utilizam como alimento e a utilização de agrotóxicos pode selecionar os organismos mais resistentes, fazendo com que seja necessário aplicar doses cada vez mais elevadas e com maior frequência. O uso indiscriminado destes compostos pode causar danos a organismos não-alvo, além de poder contaminar o solo, o ar, a água e os alimentos, podendo intoxicar também os seres humanos. Em 2008, o Brasil assumiu a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos, sendo que das 50 substâncias mais utilizadas no país, 22 já foram proibidas pela União Europeia (CARNEIRO et al., 2015).

Alguns inseticidas sistêmicos, como os neonicotinóides, são utilizados de forma profilática, antes mesmo da ocorrência de “pragas” e doenças. O neonicotinóide imidacloprido é o primeiro inseticida e o segundo agrotóxico mais vendido no mundo (SIMON-DELSO et al., 2015). Devido a sua elevada toxicidade para as abelhas e outros organismos não-alvo, já foi banido de alguns países e teve seu uso proibido na União Europeia (BÚRIGO et al., 2015). No Brasil, já foi verificado em recursos hídricos em concentrações acima dos valores de referência para proteção da vida aquática em água doce, utilizados pelo Canadá e Estados Unidos (BORTOLUZZI et al., 2006; ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015).

A contaminação dos recursos naturais por essas substâncias pode fazer com que as espécies mais resistentes sejam selecionadas, modificando a biota e podendo levar a um desequilíbrio ambiental. Além do fato de que estes agrotóxicos podem causar a contaminação de animais e plantas e, inclusive, levar espécies inteiras à extinção.

Para proteger estes organismos, é preciso que sejam tomadas ações preventivas como, por exemplo, analisar os efeitos subletais dessas substâncias antes mesmo que elas causem danos irreversíveis. De acordo com Augusto et al. (2015, p. 131):

As transformações no meio ambiente e as alterações no nível bioquímico são as primeiras respostas detectáveis e quantificáveis, constituindo-se em indicadores mais sensíveis porque podem ser detectados com um tempo de exposição mais curto do que o demandado nas observações de efeito nos organismos biológicos.

Assim, dada a importância de se evidenciar as alterações bioquímicas e moleculares da exposição de organismos aquáticos a agrotóxicos, objetivou-se nesta pesquisa avaliar os efeitos do imidacloprido em um peixe neotropical do Brasil. Trata-se do lambari, mais especificamente da espécie *Astyanax altiparanae* (Garutti e Brittsk, 2000), a qual apresenta



importante papel na cadeia alimentar de ecossistemas de águas interiores e ampla distribuição geográfica (GARUTTI, 2003).

Exemplares desta espécie foram expostos a concentrações do inseticida que variaram de 3 a 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo que a menor concentração foi definida com base em análises realizadas em amostras de água da microbacia do Ribeirão José Pereira (Itajubá-MG). Esta é utilizada como fonte de abastecimento de água pela população de Itajubá, sendo assim de grande relevância regional.

Vale ressaltar que tanto a escolha deste inseticida, quanto do organismo-teste teve como princípio contribuir com informações científicas inéditas, além de fornecer dados que pudessem ser utilizados em programas de conservação desta microbacia.

### 1.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se a exposição aguda ao inseticida Imidacloprido promove alterações bioquímicas e danos genotóxicos no peixe *Astyanax altiparanae*.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar se a exposição de *A. altiparanae* a diferentes concentrações de Imidacloprido, durante 96 h, promove:

- Alterações na atividade da enzima de biotransformação (glutathione S-transferase) em fígado, músculo, cérebro e brânquias;
- Alterações no conteúdo de antioxidante (glutathione) em fígado, músculo e brânquias;
- Aumento na ocorrência de lipoperoxidação e carbonilação proteica em fígado, músculo, cérebro e brânquias;
- Redução na atividade da acetilcolinesterase em cérebro e músculo;
- Ocorrência de danos genéticos em eritrócitos.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 AGROTÓXICOS

A utilização de agrotóxicos em larga escala ganhou força após a Segunda Guerra Mundial, com aplicações na agricultura, na pecuária e no controle de vetores de doenças. Esses produtos químicos foram inicialmente sintetizados pelas indústrias bélicas como armas químicas para serem utilizadas nas guerras durante as primeiras décadas do século XX. Seu uso disseminou-se pelo mundo como uma “tentativa de derrotar a fome através da Revolução Verde” e combater vetores de doenças, tendo como principais apoiadores o Banco Mundial, a FAO (Órgão das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura) e a saúde pública (LONDRES, 2011; CARNEIRO et al., 2015).

O primeiro produto a ser sintetizado para estes fins foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT) em 1939, como um potente inseticida organoclorado. O uso indiscriminado desta e de outras substâncias químicas causou diversos prejuízos à fauna, à flora e aos seres humanos. Em 1962, estes danos foram denunciados e tornados públicos por Rachel Carson em seu livro *Silent Spring* (Primavera Silenciosa). Segundo a autora:

Estes borrifos, estes pós, estes aerossóis são agora aplicados quase que universalmente em fazendas, em jardins, em florestas, em residências; são substâncias químicas não-seletivas, que têm poder para matar toda espécie de insetos, tanto os “bons” como os “maus”; têm poder para silenciar o canto dos pássaros e para deter o pulo dos peixes nas correntezas; para revestir as folhas das plantas com uma película mortal, e para perdurar, embebidas no solo. Tudo isto, de uma só vez, ainda que o objetivo desejado seja apenas a eliminação de umas poucas ervas, ou uns poucos insetos. Pode alguém acreditar que seja possível instituir semelhante barragem de venenos, sobre a superfície da Terra, sem a tornar inadequada para a vida toda? Tais substâncias não deveriam ser denominadas “inseticidas”, e sim “biocidas” (CARSON, 1969, p. 18).

Após estudos complementares, a publicação desta obra culminou na proibição do DDT nos EUA e em outros países na década de 1970. No Brasil, a utilização de agrotóxicos iniciou-se entre as décadas de 1960 e 1970, mas foi somente em 1985 que o DDT teve sua autorização para uso agrícola cancelada. Esta substância continuou sendo utilizada em campanhas de saúde pública até sua proibição em 1998, mas seu banimento definitivo só veio em 2009 com a Lei 11.936/2009 (AUGUSTO et al., 2015).

Os agrotóxicos foram inicialmente denominados no Brasil como defensivos agrícolas ou agroquímicos (englobando também os fertilizantes e os adubos inorgânicos). Estes termos

excluía de seu significado a utilização destes produtos em campanhas de saúde pública e ainda os dava uma conotação positiva, mascarando seus danos aos seres vivos em geral. Na língua inglesa e espanhola os termos utilizados são, respectivamente, pesticidas (*pesticides*) e praguicidas (*plaguicidas*), os quais também ocultam de seu significado seus efeitos nocivos aos seres humanos (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003; PETERSEN, 2015).

A mudança de terminologia no Brasil ocorreu em 1989 com a publicação da Lei Federal nº 7.802 (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003). Esta lei instituiu o termo agrotóxicos, os definindo como produtos e agentes de processos químicos, físicos ou biológicos, que agem na proteção contra danos causados por organismos nocivos ou ainda que atuem como estimuladores ou inibidores de crescimento, dessecantes e desfolhantes. São utilizados na produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, em ambientes hídricos, urbanos e industriais e em pastagens, florestas e outros ecossistemas (BRASIL, 1989).

A implementação de agrotóxicos no Brasil foi incentivada pelo governo federal através de diversas políticas públicas. O Plano Nacional de Defensivos Agrícolas, por exemplo, concedia empréstimos aos produtores rurais por meio do Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR) com a condição de que eles investissem uma porcentagem deste valor na compra de agrotóxicos (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003; CARNEIRO et al., 2015).

O mercado destes produtos foi crescendo e atraindo grandes indústrias químicas para o Brasil, especialmente na década de 1980, em que os países desenvolvidos começaram a restringir o uso de agrotóxicos, gerando uma migração destas empresas para os países em desenvolvimento (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003). As transnacionais que controlam esse segmento do mercado nacional atualmente são: Bayer, Basf, Dow AgroScience, Dupont, Monsanto e Syngenta (AUGUSTO et al., 2015).

Até a publicação da Lei Federal nº 7.802, para serem registrados, os agrotóxicos precisavam passar apenas por avaliações toxicológicas (realizadas pelo Ministério da Saúde) e de eficácia agrônômica (feita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA). A partir de 1989 começaram a ser exigidas também a classificação e avaliação do potencial de periculosidade ambiental (executadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/Ministério do Meio Ambiente, Ibama/MMA). Já os produtos de uso veterinário, apesar de muitas vezes apresentarem os mesmos princípios ativos dos agrotóxicos, são avaliados apenas pelo MAPA, de acordo com o Decreto 5.053/04, atualizado pelo Decreto 6.296/07 (BRASIL, 2004, 2007).

A classificação toxicológica dos agrotóxicos pela Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Saúde é feita de acordo com seus efeitos agudos em ratos, principalmente. Esse método diferencia os produtos em diferentes classes: I - extremamente tóxico, II - altamente tóxico, III - mediamente tóxico e IV - pouco tóxico e em faixas: vermelha, amarela, azul e verde, respectivamente. A classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental pelo Ibama baseia-se na característica, no comportamento, no destino e na toxicidade do produto a organismos não-alvo. E segue o mesmo padrão de classes acima: I - altamente perigoso (vermelho), II - muito perigoso (laranja), III - perigoso (amarelo) e IV - pouco perigoso (verde) (IBAMA, 2013b; KARAM; RIOS; FERNANDES, 2014).

Os agrotóxicos também podem ser classificados quanto ao uso a que se destinam: inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas/raticidas, acaricidas, nematicidas, bactericidas/fumigantes, moluscidas, cupinicidas, formicidas, adjuvantes, espalhantes, reguladores de crescimento, protetores de sementes e feromônios (IBAMA, 2013a; KARAM; RIOS; FERNANDES, 2014).

Esses produtos podem ser classificados ainda de acordo com a classe química a que pertencem: inorgânicos, extratos vegetais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides sintéticos, dinitrofenóis, fenoxiacéticos, dipiridilos, benzonitrilas, glifosato, hidrocarbonetos halogenados, triazol, benzimidazol, neonicotinóides e várias outras ( PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003; CARNEIRO et al., 2015).

O Brasil possui registro de aproximadamente 1.400 formulações de agrotóxicos, 430 ingredientes ativos e 750 produtos técnicos, sendo que das 50 substâncias mais utilizadas, 22 já foram proibidas na União Europeia (CARNEIRO et al., 2015).

O mercado brasileiro destes produtos cresceu 190%, enquanto o mercado mundial cresceu apenas 93%, entre 2002 e 2012 e, a partir de 2008, o Brasil assumiu a posição de maior consumidor de agrotóxicos do mundo (CARNEIRO et al., 2015).

O consumo nacional de ingredientes ativos por área plantada sofreu um aumento de 113% ( $\text{Kg ha}^{-1}$ ) entre 2000 e 2013 (IBGE, 2015). Alcançando o valor de venda interna de 666.510,73 toneladas de ingredientes ativos em 2013, sendo que os dez mais utilizados foram: glifosato e seus sais, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), atrazina, óleo mineral, acefato, óleo vegetal, clorpirifós, metomil, mancozebe e imidacloprido. E as classes de agrotóxicos recordistas de vendas nacionais foram os herbicidas, fungicidas e inseticidas (IBAMA, 2013a).

Os cinco estados brasileiros que mais comercializaram agrotóxicos e afins por área plantada ( $\text{Kg ha}^{-1}$ ) neste mesmo ano foram: São Paulo com 7,4% do total, Goiás com 6,8%,

Mato Grosso com 5,6%, Santa Catarina com 5,5% e Minas Gerais com 5,3% (IBGE, 2015).

Ainda neste ano (2013), 80% dos agrotóxicos vendidos no Brasil foram utilizados nas culturas de commodities agrícolas (soja, cana, milho e algodão), sendo que a soja foi responsável por cerca de metade do consumo, o qual não foi proporcional ao aumento de produção. Enquanto o incremento na venda de agrotóxicos foi de 162% (toneladas) entre 2000 e 2012, o aumento da produção de soja foi de 100%, do milho de 120%, da cana-de-açúcar de 121% e do algodão de 147% (BÚRIGO et al., 2015).

Segundo dados publicados no jornal “Estadão”, em 10 anos (safras 2004/2005-2014/2015) houve um aumento de 64% no consumo de ingredientes ativos de agrotóxicos e afins no Brasil enquanto a quantidade de área plantada sofreu uma elevação de apenas 16,9% em hectares (ESCOBAR, 2015).

Essa desproporcionalidade entre uso de agrotóxicos, área plantada e produção agrícola ocorre devido à diminuição da eficiência dessas substâncias com o aumento do número de aplicações. Isto deve-se ao fato de os agrotóxicos eliminarem tanto as “pragas” quanto seus predadores e competidores, além de que os organismos mais resistentes podem sobreviver e se reproduzir, levando à necessidade da utilização de maiores quantidades de agrotóxicos ou de novos produtos (FERREIRA et al., 2006; LONDRES, 2011).

A elevação do consumo destas substâncias tóxicas faz com que cresçam também os casos de contaminação no país. De 2007 a 2011, houve um aumento de 67,3% no número de casos de intoxicação por agrotóxicos notificados pelo Sistema Nacional de Agravos de Notificação (Sinan). Segundo estimativa do Ministério da Saúde (MS), mais de quatrocentas mil pessoas se contaminam anualmente, com cerca de quatro mil mortes. A Organização Internacional do Trabalho e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que os países em desenvolvimento apresentem anualmente mais de sete milhões de casos de doenças agudas e crônicas não fatais causadas por agrotóxicos e setenta mil casos que levam a óbito (AUGUSTO et al., 2015).

Essas contaminações ocorrem, primeiramente, pela toxicidade dos agrotóxicos, mas podem ser agravadas pelo uso inadequado de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), pela falta de qualificação para lidar com esses produtos e entender as informações contidas nos rótulos e pelo descarte incorreto das embalagens utilizadas pelos usuários (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003; AUGUSTO et al., 2015).

A contaminação também pode ser proveniente de resíduos de agrotóxicos em alimentos, principalmente por produtos não registrados para determinadas culturas e, portanto, não permitidos para consumo humano (KARAM; RIOS; FERNANDES, 2014). Segundo o

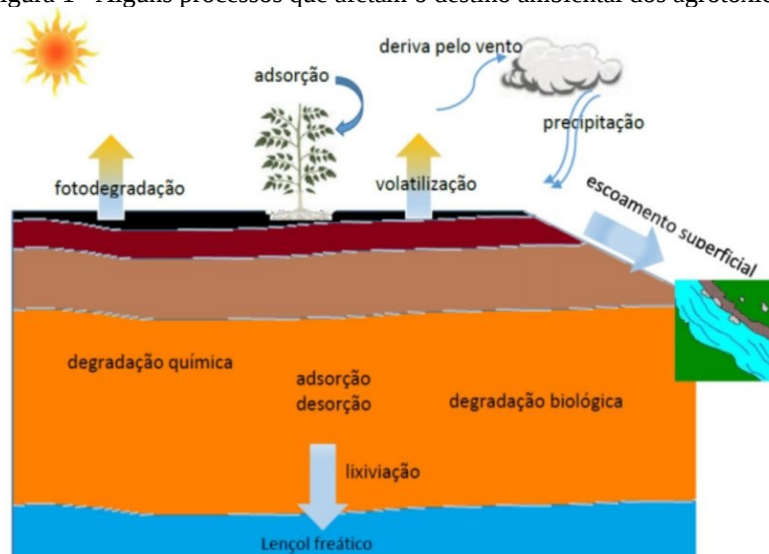
relatório de atividade do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA/ANVISA), em 2012 foram analisadas as culturas de abacaxi, arroz, cenoura, laranja, maçã, morango e pepino. Desses alimentos, 29% apresentaram resultados insatisfatórios (presença de resíduos de produtos não autorizados, ou autorizados mas acima do Limite Máximo de Resíduos, LMR), 35% satisfatórios com resíduos abaixo do LMR e apenas 36% satisfatórios sem resíduos. Ou seja, 64% das amostras apresentaram resíduos de agrotóxicos (BÚRIGO et al., 2015).

Contaminações também podem ocorrer na área urbana por produtos denominados domissanitários utilizados em campanhas de saúde pública, em jardinagem, na preservação de madeira, como raticidas e para usos veterinários. Os mais vulneráveis são os trabalhadores de empresas de dedetização, agentes de vigilância em saúde, crianças, idosos e pessoas alérgicas ou com imunodepressão. Esses produtos apresentam os mesmos princípios ativos dos agrotóxicos e, portanto, os mesmos riscos. Também podem aumentar a resistência das espécies-alvo, levando à necessidade da aplicação de quantidades mais elevadas, com maior frequência ou o uso de substâncias ainda mais tóxicas (BÚRIGO et al., 2015).

Nem o ambiente doméstico está protegido desses riscos, os produtos químicos utilizados para matar mosquitos, baratas, cupins, ratos e outras “pragas” também contém essas substâncias; assim como os “remédios” que são utilizados em animais para matar pulgas e carrapatos. E não há um controle quanto a venda e o uso destes produtos, deixando a população, os animais e o ambiente em geral ainda mais desprotegidos. Segundo dados da Associação Brasileira de Controle de Vetores e Pragas (ABCVP), esse mercado movimentava anualmente mais de um bilhão de reais, com previsões de crescimento. Em 2012, existiam 3.589 empresas nesse setor, sendo que cerca de 50% atuavam na informalidade (AUGUSTO et al., 2015).

Os agrotóxicos também podem atingir o ar, o solo, e a água, por “deriva na aplicação [...], lavagem das folhas tratadas, lixiviação, erosão, aplicação direta em águas para controles de vetores de doenças, resíduos de embalagens vazias, lavagens de equipamentos de aplicação e efluentes de indústrias de agrotóxicos”, entre outras formas (FERREIRA et al., 2006, p. 318). “A dissipação [destes] no ambiente é resultado do conjunto de processos de transporte e transformação” (Figura 1) (SPADOTTO et al., 2010, p. 8). Estes contaminantes podem ser transportados para fora das áreas de origem, podendo prejudicar não só a população de seu entorno, mas também as mais distantes. A contaminação de um manancial hídrico, por exemplo, pode afetar até a população de uma cidade mais distante que se abasteça com aquela água.

Figura 1 - Alguns processos que afetam o destino ambiental dos agrotóxicos.



Fonte: Adaptado de Spadotto et al. (2010) por Rebelo e Caldas (2014).

O monitoramento dessas substâncias na água ainda é muito escasso no Brasil. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, entre 2011 e 2012, 76% dos municípios brasileiros não dispunham de dados sobre contaminação da água e das 18 unidades da federação que fizeram o monitoramento, 55,6% apresentaram quantidades de agrotóxicos acima dos valores permitidos. Dos 450 ingredientes ativos de agrotóxicos registrados no país, é exigida pelo Ministério da Saúde (Portaria n. 2914 de 12 de dezembro de 2011 - Padrões de Potabilidade) a análise de 27. Contudo, de acordo com o Ministério Público Federal de Mato Grosso do Sul, o laboratório responsável por essas análises investiga apenas 15 dessas substâncias em todo o Brasil (BÚRIGO et al., 2015).

E como a validade do registro dos agrotóxicos é *ad eternum*, é de extrema importância que sejam feitas reavaliações toxicológicas periódicas dessas substâncias. Este processo deve ser realizado sempre que houver alertas de organizações internacionais, com as quais o Brasil mantém relação, ou publicações de pesquisas que constatem novos efeitos prejudiciais à saúde, de acordo com os critérios de proibição da Lei 7.802/89 (BRASIL, 1989, BÚRIGO et al., 2015).

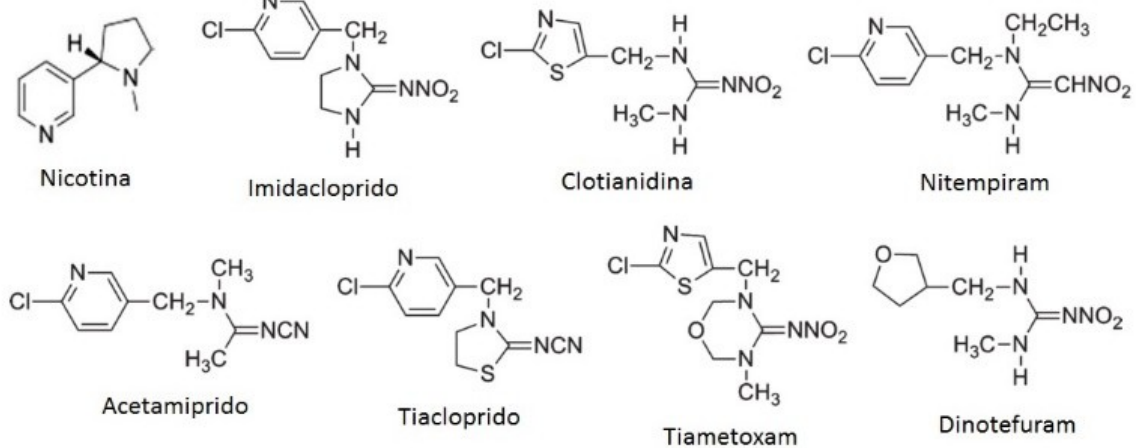
### 2.1.1 Neonicotinóides

“Neonicotinóides” foi o termo criado por Izuru Yamamoto para a nova geração de inseticidas nicotinóides, termo também criado por Yamamoto para designar os compostos estruturalmente semelhantes à nicotina (JESCHKE; NAUEN, 2008). Estes compostos são, em sua maioria, polares e não voláteis. Foram desenvolvidos na década de 1980 para substituir os

inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides que não conseguiam mais combater as espécies que se tornaram resistentes. Atualmente, compõem a classe de inseticidas mais utilizada no mundo (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015; SIMON-DELISO et al., 2015), estando registrados em mais de 120 países e em 2008 já representavam 24% do mercado global de inseticidas e 80% do mercado de tratamento de sementes (JESCHKE et al., 2011).

Os compostos neonicotinóides disponíveis para comercialização (Figura 2) são: imidacloprido e tiacloprido (desenvolvidos pela Bayer CropScience), clotianidina (Bayer CropScience e Sumitomo), tiametoxam (Syngenta), acetamiprido (Nippon Soda), nitempiram (Sumitomo) e dinotefuram (Mitsui Chemicals). Há ainda outros compostos sendo desenvolvidos e analisados para introdução no mercado (SIMON-DELISO et al., 2015).

Figura 2 - Estruturas moleculares da nicotina e dos neonicotinóides.



Fonte: Adaptado de Uneme (2011).

As principais características desta classe são: alta eficiência e versatilidade na aplicação, natureza sistêmica (são absorvidos pelas raízes ou folhas e translocados por toda a planta), amplo espectro de ação e toxicidade seletiva a artrópodes, alta solubilidade em água e persistência no organismo (UNEME, 2011; SIMON-DELISO et al., 2015).

Estes inseticidas são empregados na “proteção” de cultivos e plantas ornamentais, no controle de “pragas” urbanas, em rizipiscicultura e até em produtos veterinários. Podem ser aplicados de diversas maneiras: pulverização, tratamento de sementes, tratamento do solo, aplicação granular, imersão de mudas, encharcamento do solo, injeção no tronco de árvores, irrigação, encharcamento de bulbos de flores, pincelamento em caules de árvores frutíferas, entre outras. O método mais conhecido e utilizado é o de revestimento de sementes, que age profilaticamente sobre a planta, antes mesmo do aparecimento de “pragas” (SIMON-DELISO et al., 2015).



Após serem absorvidos pelas folhas e raízes, esses agrotóxicos e seus metabólitos são sistematicamente transportados por toda a planta, tornando-a tóxica aos insetos por determinado período de tempo, o qual varia de acordo com as características da planta e com a quantidade aplicada de inseticida. Segundo Simon-Delso et al. (2015) os seres humanos e outros animais podem se alimentar dessas plantas e também ficarem expostos a esses compostos, os quais podem ser rapidamente absorvidos pela parede intestinal.

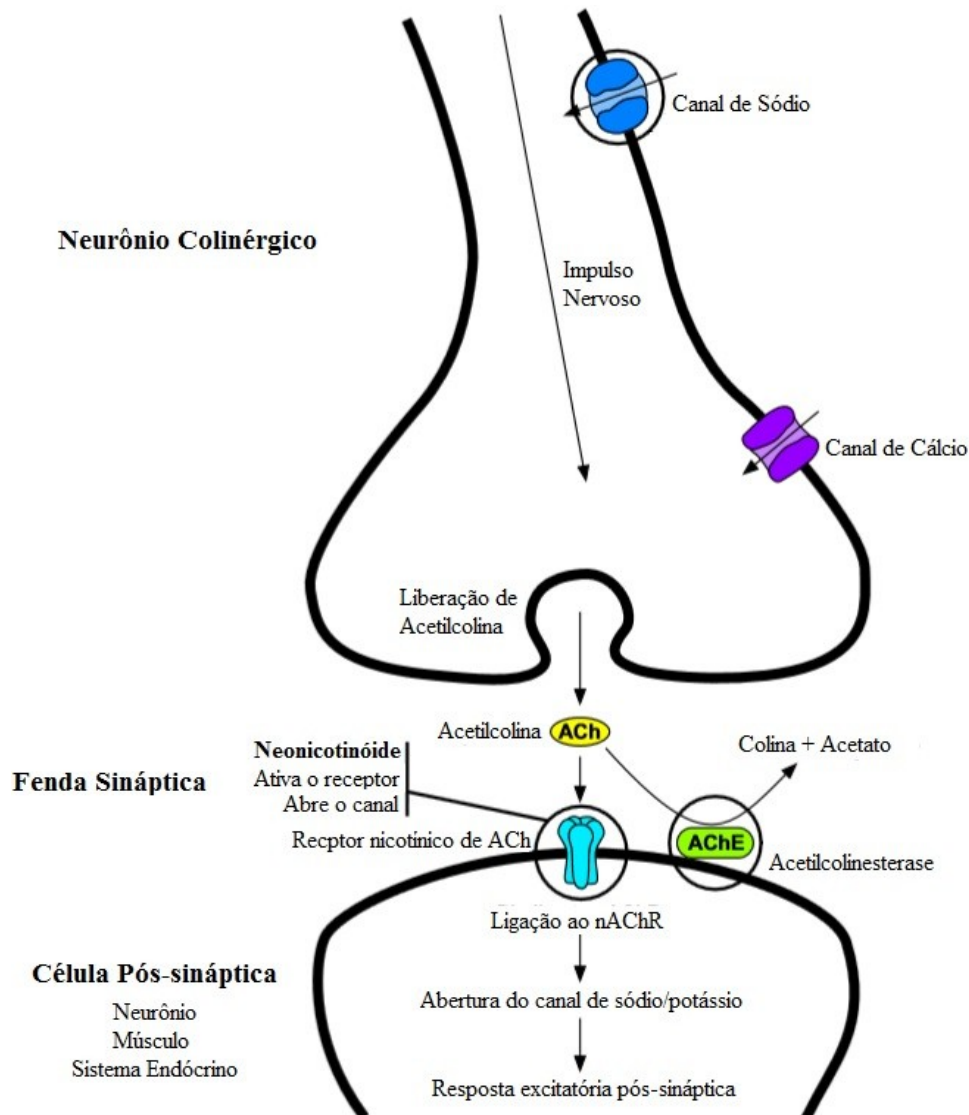
Ao entrar no organismo, os neonicotinóides podem ser biotransformados em duas etapas. Na fase I do metabolismo, ocorrem reações de desmetilação, redução do grupo nitro, hidrólise do grupo ciano, hidroxilação dos grupos imidazolidina e tiazolidina acompanhada da formação de olefinas, hidroxilação do grupo oxadiazina resultando na abertura do anel e descloração dos grupos cloropiridinila e clorotiazolil. Na fase II ocorre a formação de conjugados, a qual acontece de maneira diferenciada em plantas e animais (SIMON-DELSON et al., 2015), facilitando a excreção dos metabólitos e produtos formados da célula.

Os neonicotinóides interferem no sistema nervoso central e periférico dos artrópodes, mais especificamente, na neurotransmissão pós-sináptica, induzindo a contínua excitação das membranas neurais, podendo causar paralisia, exaustão celular e até a morte. Eles interagem de forma agonista com sub-sítios específicos dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) de insetos (Figura 3), ligando-se de forma saturável e reversível. Estes receptores são os mesmos ou estão fortemente associados aos da acetilcolina (ACh), o que impede sua ligação, causando a constante estimulação do receptor e podendo levar a diminuição da atividade da acetilcolinesterase (AChE). Devido a essa especificidade, a toxicidade a vertebrados é menor e a reversibilidade da intoxicação, maior; mas em concentrações elevadas, os neonicotinóides também podem causar efeitos tóxicos nestes organismos. Em peixes, a constante estimulação destes receptores pode diminuir a ventilação e a locomoção destes, diminuindo as chances de fuga de predadores, podendo assim ter consequências ecológicas e populacionais (AZEVEDO-PEREIRA; LEMOS; SOARES, 2011; ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015; GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015; SIMON-DELSON et al., 2015).

As principais famílias de “pragas” combatidas pelos neonicotinóides são: Aphidae (pulgões), Aleyrodidae (moscas brancas), Cicadellidae (cigarrinhas), Chrysomelidae (besouros de folha), Elateridae (besouros tec-tec) e Pseudococcidae (cochonilhas-farinhentas), mas algumas espécies têm apresentado resistência a esses inseticidas (SIMON-DELSON et al., 2015). Eles também podem causar efeitos tóxicos a organismos não-alvo, como por exemplo a morte de abelhas, motivo pelo qual já foram banidos ou tiveram sua licença suspensa em

alguns países, como Alemanha, França e Itália (RIGOTTO et al., 2015).

Figura 3 - Diagrama de uma sinapse no nervo colinérgico destacando o modo de ação dos neonicotinóides.



Fonte: Adaptado de Amiard-Triquet, Amiard e Mouneyrac (2015).

Estes inseticidas podem atingir ainda outros compartimentos ambientais, de 72 a 98,4% dos neonicotinóides aplicados no campo alcançam o ar, o solo e a água. Após e durante o borrifamento destes produtos, devido a sua baixa volatilidade, eles geralmente se encontram na forma de aerossóis, os quais podem ser rapidamente fotodegradados. A adsorção dos neonicotinóides no solo depende das características deste compartimento (tipo, umidade e quantidade de matéria orgânica), podendo persistir de dias a semanas. Isto torna as chances de ocorrência de escoamento superficial e lixiviação maiores após eventos de chuva, fazendo com que estes inseticidas atinjam também os recursos hídricos. Como ainda não foi desenvolvido um tratamento capaz de removê-los desses ambientes, a duração destes na água

pode variar de horas a dias, dependendo de alguns fatores (pH, temperatura, atividade microbiana e incidência de luz solar). Pelo fato de serem relativamente solúveis em água, estes compostos podem ser novamente absorvidos pelas raízes de outras plantas e também agir sistemicamente sobre elas (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015).

### **Imidacloprido**

O imidacloprido (1-(6-cloro-3-piridinilmetil)-N-nitroimidazolidim-2-ilideneamino, Fig. 2) foi descrito por Shinzo Kagabu e introduzido no mercado em 1991, iniciando a era dos neonicotinóides. Em 2008, tornou-se o primeiro inseticida e segundo agrotóxico mais vendido no mundo, com uso liberado para mais de 140 tipos de culturas em 120 países (SIMON-DELSO et al., 2015). Apesar de ser classificado como um produto mediamente tóxico (classe III, ANVISA, 2015), devido a sua elevada toxicidade para as abelhas e outros organismos não-alvo já foi banido de alguns países e teve seu uso proibido por dois anos nos estados-membro da União Europeia. No Brasil, passou por reavaliação pelo Ibama, culminando na proibição da pulverização aérea deste e de outros ingredientes ativos (tiametoxam, clotianidina e fipronil) em todo o território nacional em 2012, com exceção às culturas de arroz, cana-de-açúcar, soja e trigo (BÚRIGO et al., 2015).

Seu uso na agricultura está autorizado para culturas de abacaxi, abóbora, abobrinha, alface, algodão, alho, almeirão, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, berinjela, brócolis, cana-de-açúcar, café, cebola, cevada, chicória, citros, couve, couve-flor, crisântemo, eucalipto, feijão, fumo, gérbera, girassol, goiaba, jiló, mamão, mamona, manga, maracujá, melancia, melão, milho, palma forrageira, pastagens, pepino, pêsego, pimentão, pinus, poinsetia, repolho, soja, sorgo, tomate, trigo e uva. E também para aplicação no controle de cupins (ANVISA, 2015).

Ao entrar no organismo, o imidacloprido pode ser biotransformado em: olefinas e derivados; 5-hidroxi-imidacloprido (5-OH-IMI); 4,5-di-hidroxi-imidacloprido; desnitro-imidacloprido; derivados de ureia e ácido 6-cloronicotínico, entre outros. A principal rota de biotransformação é pela hidroxilação do anel do grupo imidazolidina e subsequente desidratação para formação de olefinas, as quais, juntamente com 5-OH-IMI, causam toxicidade para abelhas tanto por exposição aguda quando crônica (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015; SIMON-DELSO et al., 2015).

Os efeitos da exposição aguda dos seres humanos a esses compostos são: tremores, diminuição da atividade, falta de coordenação motora, diarreia e consequente perda de peso.

Pode haver ainda diversos outros efeitos devido à exposição crônica. Um dos ingredientes das formulações comerciais desses produtos (a sílice cristalina) já foi classificado como carcinogênico aos humanos pela Agência Internacional para o Câncer (RIGOTTO et al., 2015).

O imidacloprido apresenta ainda toxicidade de moderada a alta a pássaros, moderada a ratos e camundongos e é considerado como praticamente não tóxico a peixes e anfíbios. Entretanto, quando cronicamente expostos a este inseticida, os vertebrados podem apresentar efeitos: genotóxicos e citotóxicos, no desenvolvimento e crescimento, na reprodução e sobrevivência, além de distúrbios neurocomportamentais, movimentos reduzidos, aumento na ansiedade, no medo e redução da resposta imune, entre outros. Apesar de ser considerado como praticamente não tóxico a peixes, estudos já mostraram alterações na transcrição de genes, danos aos eritrócitos, desintegração do tecido gonadal, degeneração da notocorda e prejuízos na atividade natatória, entre outros (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015).

Geralmente não se observam efeitos subletais nos organismos expostos a concentrações menores que 1/10 da concentração letal ( $CL_{50}$ ) de agrotóxico para 50% da população. No caso do imidacloprido já foram detectados efeitos em concentrações de até 1/1000 desta. A  $CL_{50}$  para peixes e anfíbios expostos por até 96 h varia de 1,2 a 366 mg L<sup>-1</sup> (1200 a 366000 µg L<sup>-1</sup>) e as concentrações ambientais desse inseticida geralmente são de 2 a 7 vezes menores que esses valores, sendo assim passíveis de causar efeitos subletais nesses organismos (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015).

No Brasil, ainda não foi estabelecido um limite máximo para concentração de imidacloprido e de outros neonicotinóides nos recursos hídricos. No Canadá, o valor fixado para proteção da vida aquática é de 0,23 µg L<sup>-1</sup> deste ingrediente ativo em água doce e de 0,65 µg L<sup>-1</sup> em ambientes marinhos. Nos Estados Unidos, o valor de referência utilizado é de 1,05 µg L<sup>-1</sup> em água doce (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015).

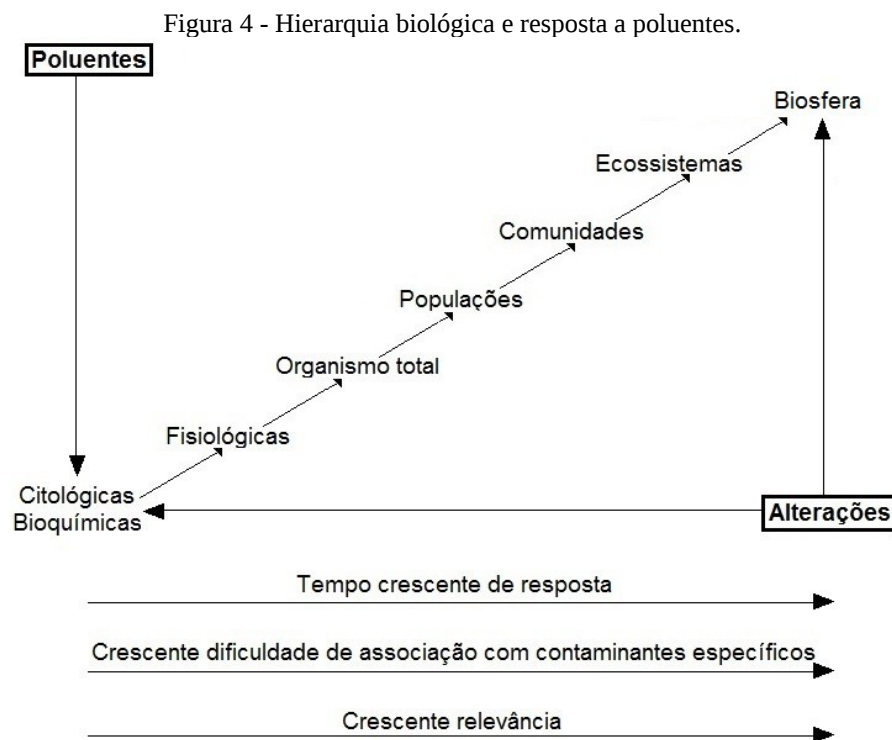
Diversos estudos verificaram a presença de imidacloprido em diferentes recursos hídricos ao redor do mundo. No Brasil, a concentração deste variou de 0,38-2,18 µg L<sup>-1</sup> em um estudo realizado durante o ciclo da cultura do fumo em 2005 na microbacia hidrográfica do Arroio Lino em Agudo/RS (BORTOLUZZI et al., 2006). Na Califórnia, EUA, a concentração em águas superficiais variou de 0,04-0,05 µg L<sup>-1</sup>, com máxima de 0,7 µg L<sup>-1</sup> entre 2008 e 2011 (ENSMINGER et al., 2013) e em zonas agrícolas verificou-se uma concentração máxima de 3,29 µg L<sup>-1</sup> entre 2010 e 2011 (STARNER; GOH, 2012). Em zonas úmidas próximas a áreas de agricultura no Canadá foi encontrada uma concentração máxima de 0,26 µg L<sup>-1</sup> entre 2012 e 2013 (MAIN et al., 2014). Em 2013, observou-se uma

concentração máxima de  $4,56 \mu\text{g L}^{-1}$  em rios de Sydney, Austrália (SÁNCHEZ-BAYO; HYNE, 2014).

Valores maiores também já foram reportados em outros estudos, como  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  em águas superficiais próximas a áreas de horticultura na Suécia em 2008 (KREUGER et al., 2010) e até acima de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  em corpos hídricos da Holanda entre 1998-2007 (VAN DIJK, 2010).

## 2.2 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos tóxicos das substâncias nos organismos, principalmente de compostos exógenos ao metabolismo normal, conhecidos como xenobióticos (SMART; HODGSON, 2008). A ecotoxicologia, uma extensão da toxicologia, é a ciência que avalia os efeitos de agentes tóxicos em ecossistemas naturais e em espécies não-alvo, com o objetivo de proteger todo o ecossistema e não somente seus componentes isolados (HOFFMAN et al., 2003). Esta ciência é tão abrangente que o destino e o efeito de poluentes podem ser avaliados desde a escala molecular até a biosfera (Figura 4, NEWMAN; CLEMENTS, 2008).



Fonte: Adaptado de Zagatto e Bertolotti (2008).

As substâncias químicas podem ser identificadas e quantificadas no ambiente por meio

de diversas técnicas analíticas, mas essas análises não possibilitam o conhecimento dos seus riscos toxicológicos e ecotoxicológicos. Os testes ecotoxicológicos permitem tanto a análise desses riscos aos organismos e ao ambiente, quanto à avaliação da qualidade de áreas naturais já contaminadas (AMIARD-TRIQUET; AMIARD; MOUNEYRAC, 2015).

Os testes com organismos aquáticos podem ser estáticos, com renovação ou com escoamento da solução-teste. Nos testes estáticos, não há renovação da solução-teste, sendo mais associados a testes de exposição aguda. Nos testes com renovação, há uma troca periódica da solução, geralmente diária ou a cada dois dias. Nos testes com escoamento, a solução é continuamente renovada (teste de fluxo contínuo) ou com intervalos intermitentes regulares (teste de fluxo intermitente) (HOFFMAN et al., 2003). Estes dois últimos tipos são indicados para os testes de exposição crônica.

Testes de toxicidade aguda geralmente avaliam os efeitos dos agentes tóxicos na sobrevivência de organismos por um curto período de seu tempo de vida (de 24-96 h para espécies aquáticas) (HOFFMAN et al., 2003). A toxicidade aguda normalmente é medida pela mortalidade e expressa como dose letal ou concentração necessária para matar 50% ( $DL_{50}$  ou  $CL_{50}$ ) da população exposta à substância-teste (SMART; HODGSON, 2008). Entretanto, os efeitos subletais também podem ser analisados, sendo cada vez mais utilizados em testes de toxicidade aguda (NIKINMAA, 2014).

Testes de toxicidade crônica têm duração maior ou igual a 10% do ciclo de vida do organismo, em que são avaliados efeitos no desenvolvimento, crescimento, reprodução e sobrevivência. Como os testes de ciclo de vida completo são muito caros, foram desenvolvidos testes de ciclo de vida parcial que normalmente utilizam organismos em seus estágios mais sensíveis. Estes testes são erroneamente considerados como crônicos, devendo ser denominados como estudos parcialmente crônicos ou subcrônicos. Nestes são avaliados diversos efeitos subletais, os quais podem impactar a estrutura de toda a comunidade (HOFFMAN et al., 2003; NEWMAN; CLEMENTS, 2008).

Neste trabalho, foi realizado um teste de toxicidade aguda com renovação periódica da solução-teste e duração de 96 horas. Foram avaliados os efeitos subletais do imidacloprido para *A. altiparanae*, através da utilização de diferentes biomarcadores bioquímicos e genotóxicos.

### 2.3 BIOMARCADORES

Biomarcadores são medições que evidenciam interações de xenobióticos e outros

estressores com sistemas biológicos, podendo ser determinados em diferentes níveis de organização: molecular, subcelular (organelas), celular, em órgãos e tecidos, no organismo e na população como um todo. Alterações em nível molecular ocorrem rapidamente, de segundos e minutos a dias, enquanto efeitos em nível de tecido e indivíduo são manifestados mais tardiamente, de horas e dias a anos (GAGNÉ, 2014).

Biomarcadores detectados nos níveis mais baixos de organização são respostas rápidas e sensíveis ao estresse causado por substâncias químicas antes mesmo que ocorram mudanças em nível de comunidade. Embora algumas destas alterações sejam reversíveis, elas servem como sinais preditivos de degradação ambiental, evitando assim custos posteriores com processos de remediação (AMIARD-TRIQUET; AMIARD; MOUNEYRAC, 2015).

Um biomarcador ideal deveria ser sensível, facilmente mensurável, específico, estável e proveniente de materiais que possam ser obtidos de forma não-destrutiva (sem a necessidade de fazer a eutanásia do organismo-teste). Como nenhum biomarcador já desenvolvido atende a todos esses atributos, deve-se fazer uso de uma combinação destes, minimizando as falhas de ensaios individuais (WALKER et al., 2001).

Como os biomarcadores podem ser mensurados por diferentes métodos, para comparação dos resultados é necessário que seja feita a normalização destes com relação a quantidade de biomassa (peso do tecido úmido ou seco, quantidade de proteína ou conteúdo de DNA) utilizada no ensaio (GAGNÉ, 2014).

Segundo Printes (2004), os biomarcadores podem ser divididos em:

- Moleculares: aductos de DNA, modificações secundárias (como quebras na sequência do DNA) e eventos irreversíveis (como anormalidades nucleares);
- Bioquímicos: citocromo P450 (CYPs) monooxigenases, metalotioneínas, proteínas de estresse ou proteínas de choque térmico, enzimas de fase II (conjugantes), metabolismo antioxidante e colinesterases;
- Histopatológicos: alterações histológicas em diferentes tecidos e órgãos;
- Fisiológicos: alterações no metabolismo energético, no sistema endócrino (como nas concentrações hormonais do plasma sanguíneo), nas taxas de crescimento e efeitos morfológicos (como o afinamento da casca do ovo em aves);
- Em nível individual: alterações comportamentais.

Neste trabalho foram utilizados biomarcadores bioquímicos e moleculares, os quais vem sendo utilizados em diversos estudos com peixes (Quadro 1).

Quadro 1 – Exemplos de estudos utilizando biomarcadores para avaliar os efeitos de agrotóxicos em peixes.

Estudo	Peixe	Tecidos	Ensaio	Pesticida	Concentrações	Tempo
Jeon et al. (2016)	<i>Oryzias latipes</i>	Fígado	AChE, GST	Clorpirifós	200, 400 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	96 h
Tabassum et al. (2016)	<i>Channa punctata</i>	Fígado, rim e brânquias	LPO, PCO, GSH, GST	Propiconazole	0,5 e 5 $\text{mg L}^{-1}$	96 h
Wu et al. (2014)	<i>Danio rerio</i>	Brânquias, cérebro, fígado e músculo	GST	Fipronil	2, 4 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	24 h
Sanches (2014)	<i>Astyanax sp.</i>	Sangue, fígado e brânquias	Cometa, GST, LPO	Diuron e seus metabólitos	0,015 e 0,15 $\text{mg L}^{-1}$	2 e 7 dias
Al-Sawafi e Yan (2013)	<i>Danio rerio</i>	Cérebro	AChE	Atrazina	0,636; 0,957 e 1,913 $\text{mg L}^{-1}$	5, 10, 15, 20 e 25 dias
Atamaniuk et al. (2013)	<i>Carassius auratus</i>	Brânquias	PCO, LPO, GSH, GST, AChE	2,4-D	1; 10 e 100 $\text{mg L}^{-1}$	96 h
Ghisi e Cestari (2013)	<i>Corydoras paleatus</i>	Sangue e fígado	MN e cometa	Glifosato (Roundup)	6,67 $\mu\text{g L}^{-1}$	3, 6 e 9 dias
Pereira, Fernandes e Martinez (2013)	<i>Prochilodus lineatus</i>	Fígado e cérebro	GST, AChE	Clomazone (Gamit 500)	1; 5 e 10 $\text{mg L}^{-1}$	96 h
Clasen et al. (2012)	<i>Cyprinus carpio</i>	Fígado, músculo e cérebro	GST, LPO e PCO	Fipronil (Standak)	0,65 $\text{mg L}^{-1}$ ( <i>in situ</i> )	7, 30 e 90 dias
Santos e Martinez (2012)	<i>Prochilodus lineatus</i>	Fígado, cérebro, músculo, brânquias e sangue	GST, GSH, LPO, AChE, cometa	Atrazina	2 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$	24 e 48 h
Rossi et al. (2011)	<i>Astyanax sp.</i>	Sangue, fígado e músculo	MN, GST, LPO, AChE	Roundup e diuron (Hexaron)	R: 3 e 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ H: 15 e 30 $\text{mg L}^{-1}$ 0,006(R) + 30(H) $\text{mg L}^{-1}$	96 h
Modesto e Martinez (2010)	<i>Prochilodus lineatus</i>	Fígado, cérebro e músculo	GST, GSH, LPO, AChE	Roundup	10 $\text{mg L}^{-1}$	6, 24 e 96 h
Cavalcante (2008)	<i>Prochilodus lineatus</i>	Sangue, brânquias	Cometa, MN, AENs	Roundup	10 $\text{mg L}^{-1}$	6, 24 e 96 h
Jebali et al. (2006)	<i>Seriola dumerilli</i>	Cérebro	AChE	Malation	4 e 6 $\text{mg Kg}^{-1}$	2, 7 e 13 dias
Monteiro et al. (2006)	<i>Brycon cephalus</i>	Fígado, músculo e brânquias	GST, GSH, LPO	Metil paration (Folisuper 600)	2 $\text{mg L}^{-1}$	96 h



### 2.3.1 Biomarcadores bioquímicos

Alterações moleculares ou bioquímicas são as primeiras respostas que podem ser detectadas e quantificadas na exposição a mudanças ambientais, precedendo alterações posteriores. As modificações em nível bioquímico podem ser consideradas como as mais sensíveis, quando comparadas a indicadores nos maiores níveis de organização biológica (PRINTES, 2004).

#### *Biomarcador de neurotoxicidade – acetilcolinesterase*

A neurotoxicidade é caracterizada por efeitos na função do sistema nervoso ou de nervos periféricos após a exposição a um ou mais agentes químicos, sendo que a maioria dos inseticidas afeta a transmissão sináptica, principalmente nas junções neuromusculares (NIKINMAA, 2014).

Na sinapse química, os neurotransmissores secretados dos neurônios pré-sinápticos se ligam aos canais iônicos da membrana pós-sináptica, causando sua abertura e excitação da célula até que ocorra a quebra enzimática do neurotransmissor com consequente fechamento do canal. As substâncias tóxicas podem interferir tanto no funcionamento deste canal iônico (como os neonicotinóides, Figura 3) quanto na quebra do neurotransmissor, podendo afetar espécies não-alvo que apresentem sinapses químicas similares (NIKINMAA, 2014).

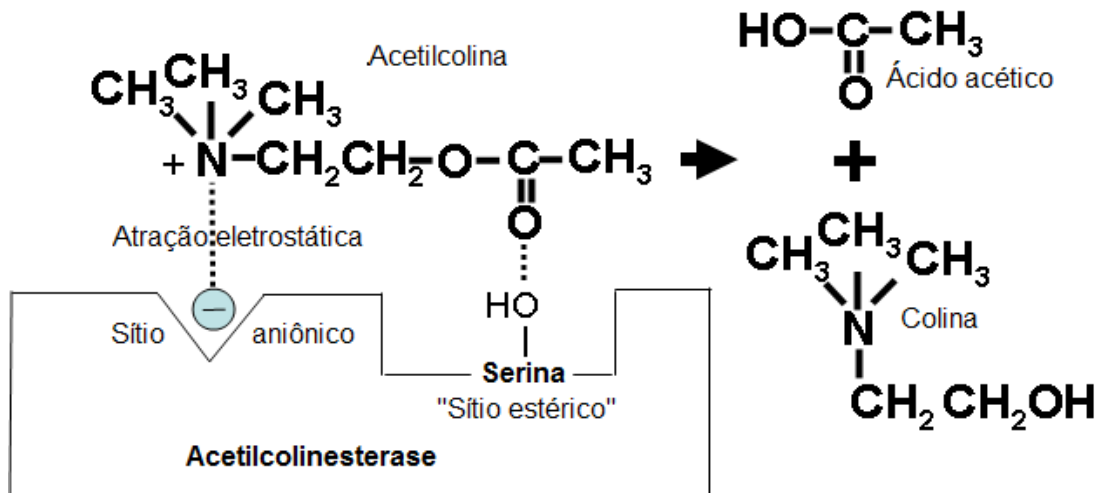
O neurotransmissor mais importante nas junções musculares é a acetilcolina (ACh), a qual é hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) em colina e ácido acético (Figura 5). A mudança na atividade desta enzima pode causar alterações no comportamento e na atividade neuromuscular, sendo considerada como um biomarcador de neurotoxicidade, o qual é muito utilizado em estudos ecotoxicológicos com organismos não-alvo, como peixes, expostos a agrotóxicos (GAGNÉ, 2014). Em geral, uma redução de 20% na atividade da AChE em peixes e invertebrados indica exposição a neurotóxicos, de 20-50%, impactos subletais e acima de 70% está associada a mortalidade (AMIARD-TRIQUET; AMIARD; MOUNEYRAC, 2015).

#### *Biomarcador de biotransformação – glutatona S-transferase*

Os organismos apresentam a capacidade de eliminar xenobióticos de suas células e manter a homeostase através do processo de biotransformação, cujas enzimas podem ser

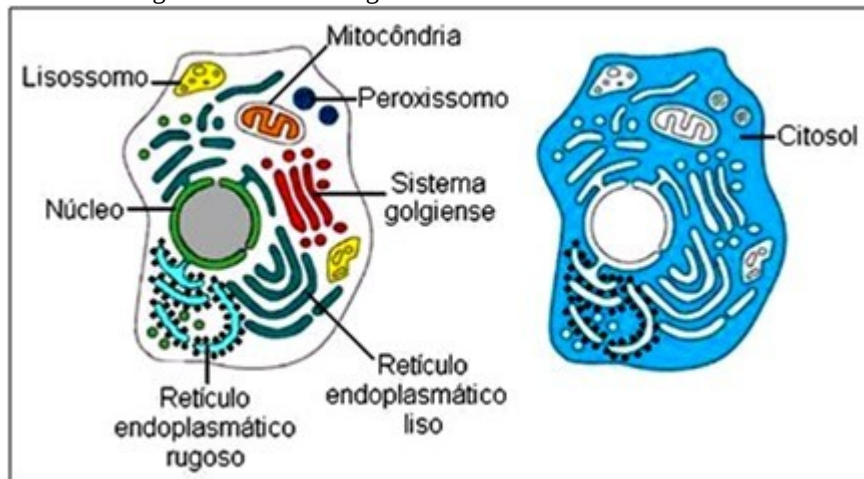
consideradas como os biomarcadores bioquímicos mais sensíveis (MARTINEZ, 2006). Estas geralmente estão localizadas nas membranas do retículo endoplasmático, na mitocôndria e no citosol (Figura 6). Embora normalmente façam parte de um mecanismo de desintoxicação, podem formar metabólitos ou produtos finais ainda mais tóxicos que os compostos originais, passando a contribuir para um processo de ativação ou de intoxicação (SMART; HODGSON, 2008; GAGNÉ, 2014).

Figura 5 - Quebra enzimática da acetilcolina.



Fonte: Adaptado de ATSDR (2007).

Figura 6 - Citosol e organelas de célula eucariótica animal.

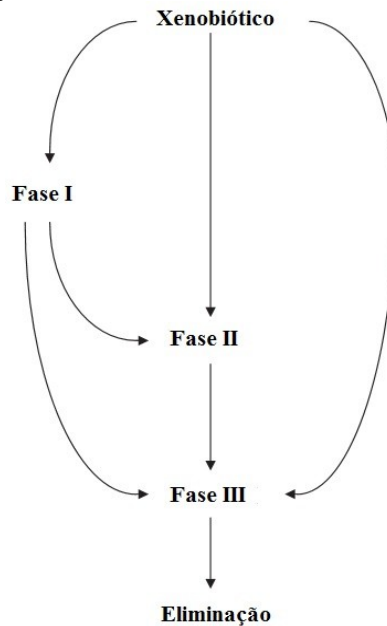


Fonte: Nunes (2011).

A metabolização de xenobióticos pode ser dividida em três fases. A fase I envolve reações de oxidação e redução que alteram ou introduzem grupos funcionais a esses compostos e reações de hidrólise, que clivam ésteres e amidas, liberando grupos funcionais mascarados. Essas mudanças aumentam a polaridade dos xenobióticos, criando sítios moleculares que facilitam sua conjugação durante a fase II, a qual depende da presença de

grupos hidroxila, amino, carboxila, epóxi, tiol ou halogênio. Nesta etapa, os metabólitos da primeira fase e os xenobióticos polares ligam-se a substratos endógenos, produzindo conjugados mais solúveis em água, os quais podem ser facilmente excretados da célula (fase III, excreção). Alguns xenobióticos, devido às suas propriedades, podem ser diretamente excretados da célula, sem precisar passar pelo processo de biotransformação (Figura 7, SMART; HODGSON, 2008; GAGNÉ, 2014).

Figura 7 - Inter-relação entre as fases I, II e III do metabolismo de xenobióticos.

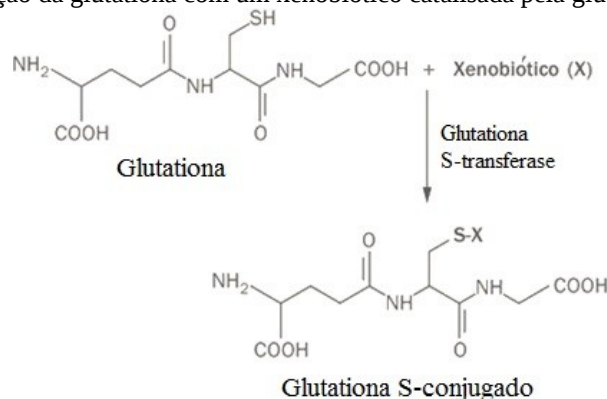


Fonte: Adaptado de Smart e Hodgson (2008).

Existem dois tipos de reação de conjugação: entre xenobióticos e ligantes endógenos reativos ou entre xenobióticos reativos e conjugantes endógenos, em que a reatividade do xenobiótico pode ser decorrente da fase I do metabolismo. O primeiro tipo envolve a formação de conjugados glicosilados, sulfatados, metilados e acetilados e o segundo tipo está relacionado com a conjugação a peptídeos e à glutathiona (SMART; HODGSON, 2008).

A conjugação de xenobióticos polares à glutathiona (GSH) representa uma importante via da fase II em invertebrados e peixes (GAGNÉ, 2014). Esta reação ocorre através da ligação de compostos eletrofílicos ao grupo nucleofílico tiol do aminoácido cisteína da GSH (Figura 8), sendo catalisada pela glutathiona S-transferase (GST). As GSTs são uma família de isoenzimas, as quais são encontradas principalmente no fígado, importante órgão detoxificante (TORRES; SOARES; MAIA, 2004; NASCIMENTO, 2008).

Figura 8 - Conjugação da glutatona com um xenobiótico catalisada pela glutatona S-transferase.



Fonte: Simic et al. (2009).

### Biomarcadores de estresse oxidativo

Os organismos aeróbios possuem a vantagem energética de usar o oxigênio molecular comoceptor final de elétrons na respiração, mas a liberação de elétrons desacoplados de alta energia na mitocôndria e nos cloproplastos leva a formação de espécies altamente reativas (NEWMAN; CLEMENTS, 2008; GAGNÉ, 2014).

As espécies reativas de oxigênio ou ERO (Quadro 2) incluem tanto radicais de oxigênio como alguns não-radicais, que são agentes oxidantes e/ou facilmente convertidos a radicais, como HOCl, HOBr, O<sub>3</sub>, ONOO<sup>-</sup>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O radical hidroxila é a espécie mais reativa e com menor tempo de vida (NIKINMAA, 2014).

Quadro 2 - Espécies reativas de oxigênio (ERO).

<b>Radicais</b>	<b>Não-radicais</b>
Superóxido, O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Peróxido de hidrogênio, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Hidroperoxila, HO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	Peroxinitrito, ONOO <sup>-a</sup>
Hidroxila, OH <sup>·</sup>	Ácido peroxinitroso, ONOOH <sup>a</sup>
Peroxila, RO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	Peroxicarbonato nitroso, ONOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Oxigênio atômico, <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio atômico, <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Alcoxila, RO <sup>·</sup>	Ácido hipocloroso, HOCl <sup>b</sup>
	Ácido hipobromoso, HOBr <sup>c</sup>
Carbonato, CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ozônio, O <sub>3</sub>
	Peróxidos Orgânicos, ROOH
Dióxido de Carbono, CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Peroxinitrato, O <sub>2</sub> NOO <sup>-</sup>
	Peroximonocarbonato, HOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>

<sup>a,b,c</sup>também poderiam ser chamados de espécies reativas de nitrogênio, cloro e bromo, respectivamente. Fonte: adaptado de Halliwell e Gutteridge (2007).

Muitos xenobióticos contribuem para o aumento da produção destas espécies, as quais, juntamente com intermediários reativos formados pela bioativação de químicos, podem interagir com biomoléculas e afetar suas funções. Para controlar a concentração dessas

espécies, as células apresentam sistemas de defesa compostos por moléculas antioxidantes (tocoferóis, ácido ascórbico e glutathiona) e enzimas antioxidantes (como catalase, peroxidase e superóxido dismutase) (SMART; HODGSON, 2008; GAGNÉ, 2014; NIKINMAA, 2014).

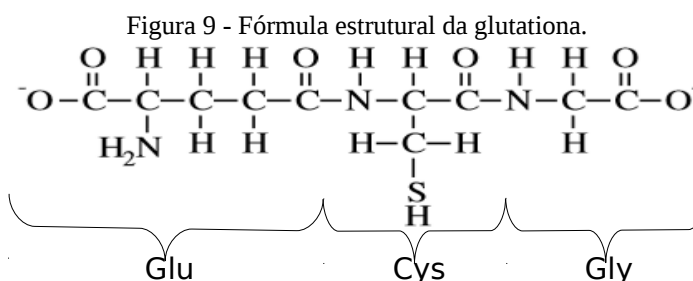
Quando a produção de ERO excede a capacidade antioxidante causando um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante/antioxidante da célula, ocorre o estresse oxidativo. A consequência direta dessa situação é a ocorrência de dano oxidativo a proteínas, lipídeos e DNA, podendo levar à citotoxicidade, genotoxicidade e até à carcinogênese. Pode haver ainda danos indiretos aos constituintes do sistema de defesa celular (SMART; HODGSON, 2008; GAGNÉ, 2014; NIKINMAA, 2014).

As respostas adaptativas, como alterações na atividade de enzimas e na concentração de compostos não-enzimáticos antioxidantes, e a toxicidade oxidante - mediada, como oxidação/carbonilação proteica, peroxidação lipídica e danos ao DNA podem ser utilizadas como biomarcadores de estresse oxidativo (PRINTES, 2004).

Neste trabalho, foram mensuradas a concentração de GSH (uma resposta adaptativa), a carbonilação proteica e a lipoperoxidação (ou peroxidação lipídica) como biomarcadores de dano oxidativo. Os danos ao DNA foram estimados através do ensaio cometa e referenciados, juntamente com outros tipos de alterações, como biomarcadores de genotoxicidade.

#### A. Glutathiona (GSH)

A glutathiona é um agente conjugante essencial ao organismo, sendo a molécula mais importante dentre os compostos antioxidantes não-enzimáticos. Trata-se de um tripeptídeo composto pelos aminoácidos ácido glutâmico (Glu), cisteína (Cys) e glicina (Gly) (Figura 9) (MANAHAN, 2003; NIKINMAA, 2014).



Fonte: Manahan (2003).

Esta pequena molécula pode tanto neutralizar espécies pró-oxidantes quanto ser oxidada por elas para proteger biomoléculas mais complexas (NIKINMAA, 2014). Em uma

reação catalisada pela GST (Figura 8), a GSH pode se ligar a xenobióticos através de seu grupo sulfidril (-SH), formando um conjugado. Este pode ser diretamente excretado da célula ou passar por reações bioquímicas antes de sua excreção, sendo este último caminho o mais provável. Além de poder se conjugar a uma variedade de compostos, a glutathiona pode ainda se ligar aos produtos do metabolismo destes, os quais são intermediários reativos como os radicais livres (MANAHAN, 2003). Entretanto, para alguns compostos químicos (como os halogenados) a conjugação com a GSH pode ser um mecanismo de bioativação, os tornando ainda mais tóxicos (SMART; HODGSON, 2008).

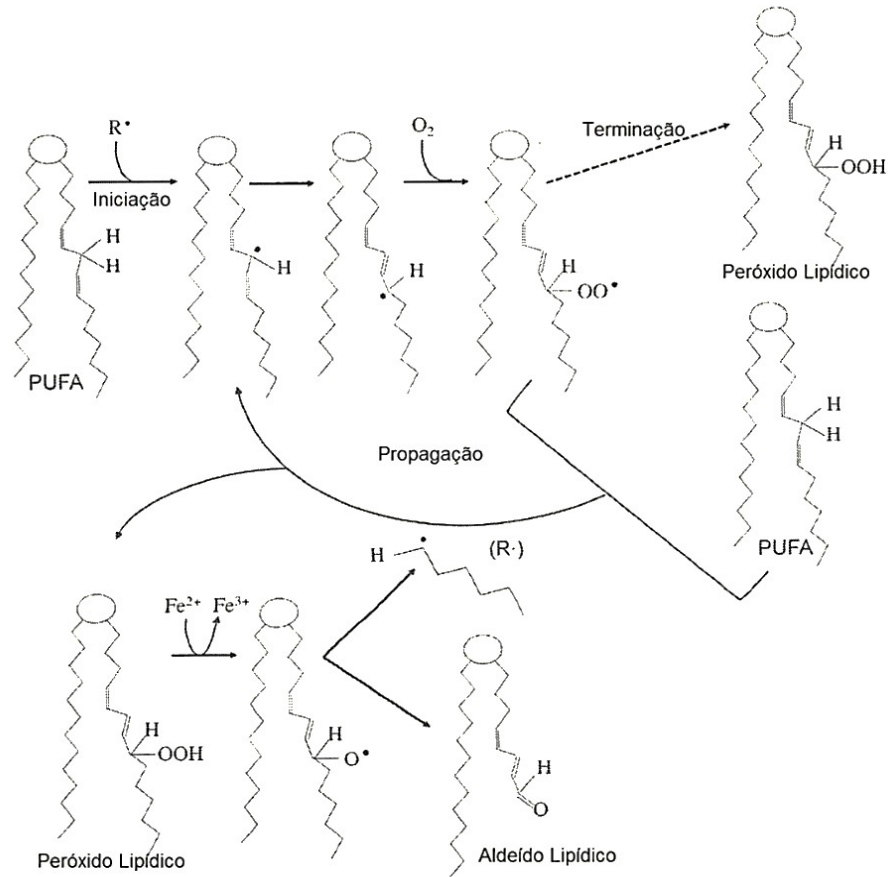
Apesar disto, este é o principal mecanismo de defesa antioxidante da célula e uma diminuição de apenas 15-20% nos níveis de glutathiona já pode impactar a defesa antioxidante, podendo levar ao dano e até a morte celular (SMART; HODGSON, 2008).

## B. Lipoperoxidação (LPO)

O excesso de ERO não removido pelo sistema antioxidante pode causar danos aos lipídeos através de sua oxidação por via enzimática (lipoxigenases, ciclooxigenases e CYPs) ou por interação com radicais livres (SMART; HODGSON, 2008; GAGNÉ, 2014). Quando algumas ERO apresentam reatividade suficiente para extrair um átomo de hidrogênio de um lipídeo intacto, inicia-se a lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (Figura 10; FILIPAK NETO, 2014).

Na iniciação, um intermediário reativo (radical,  $R\cdot$ ) remove um hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado (PUFA). O radical lipídico formado pode reagir com oxigênio ( $O_2$ ), produzindo um radical de peróxido lipídico; esta reação pode ser revertida e o oxigênio liberado. Caso o PUFA contenha mais de três insaturações, o radical gerado reage com outro radical de peróxido lipídico, formando um peróxido cíclico. Este radical pode ainda reagir com outro ácido graxo, produzindo outro radical lipídico e um peróxido lipídico, fase denominada de propagação. Esse peróxido pode, através da reação de Fenton, gerar radicais de alcóxido lipídico, podendo fragmentar-se em aldeídos lipídicos e outros radicais. Como também foi gerado um novo radical lipídico, esse ciclo de reações continua se propagando e causando danos a membranas, ácidos nucleicos, proteínas e outras funções até a fase de terminação. Nesta etapa, o sistema de defesa antioxidante celular começa a atuar, reagindo moléculas antioxidantes com os radicais peróxido e impedindo a produção de mais produtos danosos (SMART, HODGSON, 2008; FILIPAK NETO, 2014).

Figura 10 - Mecanismo da peroxidação lipídica.



Fonte: Adaptado de Boelsterli (2007) por Filipak Neto (2014).

A quantificação da lipoperoxidação é uma das técnicas mais comumente empregadas na determinação de estresse oxidativo em peixes, devido ao fato destes animais possuírem grandes quantidades de lipídios com resíduos de ácidos graxos poli-insaturados em seus organismos (FILIPAK NETO, 2014).

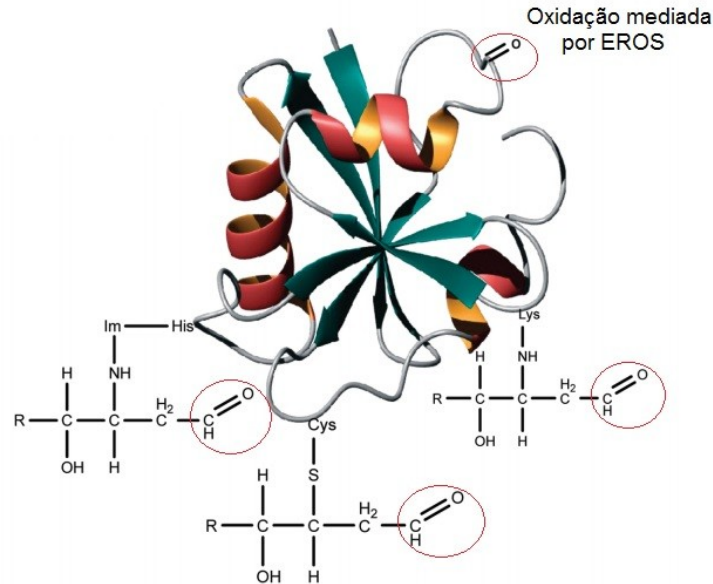
### C. Carbonilação proteica (PCO)

As proteínas também podem sofrer dano oxidativo através de diversas reações. O radical hidroxila pode remover um hidrogênio de um aminoácido, formando um radical de carbono, o qual pode levar a clivagem de ligações peptídicas. Se forem gerados dois ou mais radicais, pode ocorrer ainda a formação de *crosslinks* na proteína, tornando-a resistente a degradação proteossômica e podendo até inibir sua atividade (SMART; HODGSON, 2008).

Elevados níveis de proteína oxidada podem ser encontrados em animais e culturas celulares expostas a várias condições de estresse oxidativo. A oxidação dos aminoácidos lisina, arginina, prolina e treonina podem resultar na formação de carbonilas proteicas (Figura

11), as quais também podem ser introduzidas nas proteínas por reações com aldeídos provenientes da lipoperoxidação (BERLETT; STADTMAN, 1997).

Figura 11 - Rotas de formação de carbonilas proteicas (em destaque).



Lipoperoxidação avançada e seus produtos

Fonte: Adaptado de Madian e Regnier (2010).

A carbonilação é uma modificação irreversível que frequentemente leva ao dano da função proteica, podendo ser relacionada a várias doenças (MADIAN; REGNIER, 2010). A presença de carbonilas em proteínas tem sido utilizada em muitos estudos como biomarcador de oxidação proteica mediada por ERO.

### 2.3.2 Biomarcadores de genotoxicidade

Eventos genéticos são utilizados em muitos estudos como biomarcadores de exposição a genotóxicos, avaliando a capacidade do organismo em conservar a integridade do DNA e lidar com o dano (PRINTES, 2004). O DNA é muito reativo quimicamente pois suas bases nitrogenadas contêm sítios nucleofílicos e ligações insaturadas instáveis, estando frequentemente sujeito a modificações químicas. O dano ao DNA pode alterar a codificação das bases e resultar em efeitos em sua estrutura, podendo levar à citotoxicidade, um efeito biológico agudo, e à genotoxicidade, um efeito crônico que pode demorar anos para manifestar suas consequências. O maior mecanismo de defesa celular contra esse dano é o reparo ao DNA, o qual remove fisicamente a lesão através de reações enzimáticas (SMART; HODGSON, 2008).



O agente do dano ao DNA pode ser de origem endógena ou ambiental, como os agentes químicos. O dano pode ainda ser gerado e induzido por ambos os agentes, como no caso do dano oxidativo. As ERO podem levar à modificação oxidativa do DNA pela ligação e modificação química das bases ou pela indução de mudanças em sua conformação, causando quebra da fita, podendo levar a mutações e problemas na replicação do DNA. O radical hidroxila pode reagir com o DNA pela remoção de um hidrogênio de um dos carbonos da desoxirribose, formando um radical de carbono. Este pode passar por diversas reações subsequentes e causar quebras na fita simples e alterações nas bases, como formação de adutos e mutações. Esses radicais podem ainda reagir com carbonos dos resíduos de aminoácidos e formar ligações cruzadas nas proteínas do DNA, causando erros na replicação deste e alteração na estrutura e função da proteína. Ferro livre e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) também podem causar quebras na fita simples através da reação de Fenton (SMART; HODGSON, 2008).

Genotoxicidade pode ser um efeito transgeracional causado por compostos tóxicos na estrutura do DNA, se ocorrer em células germinativas. Danos no DNA decorrentes de modificações primárias podem inativar ou alterar a função de proteínas e causar mutações genéticas. As mutações pontuais afetam aminoácidos individuais e vias regulatórias, mas os agentes tóxicos também podem ter efeito clastogênico, podendo induzir quebras nas cadeias de DNA. A presença de agentes genotóxicos pode fazer com que a quantidade de erros na replicação do DNA ultrapasse a capacidade de remoção do sistema de reparo, podendo haver um acúmulo de mutações, as quais podem ser resultado do aumento da formação de adutos de DNA. Podem ocorrer ainda alterações maiores, em escala genômica, como resultado da fragmentação do DNA ou da formação de micronúcleos (Figura 12; GAGNÉ, 2014; NIKINMAA, 2014).

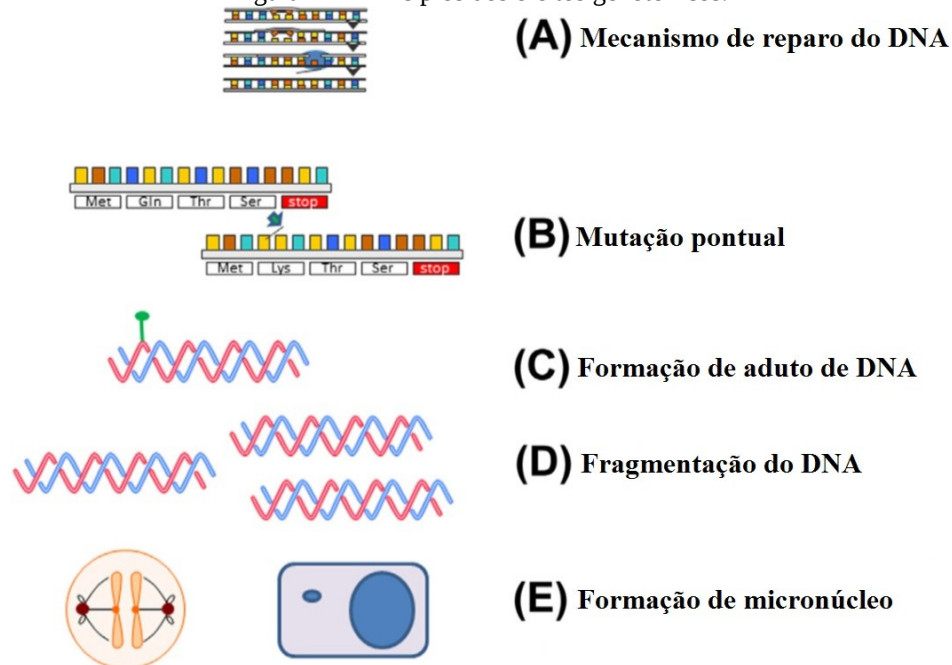
As mutações são de extrema importância na manutenção das espécies, já que dão origem à variabilidade genética de uma população. Entretanto, dependendo do tipo, local e quantidade, podem gerar doenças e desequilibrar ecossistemas inteiros (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2008). Se ocorrerem mutações em genes responsáveis pela diferenciação, comunicação e crescimento celular, podem ser geradas células com crescimento e função alteradas, podendo se desenvolver em cânceres (GAGNÉ, 2014).

#### *Dano ao DNA – Ensaio cometa*

A exposição a compostos genotóxicos pode causar quebras simples e outras

modificações na estrutura do DNA. Estes danos podem ser mensurados pelo ensaio cometa, o qual é um dos testes de genotoxicidade mais baratos e sensíveis e pode ser realizado com qualquer célula eucariótica nucleada. Em peixes, os tipos celulares mais utilizados são os eritrócitos, os hepatócitos e as células branquiais. O ensaio cometa consiste em uma eletroforese em microgel que combina técnicas bioquímicas e testes citogenéticos em células individuais, permitindo a obtenção de um grande número de dados com um reduzido número de células (menor que 10000). O ensaio cometa permite a detecção de vários tipos de danos ao DNA (os quais são reversíveis, podendo ser reparados), como quebras na fita (simples e dupla), reparo de excisão incompleto e sítios de ligação cruzada (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2008; GAGNÉ, 2014; NIKINMAA, 2014).

Figura 12 - Princípios dos efeitos genotóxicos.

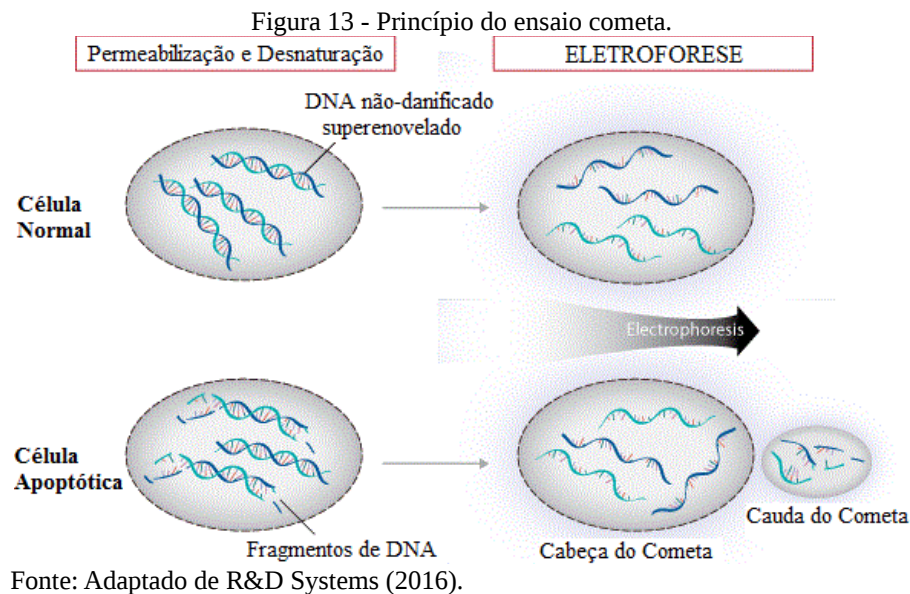


Quando os mecanismos de reparo do DNA (A) estão sobrecarregados com substâncias tóxicas, há um aumento na ocorrência de mutação (B), o qual pode ser resultado do aumento da formação de aductos de DNA (C). Alterações de maior escala no genoma podem ocorrer devido à (D) fragmentação do DNA ou à formação de micronúcleos (E). Fonte: Adaptado de Nikinmaa (2014).

O método consiste em lise celular, desenovelamento do DNA em pH alcalino (maior que 13) e eletroforese. Nesta, os fragmentos de DNA provenientes da ação dos compostos genotóxicos migram em direção ao anodo (devido a sua carga negativa), formando uma estrutura parecida com um cometa, com cabeça e cauda (Figura 13) (GAGNÉ, 2014).

O equipamento necessário para o ensaio é relativamente barato e de fácil obtenção e a contagem é baseada em células individuais, permitindo o estudo da distribuição do dano na população celular (GAGNÉ, 2014). O dano ao DNA é estimado através da proporção da

cabeça (DNA intacto) e da cauda (DNA fragmentado) do cometa (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2008; NIKINMAA, 2014).



O ensaio cometa tem sido utilizado para estudar os mecanismos de dano ao DNA e para avaliar o potencial genotóxico de agentes químicos, sedimentos, partículas do ar e efluentes em um grande número de animais, como insetos, crustáceos, bivalves, anfíbios, mamíferos, peixes e várias outros (GAGNÉ, 2014).

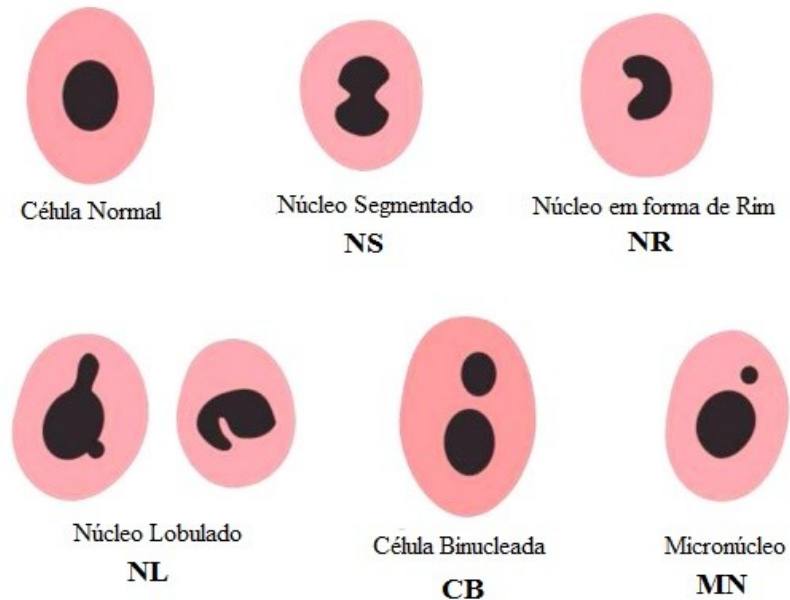
#### *Alterações eritrocíticas nucleares (AENs) - Micronúcleos (MN) e outras anormalidades*

Alguns autores consideram que a exposição a compostos genotóxicos também pode causar diferentes alterações morfológicas nos núcleos de eritrócitos de peixes. Entretanto, os mecanismos de formação dessas alterações (com exceção do micronúcleo) ainda não foram compreendidos (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2001). Estas foram classificadas por Carrasco et al. (1990) como: núcleos lobulados (NL), núcleos segmentados (NS) e núcleos em forma de rim (NR). Também pode haver a formação de micronúcleos e de células binucleadas (CB, Figura 14).

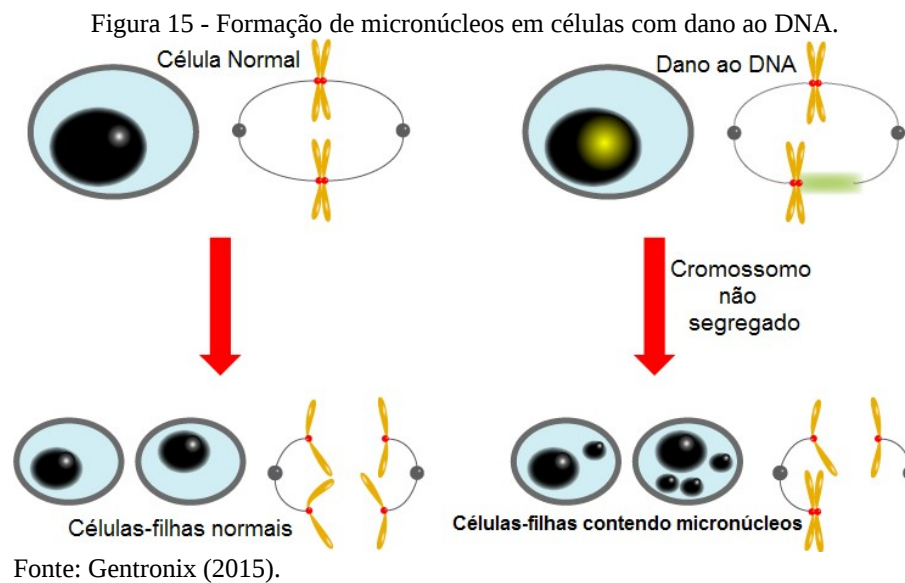
Micronúcleos são estruturas independentes do núcleo celular que apresentam, no máximo, 1/3 do tamanho deste e se localizam no citoplasma. Sua formação é uma consequência de irregularidades mitóticas, originando-se de material cromossômico não incorporado pelo núcleo das células-filhas durante a anáfase (Figura 15). O teste de micronúcleo consiste em um método simples, sensível e confiável para verificar a ocorrência

de quebras e perdas cromossômicas em células previamente expostas a compostos genotóxicos e mutagênicos (GAGNÉ, 2014).

Figura 14 - Representação de alterações eritrocíticas nucleares (AENs).



Fonte: Adaptado de Carrola et al. (2014).



Fonte: Gentronix (2015).

## 2.4 ORGANISMO-TESTE

A possibilidade da extrapolação para o campo dos resultados obtidos nos testes de toxicidade laboratoriais depende da escolha dos organismos-teste, os quais devem ser sensíveis, relevantes e representativos do ecossistema em estudo. Para evitar a perda da variabilidade genética, causada pela manutenção dos animais em laboratório, e aumentar o

realismo do estudo, os organismos devem ser uniformemente obtidos de locais não contaminados (AMIARD-TRIQUET; AMIARD; MOUNEYRAC, 2015).

Neste trabalho, o organismo-teste escolhido foi o lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), um peixe neotropical do Brasil.

### ***Astyanax altiparanae***

A espécie *Astyanax altiparanae* (Garutti e Brittsk, 2000) é popularmente conhecida como lambari, tambuí e lambari-de-rabo-amarelo, entre outros. Ela pertence a infraclasse Teleostei e a família Characidae, a qual engloba grande parte dos peixes de água doce do Brasil, sendo que a subfamília Tetragonopterinae é a que apresenta o maior número de espécies no país. O gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) é o mais encontrado na região neotropical, principalmente em bacias hidrográficas brasileiras. Os lambaris apresentam uma grande capacidade de se ajustar a diferentes condições ambientais, mas vivem melhor em ambientes mais preservados. *A. altiparanae* é uma espécie de ampla distribuição na bacia hidrográfica do alto rio Paraná, sendo caracterizada pela presença de uma mancha negra ovalada horizontalmente, associada a duas barras marrons verticais na região umeral (acima da nadadeira peitoral) e mais uma mancha negra no pedúnculo caudal, que se estende até a extremidade dos raios caudais medianos (Figura 16). Essas características também aparecem na espécie *A. bimaculatus* (Linnaeus, 1758) que, na realidade, engloba diferentes espécies e subespécies, sendo que as de *Astyanax* do alto rio Paraná eram incorretamente identificadas como *A. bimaculatus* (GARUTTI; BRITTISK, 2000; ORSI; CARVALHO; FORESTI, 2004; ALMEIDA, 2007).

Figura 16 - *Astyanax altiparanae* (lambari-do-rabo-amarelo).



Fonte: o autor.

O lambari-do-rabo-amarelo é um peixe de pequeno porte, podendo pesar até 60 gramas e atingir de 10 a 15 cm de comprimento. Apresenta curto ciclo de vida e crescimento rápido, sendo que o macho atinge a maturidade sexual com 7 a 9 cm e a fêmea com 12 a 15

cm, ambos aos quatro meses de vida, aproximadamente (GARUTTI, 2003; PORTO-FORESTI et al., 2001 apud ALMEIDA, 2007).

*A. altiparanae* é uma espécie onívora que desempenha um importante papel na cadeia alimentar de ecossistemas de águas interiores (riachos, rios, brejos e lagoas), servindo como alimento a peixes carnívoros e atuando como predador de larvas de insetos. Essa tendência insetívora o torna um forte aliado da saúde pública, podendo ser utilizado no combate de alguns vetores de doenças, como o *Aedes aegypti*, transmissor da febre amarela, chikungunya, zika e dengue (GARUTTI, 2003).

O lambari também pode ser utilizado como alimento (consumo *in natura*), isca viva (em pesca profissional ou de lazer), servir de alimento para espécies carnívoras, em aquarofilia, e como peixe ornamental. Em algumas regiões do Brasil, utiliza-se ainda o óleo deste (obtido após fervura) para consumo humano ou em iluminação (GARUTTI, 2003).

Escolheu-se a espécie *A. altiparanae* como organismo-teste neste trabalho pelo fato de ser uma espécie nativa de ampla distribuição geográfica, de importância socioambiental e econômica. É uma espécie que apresenta grande adaptabilidade a diferentes habitats e sensibilidade à mudanças ambientais e à ação tóxica de xenobióticos, sendo cada vez mais utilizadas em estudos de biomonitoramento (ROSSI et al., 2011; SANCHES, 2014; VIEIRA, 2014).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ACLIMATAÇÃO

Os peixes *A. altiparanae* foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina. Foram utilizadas fêmeas com  $11,46 \pm 2,90$  g de massa corporal e  $9,66 \pm 1,03$  cm de comprimento total. No laboratório, os animais passaram por um período de aclimação de cinco dias, em tanque com água de torneira desclorada e aeração constante (Figura 17).

Figura 17 - Tanque de aclimação dos peixes.



Fonte: o autor.

Durante a aclimação, a alimentação foi realizada com ração comercial para alevinos onívoros (Laguna) que era fornecida *ad libitum* a cada dois dias, intercalando-se com a troca de água.

#### 3.2 EXPOSIÇÃO AO IMIDACLOPRIDO

Após a aclimação, os peixes foram transferidos para aquários de vidro (10 peixes por aquário), com capacidade para 80 L de água, mantidos sob aeração constante e protegidos da incidência de luz (Figura 18). Os peixes foram expostos a quatro concentrações (nominais) do Imidacloprido Nortox® ( $480 \text{ g L}^{-1}$ ):  $3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3),  $30 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30),  $300 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300) e  $3000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000) ou apenas à água (grupo controle - CTR). A menor concentração do inseticida foi definida com base nas análises realizadas em amostras de água da microbacia do Ribeirão José Pereira (Itajubá/MG). Foi detectado a presença de imidacloprido nas concentrações de  $2,6$  e  $3,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  em pontos amostrais próximos a áreas agrícola e urbana,

respectivamente. As amostras foram analisadas no Laboratório de Química Analítica da Universidade Estadual de Campinas (LQA/Unicamp), empregando-se extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS). As demais concentrações foram definidas a partir desta menor concentração ( $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em progressão geométrica de razão 10. O tempo de exposição ao inseticida foi de 96 h com trocas diárias da solução-teste. Durante este período os animais não foram alimentados.

Figura 18 - Sistema de exposição dos peixes *A. altiparanae* ao Imidacloprido.



Fonte: o autor.

Todo o experimento foi realizado no Laboratório de Ecofisiologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, sob a supervisão da Prof<sup>a</sup> Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez. O projeto passou pela aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Itajubá (protocolo nº 001/2015, Anexo A).

### 3.3 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA

Os parâmetros físicos e químicos da água durante a exposição foram monitorados diariamente, em todos tratamentos incluindo o controle, quanto a: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ), pH, condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), turbidez (NTU) e sólidos solúveis totais ( $\text{mg L}^{-1}$ ), utilizando-se uma sonda multiparâmetros (Horiba U-52). Estes mesmos parâmetros foram mensurados na água do tanque no último dia de aclimatação.

### 3.4 AMOSTRAGEM DOS EXEMPLARES DE *A. altiparanae*

Após a exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ), e, com auxílio de seringas heparinizadas, amostras de sangue foram coletadas da veia caudal para

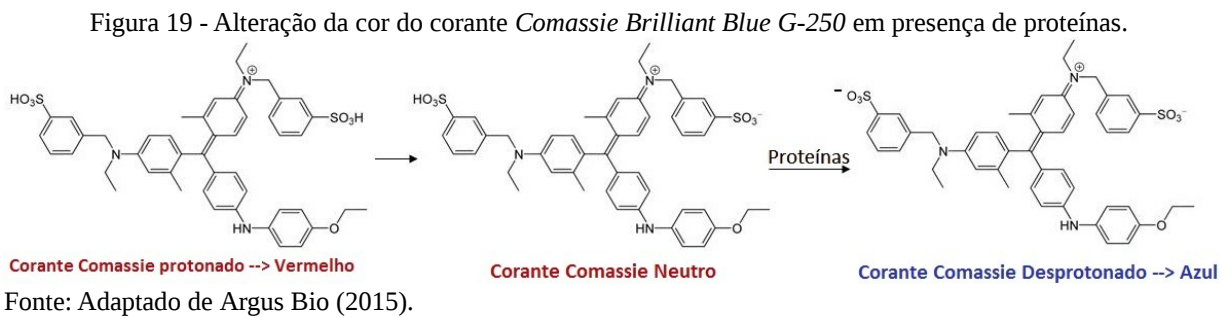


realização do teste de MN e de AENs. O restante foi armazenado em soro bovino a 4°C para utilização no ensaio cometa.

Os animais foram mortos por secção medular e amostras dos tecidos branquiais, hepático, muscular e cerebral foram coletadas e armazenadas em ultrafreezer -80°C.

**Concentração proteica**

A concentração proteica total foi mensurada em espectrofotômetro a 595nm, de acordo com Bradford (1976). Este método baseia-se na reação de proteínas com o corante *Comassie Brilliant Blue G-250* (Figura 19), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão para a curva de calibração. A concentração proteica foi utilizada como referência nos ensaios bioquímicos, para normalização dos resultados.



**3.5 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS**

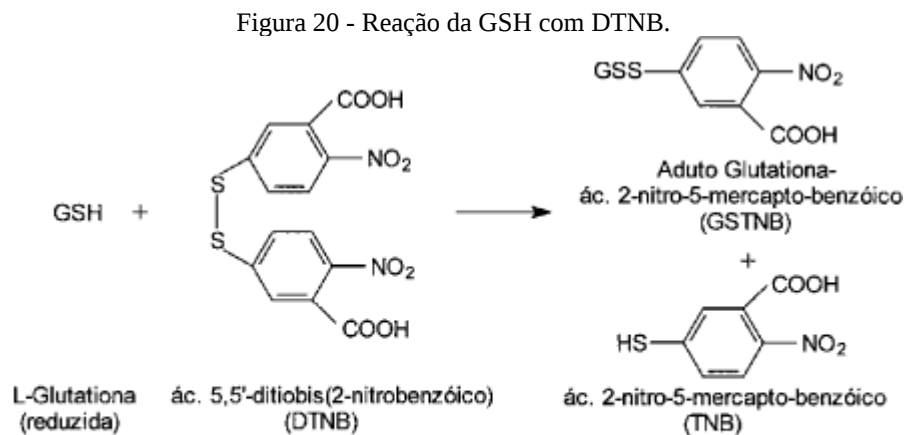
Para cada ensaio, as amostras teciduais foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M. O pH e a proporção de volume de tampão por massa de cada tecido (v:m) podem ser visualizados na Tabela 1. O homogeneizado foi centrifugado (20 min, 13000 rpm, 4°C) e o sobrenadante armazenado em ultrafreezer -80°C para posterior utilização nos ensaios bioquímicos.

Tabela 1 - Condições para homogeneização dos tecidos.

	Fígado	Brânquias	Cérebro	Músculo
<b>pH do tampão</b>	7,0	7,0	7,5	7,5
<b>Proporção (volume:massa)</b>	10:1	5:1	10:1	10:1

## GSH

A concentração de glutathiona (GSH) foi determinada de acordo com o método de Beutler, Durom e Kelly (1963), a partir da reação com o ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB), formando um ânion tiolato (TNB). Este foi mensurado em 412nm (Figura 20), utilizando-se uma solução estoque de GSH como padrão para fazer a curva de calibração. A concentração de GSH nos tecidos foi expressa em  $\mu\text{g GSH mg proteína}^{-1}$ .



Fonte: Rover Jr. et al. (2001).

## Atividade da GST

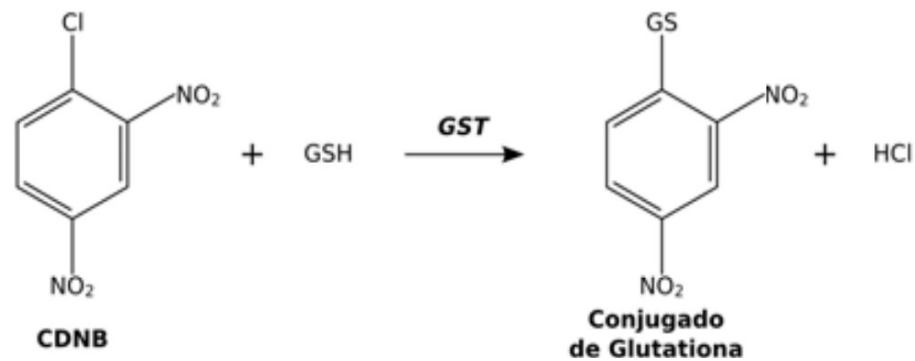
A atividade da GST foi determinada pelo monitoramento da complexação da GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Figura 21) por 1 minuto (verificando-se a variação da absorbância da amostra) em espectrofotômetro, a 340nm (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976). A atividade da enzima foi expressa em  $\text{nmol CDNB conjugado min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ .

## LPO

A LPO foi mensurada através da quantificação do malondialdeído (MDA), um dos produtos finais deste processo, de acordo com o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme Camejo et al. (1998). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um composto cromóforo, o qual absorve luz em 532nm (Figura 22). A concentração de TBARS foi determinada por fluorescência (ex/em: 535/590nm), utilizando-se uma curva padrão de MDA e foi expressa em  $\text{nmol TBARS mg}$

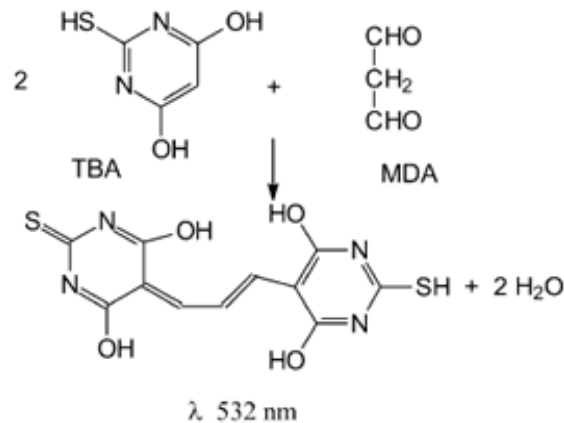
proteína<sup>-1</sup>.

Figura 21 - Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDNB.



Fonte: Nogueira (2011).

Figura 22 - Reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e malondialdeído (MDA).



Fonte: Vasconcelos et al. (2007).

## PCO

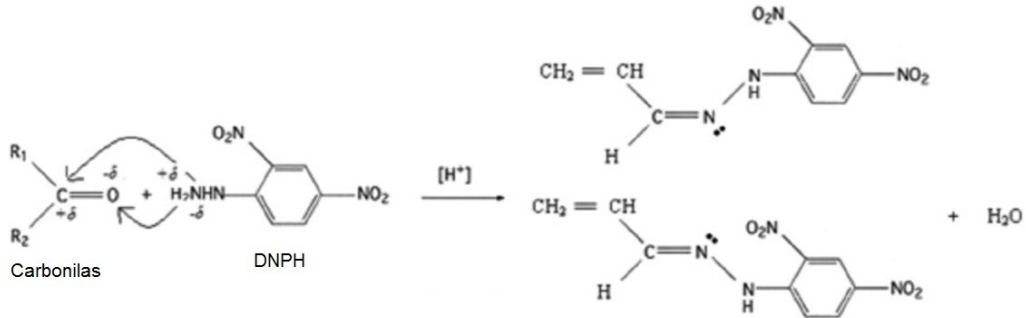
A carbonilação proteica foi mensurada de acordo com Levine et al. (1994) com modificações. Carbonilas proteicas do tipo aldeído e cetona reagem com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), formando dinitrofenil hidrazonas, as quais podem ser detectadas em espectrofotômetro de 358-370nm (Figura 23). A PCO foi expressa como nmol de carbonila mg proteína<sup>-1</sup>.

## Atividade da AChE

A atividade da acetilcolinesterase foi determinada de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961), adaptado para microplaca por Costa et al. (2007), usando o substrato

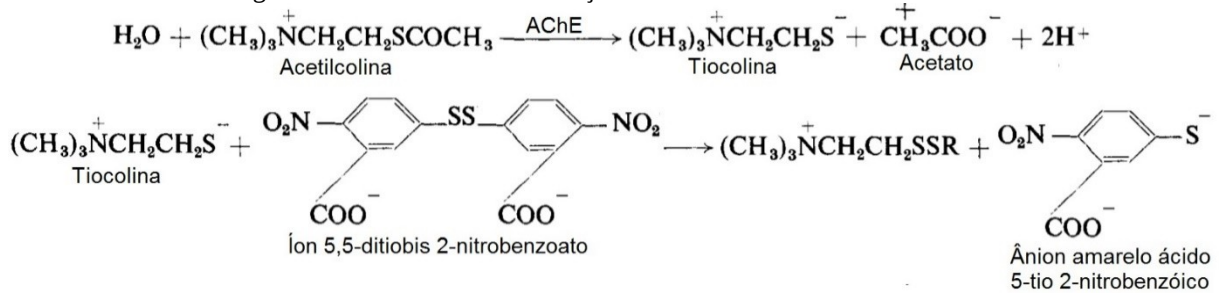
iodeto de acetilcolina (9 mM) e o reagente colorido ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB) (Figura 24). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro por 4 minutos (com intervalos de 1 minuto) a 415nm. A atividade da AChE foi expressa em  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>.

Figura 23 - Reação de carbonilas com DNPH, formando hidrazonas.



Fonte: Osório e Cardeal (2013).

Figura 24 - Método de determinação da atividade da acetilcolinesterase.



Fonte: Adaptado de Ellman et al. (1961).

### 3.6 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE

#### Ensaio Cometa

O ensaio cometa com eritrócitos foi realizado em pH alcalino de acordo com Singh et al. (1988) e modificado por Ramsdorf et al. (2009). Para garantir a integridade celular pré-teste, as amostras de sangue foram verificadas quanto à viabilidade celular, a qual deveria ser superior a 80%. Para tanto, foi utilizado o método de exclusão por azul de Trypan.

Para o ensaio, foram retirados 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra e imersos em 120  $\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão (LMP), a 37°C. Este homogeneizado foi transferido para lâminas previamente preparadas com agarose normal (NMP), as quais foram cobertas com lamínulas.

Após secagem em geladeira (30 min), as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram acondicionadas em cubas de vidro com solução de lise, a qual é composta por 89% de solução de lise estoque (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM), 1% de Triton X-100 e 10% de

DMSO. Na etapa de lise, as cubas foram mantidas em geladeira por 2 horas, para que ocorresse o rompimento de membranas celulares e nucleares. Passado este tempo, as lâminas foram retiradas da solução e colocadas em cubas de eletroforese, nas quais permaneceram submersas em tampão de eletroforese (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM e pH>13) por 30 minutos, no escuro, para o desenovelamento do DNA. Com a condição da fonte das cubas ajustada para 25 V e 300 mA, iniciou-se a eletroforese, com duração de 20 minutos. As lâminas foram então lavadas três vezes com tampão de neutralização (Tris 0,4 M), com intervalos de cinco minutos e, após secagem, foram acondicionadas novamente em cuba de vidro com solução de fixação (etanol 100%) por dez minutos. Após secagem, estas foram mantidas em geladeira. Para análise das células, as lâminas foram coradas com solução de GelRed, cobertas com lamínulas e levadas ao microscópio de fluorescência (equipado com filtro de excitação de 510-560nm e filtro de barreira de 590nm) em aumento de 400x.

Foram contadas 100 células por lâmina (réplicas) e estas foram classificadas em diferentes classes de danos, de acordo com a intensidade e tamanho da cauda do cometa, as quais podem ser visualizadas no Quadro 3 e na Figura 25.

Quadro 3 – Determinação das diferentes classes de dano do ensaio cometa.

Classe	Dano	Observação ao microscópio
0	Sem dano aparente	Sem cauda
1	Pouco dano	Cauda: menor que o diâmetro do núcleo
2	Dano médio	Cauda: uma a duas vezes maior que o diâmetro do núcleo
3	Dano intenso	Cauda: maior que o dobro do diâmetro do núcleo

Figura 25 - Micrografias dos tipos de dano ao DNA verificados no ensaio cometa.



Fonte: o autor.

Após a análise de todas as lâminas, foram calculados o Escore de Danos ao DNA e a porcentagem de Nucleóides Danificados para cada indivíduo, conforme as Equações 1 e 2, respectivamente, sendo “n” o número de danos.

$$\text{Escore de Danos ao DNA} = 0(n_{\text{Classe 0}}) + 1(n_{\text{Classe 1}}) + 2(n_{\text{Classe 2}}) + 3(n_{\text{Classe 3}}) \quad 1$$

$$\text{Nucleóides Danificados (\%)} = [(n_{\text{Total}} - n_{\text{Classe 0}})/n_{\text{Total}} \times 100 \text{ \%}] \quad 2$$

## MN e AENs

O teste de micronúcleo foi feito com eritrócitos de *A. altiparanae* de acordo com Heddle (1973) e Schimd (1975). Também foram analisadas nestas células a ocorrência de Anormalidades Eritrocíticas Nucleares (AENs) de acordo com Carrasco et al. (1990).

Com o sangue coletado, foi feito um esfregaço em lâminas, as quais foram fixadas em metanol por 10 min e, após secagem, foram armazenadas a 4°C. Para análise das células, as lâminas foram coradas com solução de laranja de acridina (0,003% em tampão Soenson, com pH 6,8) por 1,5 min. Estas foram lavadas e, após secagem, foram levadas ao microscópio de fluorescência, em aumento de 1000x (Figura 26). Foram contadas 3000 células por lâmina e observada a ocorrência de eritrócitos imaturos (EI), anormalidades eritrocíticas nucleares em eritrócitos imaturos (AEN-EI), micronúcleos (MN), núcleos segmentados (NS), núcleos em forma de rim (NR), núcleos lobulados (NL) e células binucleadas (CB).

Figura 26 - Diferentes tipos de anormalidades observadas nos eritrócitos de *A. altiparanae*.



Fonte: o autor.

Após a análise de todas as lâminas, foram calculadas as frequências de eritrócitos imaturos (EI), de micronúcleos (MN) e de anormalidades eritrocíticas nucleares (AEN), conforme as Equações 3, 4 e 5, respectivamente.

$$\text{EI (\%)} = \frac{\text{Número de eritrócitos imaturos}}{\text{Número total de células contabilizadas}} \times 1000 \text{ ‰} \quad 3$$

$$\text{MN (\%)} = \frac{\text{Número de eritrócitos contendo micronúcleos}}{\text{Número total de células contabilizadas}} \times 1000 \text{ ‰} \quad 4$$

$$\text{AEN (\%)} = \frac{\text{Número de eritrócitos contendo anormalidades nucleares}}{\text{Número total de células contabilizadas}} \times 1000 \text{ ‰} \quad 5$$

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizando-se o programa SigmaPlot versão 11.0, testou-se os resultados dos ensaios bioquímicos e genotóxicos quanto à normalidade e homogeneidade de variância, utilizando-se os testes de Shapiro Wilks e de Levene, respectivamente. Para a comparação dos resultados obtidos nos diferentes grupos experimentais (CTR x IMI 3 x IMI 30 x IMI 300 x IMI 3000) utilizou-se a análise de variância paramétrica ou não paramétrica (ANOVA ou Kruskal-Wallis), dependendo da distribuição dos dados, seguido por um teste de comparações múltiplas (Student Newman Keuls), quando indicado. Os valores foram considerados significativos para  $p < 0,05$ . Os dados foram representados nos gráficos na forma de média  $\pm$  erro padrão (EP) e nas tabelas como médias  $\pm$  desvio padrão (DP).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Os resultados dos parâmetros físicos e químicos da água do tanque de aclimação (obtido no último dia de aclimação) e dos aquários experimentais (média do período de exposição) podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros físicos e químicos da água de aclimação e de exposição dos peixes por grupo experimental.

GRUPO	Temperatura (°C)	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	pH	OD <sup>1</sup> ( $\text{mgO}_2 \text{L}^{-1}$ )	SST <sup>2</sup> ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Aclimação	23,16	122,00	7,57	6,93	80,00
Controle	24,54 $\pm$ 0,73	97,50 $\pm$ 0,87	8,12 $\pm$ 0,12	6,93 $\pm$ 0,12	63,50 $\pm$ 0,87
IMI 3	24,29 $\pm$ 0,28	99,50 $\pm$ 1,50	8,03 $\pm$ 0,01	6,96 $\pm$ 0,07	65,00 $\pm$ 1,00
IMI 30	24,43 $\pm$ 0,19	98,25 $\pm$ 0,83	8,04 $\pm$ 0,08	6,95 $\pm$ 0,04	63,50 $\pm$ 0,50
IMI 300	24,49 $\pm$ 0,20	98,00 $\pm$ 1,00	8,03 $\pm$ 0,11	6,86 $\pm$ 0,02	63,50 $\pm$ 0,50
IMI 3000	24,51 $\pm$ 0,22	96,00 $\pm$ 0,71	8,01 $\pm$ 0,14	6,93 $\pm$ 0,04	62,75 $\pm$ 0,43

<sup>1</sup>OD: Oxigênio dissolvido. <sup>2</sup>SST: Sólidos solúveis totais. Para os tanques de aclimação, estão representados os valores medidos no último dia de aclimação. Para os grupos experimentais, os valores foram agrupados e representados pela média  $\pm$  desvio padrão dos dias de exposição.

Não foram observadas variações significativas entre os valores dos parâmetros físicos e químicos da água dos aquários e do tanque de aclimação.

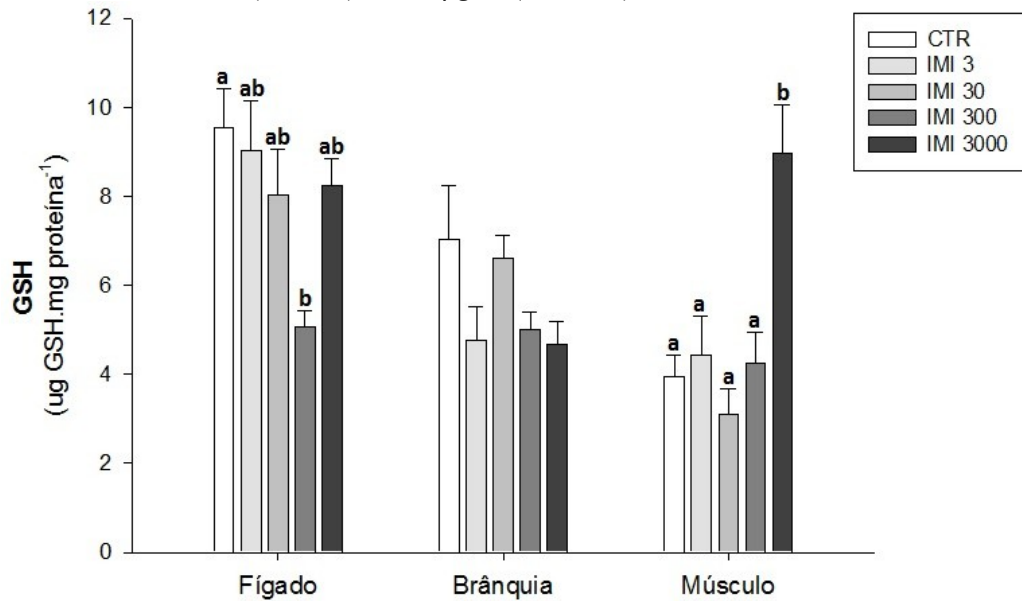
### 4.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

#### GSH

Os resultados das quantidades de GSH nos tecidos hepático, branquial e muscular dos peixes dos grupos experimentais podem ser visualizados na Figura 27. No fígado, houve diminuição significativa no conteúdo de GSH do grupo experimental IMI 300 em relação ao grupo controle ( $p = 0,026$ ), porém ambos os grupos não diferiram das demais concentrações estudadas ( $p > 0,05$ ). Nas brânquias, não foi observada diferença significativa na quantidade de GSH entre os grupos experimentais. Em relação ao músculo, houve aumento significativo no conteúdo de GSH do grupo IMI 3000 ( $p < 0,001$ ) em relação aos demais grupos. Observou-se que o conteúdo de GSH do fígado foi maior que das brânquias e do músculo, para maioria dos grupos experimentais.



Figura 27 - Conteúdo de GSH nos tecidos hepático, branquial e muscular de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300) e 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96 h.



As barras representam a média e as linhas verticais o EP (n: 5-10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, para um mesmo tecido ( $p < 0,05$ ).

## GST

Não foram constatadas diferenças significativas na atividade da GST entre os grupos experimentais, para todos os tecidos analisados (Figura 28).

Observou-se que a atividade desta enzima foi maior no cérebro do que nos demais tecidos.

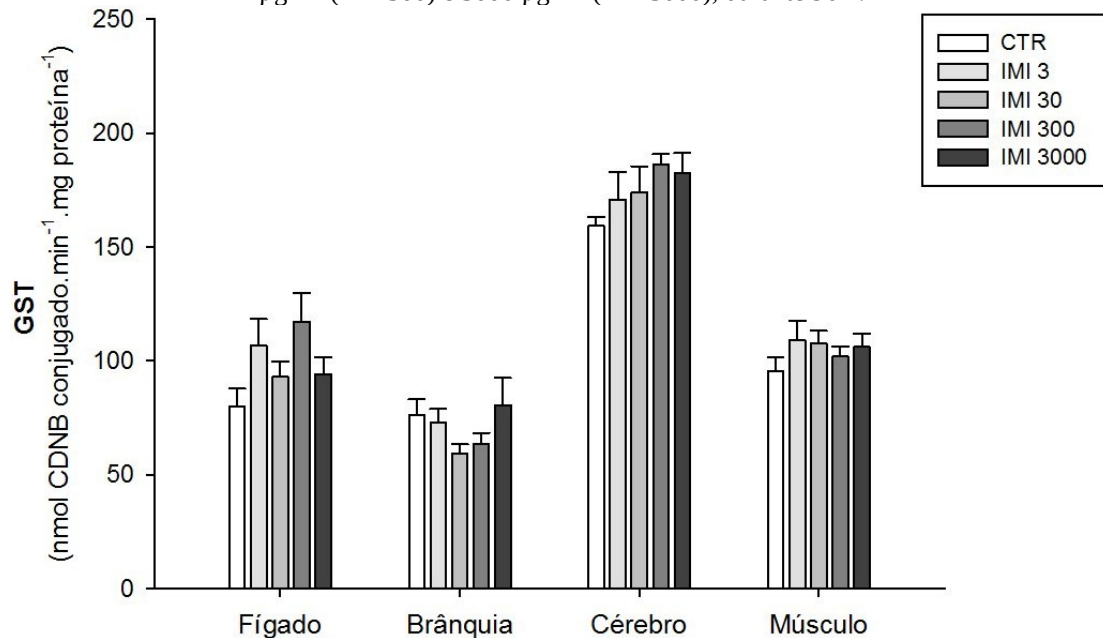
## LPO

Os resultados de LPO nos tecidos hepático, branquial, cerebral e muscular dos peixes dos grupos experimentais podem ser visualizados na Figura 29. Não foram observadas diferenças significativas no fígado e no cérebro para o conteúdo de TBARS, entre os grupos experimentais. Em relação às brânquias, os peixes do grupo IMI 3000 apresentaram LPO significativamente maior em relação aos demais grupos expostos ao inseticida ( $p = 0,003$ ), porém não diferiu do grupo controle, o qual também não diferiu dos demais grupos (IMI 3, 30 e 300). Em relação ao músculo, houve diminuição significativa na quantidade de TBARS do grupo IMI 300 em relação ao grupo IMI 3 ( $p = 0,018$ ), porém não houve diferença entre os demais grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).

Observou-se também que a peroxidação lipídica no músculo e no cérebro foi maior

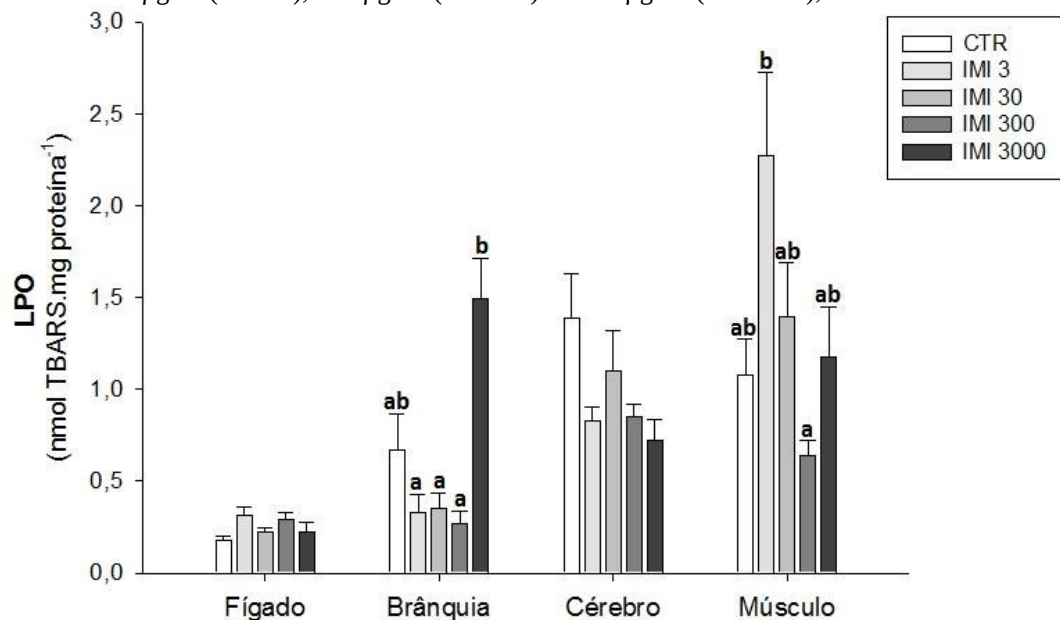
que nas brânquias e no fígado, para maioria dos grupos experimentais.

Figura 28 - Atividade da GST nos tecidos hepático, branquial, cerebral e muscular de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300) e 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96 h.



As barras representam a média e as linhas verticais o EP (n: 7-10).

Figura 29 - Quantificação da peroxidação lipídica (LPO) nos tecidos hepático, branquial, cerebral e muscular de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300) e 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96 h.



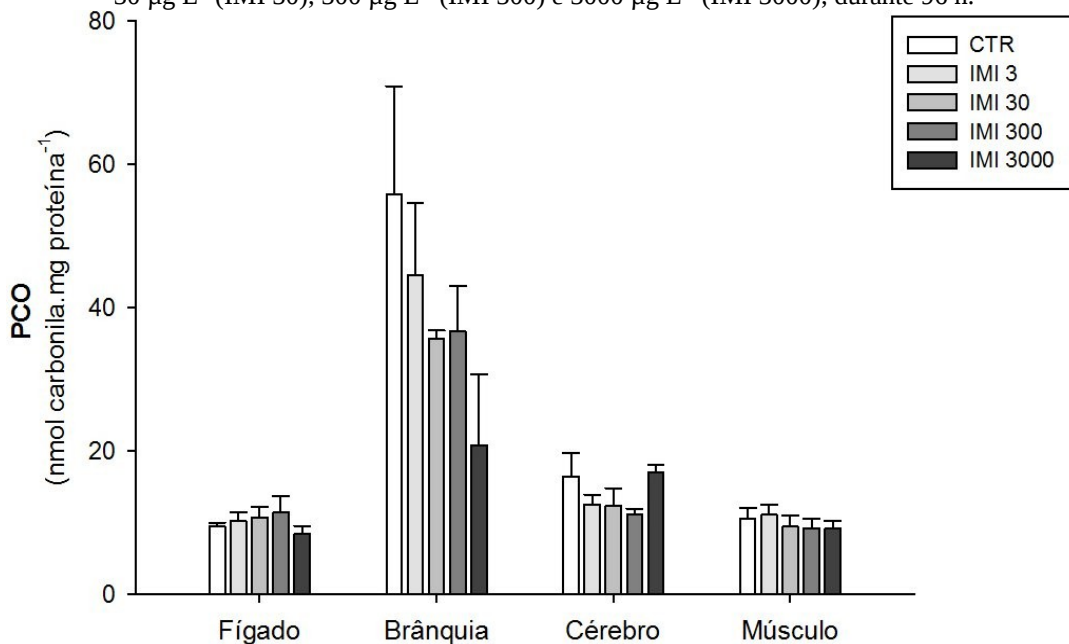
As barras representam a média e as linhas verticais o EP (n: 6-10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tecido ( $p < 0,05$ ).

## PCO

As quantidades de carbonilas proteicas nos tecidos hepático, branquial, cerebral e muscular dos peixes dos grupos experimentais podem ser visualizadas na Figura 30. Não foram constatadas variações significativas no conteúdo de PCO entre os diferentes grupos experimentais, para nenhum dos tecidos analisados.

Entretanto, verificou-se que a PCO nas brânquias foi maior que no cérebro, no músculo e no fígado, para maioria dos grupos experimentais.

Figura 30 - Quantificação da carbonilação proteica (PCO) nos tecidos hepático, branquial, cerebral e muscular de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300) e 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96 h.

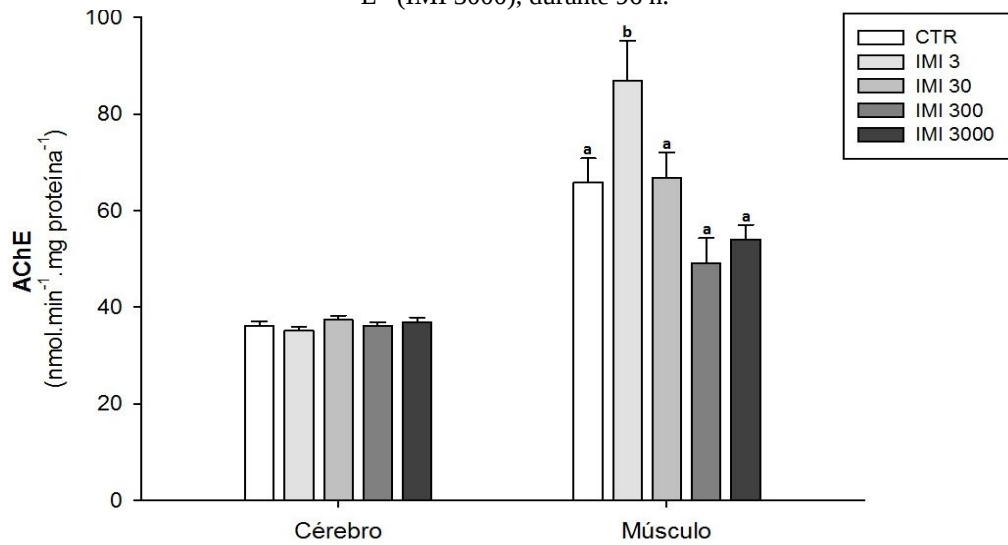


As barras representam a média e as linhas verticais o EP (n: 3-8).

## AChE

Os valores da atividade da AChE nos tecidos cerebral e muscular dos peixes dos grupos experimentais podem ser visualizados na Figura 31. No cérebro, não foi observada diferença significativa na atividade da AChE entre os grupos experimentais. Em relação ao músculo, houve aumento significativo na atividade desta enzima no grupo IMI 3 em relação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). Observou-se também que a atividade da acetilcolinesterase no músculo foi maior que no cérebro, para todos os grupos experimentais.

Figura 31 - Atividade da AChE no cérebro e músculo de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3), 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30), 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300) e 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96 h.



As barras representam a média e as linhas verticais o EP (n: 7-10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tecido ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE

#### Ensaio Cometa

Os resultados de escore de danos no DNA, obtidos com o ensaio cometa, não mostraram variações significativas na ocorrência de danos no DNA nos eritrócitos dos peixes dos diferentes grupos experimentais (Figura 32).

A porcentagem de cada tipo de dano e do total de nucleóides danificados por grupo experimental pode ser visualizada na Tabela 3. Também não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. No entanto, observa-se que tanto o escore de danos ao DNA quanto a frequência de nucleóides danificados no tratamento controle foi extremamente alta, com mais de 36% de dano do tipo 3.

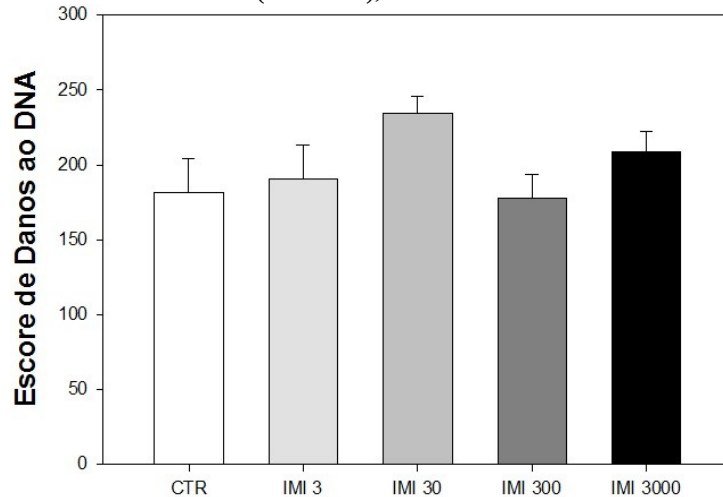
#### MN e AENs

A frequência de anormalidades eritrocíticas nucleares, de células micronucleadas e de eritrócitos imaturos observados nos peixes dos grupos experimentais podem ser visualizados na Figura 33 e na Tabela 4.

Não foram observadas diferenças significativas na frequência de eritrócitos imaturos e de micronúcleos entre os grupos experimentais. Porém, a frequência de anormalidades eritrocíticas nucleares aumentou no grupo IMI 3000 ( $p \leq 0,001$ ) em relação aos grupos CTR,

IMI 3 e IMI 30 ( $p > 0,05$ ). As alterações que contribuíram para esse aumento foram NS e NR, os quais tiveram aumento significativo no número de ocorrências no grupo IMI 3000 comparado com o grupo CTR ( $p < 0,05$ ).

Figura 32 - Escore de danos no DNA em eritrócitos de *A. altiparanae* expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido:  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3),  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30),  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300) e  $3000 \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96 h.

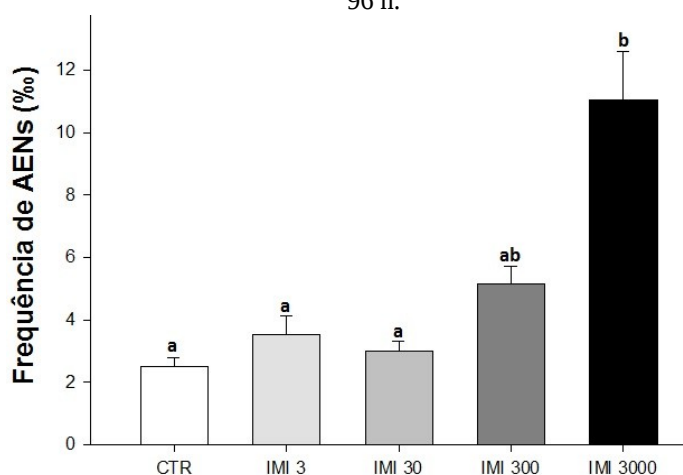


As barras representam a média e as linhas verticais o EP (n: 7-8).

Tabela 3 - Quantidade de cada tipo de dano e total de nucleóides danificados nos peixes expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido:  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3),  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 30),  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 300) e  $3000 \mu\text{g L}^{-1}$  (IMI 3000), durante 96 h.

GRUPO	DANO (%)				Nucleóides Danificados (%) (Média ± Desvio Padrão)
	0	1	2	3	
<b>CONTROLE</b>	8,71	22,86	31,86	36,57	91,29 ± 7,87
<b>IMI 3</b>	13,75	19,00	30,13	37,13	86,25 ± 13,01
<b>IMI 30</b>	8,50	10,25	34,50	46,75	91,50 ± 8,77
<b>IMI 300</b>	10,50	24,63	41,75	23,13	89,50 ± 9,01
<b>IMI 3000</b>	3,86	12,86	49,14	34,14	96,14 ± 2,41

Figura 33 - Frequência de AENs nos peixes expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3 µg L<sup>-1</sup> (IMI 3), 30 µg L<sup>-1</sup> (IMI 30), 300 µg L<sup>-1</sup> (IMI 300) e 3000 µg L<sup>-1</sup> (IMI 3000), durante 96 h.



As barras representam a média e as linhas verticais o EP (n: 7-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tecido ( $p < 0,05$ ).

Tabela 4 - Quantidade de cada tipo de alteração eritrocítica e frequência de EI, MN e AEN em 3000 eritrócitos analisados nos peixes expostos apenas à água (CTR), ou a diferentes concentrações de Imidacloprido: 3 µg L<sup>-1</sup> (IMI 3), 30 µg L<sup>-1</sup> (IMI 30), 300 µg L<sup>-1</sup> (IMI 300) e 3000 µg L<sup>-1</sup> (IMI 3000), durante 96 h.

	CTR	IMI 3	IMI 30	IMI 300	IMI 3000
<b>EI<sup>1</sup></b>	23,29 ± 12,45	38,29 ± 56,49	33,71 ± 29,90	57,00 ± 61,88	21,14 ± 14,19
<b>AEN-(EI)<sup>2</sup></b>	0,00	0,00	0,00	0,29 ± 0,76	0,14 ± 0,38
<b>MN<sup>3</sup></b>	0,00	0,14 ± 0,38	0,14 ± 0,38	0,29 ± 0,49	0,29 ± 0,49
<b>NS<sup>4</sup></b>	3,00 ± 2,08 <sup>ab</sup>	4,86 ± 2,54 <sup>abc</sup>	1,86 ± 1,21 <sup>a</sup>	6,86 ± 3,18 <sup>bc</sup>	16,43 ± 8,92 <sup>c</sup>
<b>NR<sup>5</sup></b>	2,43 ± 1,62 <sup>a</sup>	3,14 ± 1,95 <sup>a</sup>	5,00 ± 2,31 <sup>ab</sup>	5,29 ± 2,14 <sup>ab</sup>	11,71 ± 6,95 <sup>b</sup>
<b>NL<sup>6</sup></b>	2,14 ± 1,77	2,29 ± 1,80	1,71 ± 0,95	2,29 ± 1,50	4,43 ± 3,15
<b>CB<sup>7</sup></b>	0,00	0,14 ± 0,38	0,33 ± 0,52	0,71 ± 1,50	0,29 ± 0,76
<b>FREQ. EI (%)</b>	7,76 ± 4,15	12,76 ± 18,83	11,24 ± 9,97	19,00 ± 20,63	7,05 ± 4,73
<b>FREQ. MN (%)</b>	0,00	0,05 ± 0,13	0,05 ± 0,13	0,10 ± 0,16	0,10 ± 0,16
<b>TOTAL AEN</b>	7,57 ± 2,07 <sup>a</sup>	10,57 ± 4,89 <sup>a</sup>	9,00 ± 2,71 <sup>a</sup>	15,43 ± 4,65 <sup>ab</sup>	33,14 ± 12,38 <sup>b</sup>
<b>FREQ. AEN (%)</b>	2,52 ± 0,69 <sup>a</sup>	3,52 ± 1,63 <sup>a</sup>	3,00 ± 0,90 <sup>a</sup>	5,14 ± 1,55 <sup>ab</sup>	11,05 ± 4,13 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>EI: eritrócitos imaturos; <sup>2</sup>AEN-EI: anormalidades eritrocíticas nucleares em eritrócitos imaturos; <sup>3</sup>MN: micronúcleos; <sup>4</sup>NS: núcleos segmentados; <sup>5</sup>NR: núcleo em forma de rim; <sup>6</sup>NL: núcleos lobulados; <sup>7</sup>CB: células binucleadas. Para os grupos experimentais, os valores foram agrupados e representados pela média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos de um mesmo tecido ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, os efeitos do inseticida neonicotinóide imidacloprido foram avaliados no peixe neotropical *Astyanax altiparanae*. Como visto anteriormente, trata-se de um dos princípios ativos mais utilizados no Brasil e no mundo, o qual já foi banido de alguns países e proibido na União Europeia devido a sua toxicidade a organismos não-alvo (IBAMA, 2013a; BÚRIGO et al., 2015; SIMON-DELSO et al., 2015).

Diversos estudos já verificaram sua presença em diferentes recursos hídricos ao redor do mundo em concentrações que variaram de 0,04 a mais de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  (BORTOLUZZI et al., 2006; KREUGER et al., 2010; VAN DIJK, 2010; STARNER; GOH, 2012; ENSMINGER et al., 2013; MAIN et al., 2014; SÁNCHEZ-BAYO; HYNE, 2014). Muitas das quais se encontravam acima dos valores de referência para proteção da vida aquática em água doce utilizados pelo Canadá e Estados Unidos, 0,23 e 1,05  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015). E algumas destas concentrações foram até maiores que 1/10 da  $\text{CL}_{50}$  (até 96 h) de imidacloprido para peixes e anfíbios (1200 a 366000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sendo assim passíveis de causar efeitos subletais nesses organismos (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015).

Vale ressaltar que no Brasil ainda não foi estabelecido um limite máximo para concentração de nenhum dos neonicotinóides nos recursos hídricos (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015). E até o presente momento, não há publicações de estudos que tenham utilizado os mesmos biomarcadores deste trabalho para avaliar os efeitos do imidacloprido (ou de outros neonicotinóides) em peixes.

Como já mencionado no item 3.2, neste trabalho, os peixes foram expostos a concentrações do inseticida que variaram de 3 a 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em progressão geométrica de razão 10, sendo que a menor concentração do inseticida foi definida com base em análises realizadas na água da microbacia do Ribeirão José Pereira (Itajubá - MG).

Verificou-se que, dependendo da concentração, o imidacloprido pode causar alterações no status oxidativo que resultaram em danos oxidativos, como peroxidação lipídica, além de aumento na frequência de alterações eritrocíticas nucleares. Como visto anteriormente, muitos xenobióticos, como os agrotóxicos, contribuem para o aumento da produção de ERO, as quais podem interagir com biomoléculas e afetar suas funções. Para controlar a concentração dessas espécies, as células apresentam sistemas de defesa compostos por moléculas antioxidantes (tocoferóis, ácido ascórbico e glutathione) e enzimas antioxidantes (como catalase, peroxidase e superóxido dismutase) (SMART; HODGSON, 2008; GAGNÉ, 2014; NIKINMAA, 2014).

No presente trabalho, a elevação significativa no conteúdo de GSH no músculo dos animais do grupo IMI 3000 pode estar relacionada ao aumento da produção de ERO, sendo uma tentativa de impedir o dano oxidativo, como a ocorrência de LPO, mesmo que esta não tenha sido significativa neste tecido.

Ao entrar no organismo, os inseticidas neonicotinóides podem ser biotransformados em duas etapas, sendo que a principal rota de biotransformação do imidacloprido é pela hidroxilação do anel do grupo imidazolidina e subsequente desidratação para formação de olefinas (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015; SIMON-DELSO et al., 2015). A conjugação de xenobióticos polares (como imidacloprido e seus metabólitos) à GSH representa uma importante via da fase II da biotransformação em invertebrados e peixes, sendo catalisada pela GST (GAGNÉ, 2014). Entretanto, neste trabalho, não houve alteração significativa na atividade desta enzima em nenhum dos tecidos analisados dos animais dos diferentes grupos experimentais. Este resultado pode ser devido ao fato de que a GST já estava presente em quantidade suficiente para detoxificação do imidacloprido e seus metabólitos, de que o excesso de ERO tenha causado uma exaustão da atividade desta enzima ou ainda de que ela não seja um biomarcador sensível à exposição a este inseticida e aos seus efeitos em *A. altiparanae*. A resposta da GST depende do tempo de exposição, do tipo e concentração do xenobiótico, além da espécie em estudo, sendo que vários poluentes falharam na indução de sua atividade em vertebrados e invertebrados (CALLAGHAN et al., 2002; WU et al., 2011; CLASEN et al., 2012).

Nas brânquias, as defesas antioxidantes não foram suficientes para evitar o dano oxidativo. O aumento na quantidade de MDA (indicado pelo aumento de TBARS) observado no tecido branquial de *A. altiparanae* indica um aumento na ocorrência de LPO com a elevação da concentração de inseticida. A ocorrência de dano oxidativo a lipídeos, proteínas e DNA é consequência direta do estresse oxidativo, um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante/antioxidante da célula causado pelo excesso de ERO (SMART; HODGSON, 2008; GAGNÉ, 2014; NIKINMAA, 2014).

Apesar de não terem sido observadas alterações significativas na ocorrência de PCO em todos os tecidos analisados, houve uma maior ocorrência de danos proteicos nas brânquias com relação aos demais tecidos analisados. Mas estes danos não aumentaram em virtude da presença do inseticida. Não há, até o momento na literatura, publicações que tenham investigado os efeitos do imidacloprido (ou de outros neonicotinóides) em brânquias de *A. altiparanae*. Entretanto, Feng et al. (2007) verificaram a ocorrência de efeitos citotóxicos a células branquiais em outro peixe teleósteo, *Paralichthys olivaceus*, exposto (*in vitro*) por 48



horas a concentrações que variaram de 500 a 80000  $\mu\text{g L}^{-1}$  deste inseticida.

Como visto anteriormente, o imidacloprido interage de forma agonista com sub-sítios específicos dos nAChRs, interferindo no funcionamento do canal de sódio da membrana pós-sináptica. Esta interação impede a ligação da ACh, causando a constante estimulação do receptor, podendo levar a diminuição da atividade da AChE e interferir no funcionamento do sistema nervoso central e periférico. A exposição ao imidacloprido pode levar a diminuição da ventilação e a locomoção de peixes, podendo ter consequências ecológicas e populacionais (AZEVEDO-PEREIRA; LEMOS; SOARES, 2011; NIKINMAA, 2014; ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015; GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015; SIMON-DELISO et al., 2015).

Wang et al. (2015) observaram essa diminuição na atividade da AChE, além da ocorrência de danos ao DNA em minhocas *Eisenia fetida* expostas por 21 dias a 0,005, 0,02, 0,1, 0,5 e 1,0  $\text{mg kg}^{-1}$  de imidacloprido. Azevedo-Pereira, Lemos e Soares (2011) reportaram a mesma observação com relação a atividade desta enzima em pernilongos *Chironomus riparius* expostos por 96 h a 0,50, 1,50 e 3,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de imidacloprido.

Neste trabalho, diferentemente do esperado, não foram observadas reduções significativas na atividade da AChE nos tecidos analisados dos animais dos diferentes grupos experimentais. Ao contrário, o músculo dos peixes expostos a menor concentração do inseticida apresentou aumento significativo na atividade da AChE. Boily et al. (2013) também reportaram aumento na atividade desta enzima em abelhas *Apis mellifera* alimentadas por 10 dias com solução de açúcar contaminada com imidacloprido (0,08; 0,16; 0,24 ng por abelha). Foram observados sintomas de neurotoxicidade e mortalidade na menor concentração testada (0,08 ng por abelha ou 1,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Os autores não previam esse resultado, mas presumem que pode ser devido ao acúmulo de acetilcolina (que não conseguiu se ligar aos receptores iônicos bloqueados pelo neonicotinóide) na fenda sináptica, estimulando a ação da AChE (ao contrário do descrito por Azevedo-Pereira, Lemos e Soares (2011)).

Neste trabalho também foi observado que a atividade desta enzima foi maior no músculo que no cérebro. A ACh é o neurotransmissor mais importante nas junções musculares e uma mudança na atividade da AChE pode causar alterações no comportamento e na atividade neuromuscular (GAGNÉ, 2014). Por esse motivo o músculo e o cérebro foram os órgãos analisados, mas como o cérebro é fisicamente mais protegido que o músculo, este foi o mais atingido. Em estudo realizado por Crosby et al. (2015) o imidacloprido causou efeitos neurocomportamentais em embriões de *Danio rerio* expostos a concentrações de 45 e 60  $\mu\text{M}$  (11504,7 e 15339,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de 4 horas a 5 dias pós fertilização.

Como mencionado no item 2.3.2, eventos genéticos são utilizados em muitos estudos como biomarcadores de exposição a compostos genotóxicos, avaliando a capacidade do organismo em conservar a integridade do DNA e lidar com o dano (PRINTES, 2004). O dano pode ser gerado e induzido por agentes endógenos e ambientais, como no caso do dano oxidativo. As ERO podem levar à modificação oxidativa do DNA pela ligação e modificação química das bases ou pela indução de mudanças em sua conformação, causando quebra da fita, podendo levar a mutações e problemas na replicação do DNA (SMART; HODGSON, 2008). Em cada célula do organismo podem ocorrer diariamente cerca de mil lesões no DNA devido ao metabolismo celular e para que um mínimo de dano seja verificado no controle negativo do ensaio cometa, é necessário que as condições técnicas deste, como tempo de relaxamento e eletroforese, sejam moduladas (PRETTI et al., 2007). Desta forma, a alta frequência de dano ao DNA observada no grupo controle (principalmente do tipo 3, o qual é mais difícil de ser reparado) assim como a falta de diferenças significativas entre os grupos pode ser devido a ocorrência de problemas metodológicos. Assim, deveriam ter sido feitas repetições deste ensaio para identificar as condições ideais e obter resultados mais confiáveis.

Enquanto os danos ao DNA avaliados pelo ensaio cometa podem ser reversíveis, as alterações nucleares marcam o dano já causado e processado. Como visto anteriormente, alguns autores consideram que essas alterações morfológicas nos núcleos de eritrócitos sejam devido a exposição a compostos genotóxicos, mas seus mecanismos de formação (com exceção do micronúcleo) ainda não foram compreendidos (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2001). Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas na ocorrência de MN entre os grupos experimentais, o aumento significativo na frequência de AENs (como NS e NR) nos animais do grupo IMI 3000 indica que este resultado pode estar relacionado à exposição ao imidacloprido.

Ambrósio (2012) observou a ocorrência de MN no meristema de células vegetais de *Allium cepa* após 24 horas de exposição a  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  de imidacloprido. Arcaute et al. (2014) também verificaram a ocorrência de MN e outras AENs em eritrócitos de sapos *Hypsiboas pulchellus* expostos por 48 e 96 horas a  $15000 \mu\text{g L}^{-1}$  deste neonicotinóide. Estes resultados indicam que o imidacloprido pode apresentar potencial mutagênico em algumas espécies até em concentrações ainda não observadas nos corpos aquáticos naturais, assim como verificado no presente trabalho.

Assim, os ensaios mais sensíveis à ação deste neonicotinóide em *A. altiparanae* foram de GSH no músculo, LPO nas brânquias e de alterações nucleares nos eritrócitos. E a concentração que causou mais alterações e danos significativos nos lambaris foi a maior

testada, 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Entretanto este foi um teste de curta duração (96 horas), o que induz que uma exposição crônica a concentrações menores de imidacloprido, assim como a mistura com outros nicotinóides, podem fornecer diferentes resultados com relação à ocorrência de efeitos bioquímicos e genotóxicos em *A. altiparanae*, necessitando assim de maiores investigações.

O órgão mais sensível à ação do imidacloprido foi o músculo (confirmado pelos resultados dos ensaios de GSH, LPO e AChE), seguido das brânquias (pela LPO e PCO) e do cérebro (GST e LPO). Ao afetar o músculo e portanto a locomoção de *A. altiparanae*, a exposição ao imidacloprido pode trazer consequências ecológicas a nível populacional, pois uma vez que, ao ter sua locomoção prejudicada, os peixes não conseguem fugir de seus predadores, diminuindo assim sua população.

A falta de alterações significativas observada nos ensaios realizados com as brânquias (GSH, GST e PCO), o fígado (GSH, GST, LPO e PCO), o músculo e o cérebro (GST, LPO, PCO e AChE) e com eritrócitos (ensaio cometa e MN) poderiam ter sido melhor interpretadas se tivessem sido feitas as quantificações das ERO e do imidacloprido nos tecidos analisados, as quais deverão ser realizadas em futuras investigações.

Assim, é de extrema importância que sejam realizadas novas abordagens para verificar a presença deste e dos demais inseticidas neonicotinóides tanto em amostras de água como no compartimento sedimento dos ecossistemas aquáticos. Além de avaliar o potencial ecotoxicológico destes agrotóxicos nos organismos aquáticos em geral, para confirmar os resultados obtidos neste trabalho e reavaliar a utilização de seus ingredientes ativos nas culturas indicadas pela Legislação Brasileira.

## 6 CONCLUSÃO

Após 96 horas de exposição, a concentração de 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de imidacloprido causou alterações no status oxidativo (marcada pelo aumento de GSH no músculo) que resultaram em danos oxidativos, como peroxidação lipídica (nas brânquias), podendo também estar relacionada ao aumento da frequência de alterações eritrocíticas nucleares (como NS e NR) verificada nos exemplares de *A. altiparanae*.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. I13 – Imidacloprido. **Monografias Autorizadas**. ANVISA, Brasília, 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/65735a004862bcc2b6fdbf734e60b39c/I13++Imidacloprido.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES & DISEASE REGISTRY. **Cholinesterase Inhibitors: Including Insecticides and Chemical Warfare Nerve Agents**. ATSDR, Atlanta, 2007. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/csem/cholinesterase/docs/cholinesterase.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

ALMEIDA, R. B. C. ***Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação** (Tese). Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2007. 119 p.

AL-SAWAFI, A. G. A.; YAN, Y. Bioconcentration and Antioxidant Status Responses in Zebrafish (*Danio Rerio*) Under Atrazine Exposure. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, Nars City, London and New York, v. 4, n. 4, p. 204-208. 2013.

AMBRÓSIO, J. B. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de 2 classes de agrotóxicos utilizados em cultura de cana-de-açúcar no estado de São Paulo - Brasil** (Tese). Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, 2012. 128 p.

AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J. C.; MOUNEYRAC, C. **Aquatic Ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks**. London, San Diego, Waltham, Oxford: Elsevier, 2015. 504 p.

ANDERSON, J. C.; DUBETZ, C.; PALACE, V. P. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 505, p. 409-422. 2015.

ARCAUTE, C. R.; PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; NIKOLOFF, N.; NATALE, G. S.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 45, p. 632-639, 2014.

ARGUS BIO. **Bradford Assay: forms of Coomassie Brilliant Blue**. Disponível em: <[http://www.lightboxkit.com/index\\_files/Images/BradfordAssay/coomassie\\_forms.jpg](http://www.lightboxkit.com/index_files/Images/BradfordAssay/coomassie_forms.jpg)>.

Acesso em: 25 mar. 2015.

AUGUSTO, L. G. S.; CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W. A.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; FARIA, N. M. X.; BÚRIGO, A. C.; FREITAS, V. M. T. Saúde, ambiente e sustentabilidade. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. (Org.). **Dossiê Abrasco**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Parte 2.

ATAMANIUK, T. M.; KUBRAK, O. I.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): studies with goldfish gills. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 22, n. 10, p. 1498-1508, 2013.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 49, n. 3, p. 221-225, 2001.

AZEVEDO-PEREIRA, H.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholinesterase activity to behaviour. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 74, n. 5, p. 1210-1215, 2011.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 272, n. 33, p. 20313-20316, 1997.

BEUTLER, E.; DUROM, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-888, 1963.

BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R.; ZANELLA, R.; COPETTI, A. C. C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 4, p. 881-887. 2006.

BOILY, M.; SARRASIN, B.; DeBLOIS, C.; ARAS, P.; CHAGNON, M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: Laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 20, n. 8, p. 5603-5614, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Decreto n.º 5.053, de 23 de abril de 2004. Aprova o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem ou Comerciem, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 abr. 2004. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2004/decreto/d5053.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d5053.htm)>. Acesso em: 2 fev. 2016.

BRASIL. Decreto n.º 6.296, de 12 de dezembro de 2007. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, que dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatórias dos produtos destinados à alimentação animal, dá nova redação aos arts. 25 e 56 do Anexo ao Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 dez. 2007. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2007/Decreto/D6296.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2007/Decreto/D6296.htm)>. Acesso em: 2 fev. 2016.

BRASIL. Lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 jul. 1989. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm)>. Acesso em: 9 jan. 2016.

BÚRIGO, A. C.; FRIEDRICH, K.; MEIRELLES, L. C.; TYGEL, A. F.; FOLGADO, C. A. F.; CARNEIRO, F. F.; FERNANDES, G. B.; AUGUSTO, L. G. S.; MELLO, M. S. C.; SOUZA, M. M. O.; RIGOTTO, R. M.; PIGNATI, W. A.; SCHMITT, C. J.; MONTEIRO, D.; LONDRES, F.; DAYRELL, C. A.; FERRARI, E. A.; OLIVEIRA, J. F.; PEREZ-CASSARINO, J.; FALCÃO, F. C. O.; MONTEIRO, F. T.; CARDOSO, I. M.; WEID, J. M.; MELGAREJO, L.; GONÇALVES, P. R.; SURITA, R. A crise do paradigma do agronegócio e as lutas pela agroecologia. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. (Org.). **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Parte 4.

CALLAGHAN, A.; FISHER, T.; GROSSO, A.; HOLLOWAY, G. J.; CRANE, M. Effect of temperature and pirimiphos methyl on biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 52, n. 2, p. 128-133, 2002.

CAMEJO, G., WALLIN, B., ENOJARVI, M. Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates. In: Amstrong, D. (ed) **Free radical and antioxidants protocols**. Humana Press, New Jersey, p. 377-387. 1998.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W. A.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; PINHEIRO, A. R. O.; FARIA, N. M. X.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. Segurança alimentar e nutricional e saúde. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. (Org.). **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular,

2015. Parte 1.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990.

CARROLA, J.; SANTOS, N.; ROCHA, M. J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; PARDAL, M. A.; MONTEIRO, R. A. F.; ROCHA, E. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries – Portugal. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 21, n. 9, p. 6057-6068, 2014.

CARSON, R. **Primavera silenciosa**. 2. ed. Traduzido por Raul de Polillo. São Paulo: Melhoramentos, 1969. p. 18.

CAVALCANTE, D. G. S. M. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do Rondup® em peixes *Prochilodus lineatus*** (Dissertação). Londrina: Universidade Estadual de Londrina. 2008. 82 p.

CLASEN, B.; LORO, V. L.; CATTANEO, R.; MORAES, B.; LÓPES, T.; AVILA, L. A.; ZANELLA, R.; REIMICHE, G. B.; BALDISSEROTTO, B. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice-fish cultivation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 77, p. 45-51, 2012.

COSTA, J. R. M. A.; MELA, M.; ASSIS, H. C. S.; PELLETIER, E.; RANDI, M. A. F.; RIBEIRO, C. A. O. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 67, n. 1, p. 82-88, 2007.

CROSBY, E. B.; BAILEY, J. M.; OLIVERI, A. N.; LEVIN, E. D. Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebra fish. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 49, p. 81-90, 2015.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES Jr., V.; FEATHERSTONE R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 88-90. 1961.

ENSMINGER, M. P; BUDD, R.; KELLEY, K. C.; GOH, K. S. Pesticide occurrence and aquatic benchmark exceedances in urban surfasse Waters and sediments in three urban áreas of California, USA, 2008-2011. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v.



185, n. 5, p. 3697-3710. 2013.

ESCOBAR, H. Instituto culpa transgênicos por aumento no uso de agrotóxicos, sem provas; especialistas rebatem. **Estadão**, São Paulo, 23 abr. 2015. Disponível em: <<http://ciencia.estadao.com.br/blogs/herton-escobar/instituto-culpa-transgenicos-por-aumento-no-uso-de-agrotoxicos-especialistas-rebatem/>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

FENG, S.; SHICUI, Z.; HONGYAN, L.; HUARONG, G. *In vitro* acute cytotoxicity of neonicotinoid insecticide imidacloprid to gill cell line of flounder *Paralichthy olivaceus*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, Beijing, v. 25, n. 2, p. 209-214, 2007.

FERREIRA, A. P.; CUNHA, C. L. N.; WERMELINGER, E. D.; SOUZA, M. B.; LENZI, M. F.; MESQUITA, C. M.; JORGE, L. C. Impactos de pesticidas na atividade microbiana do solo e sobre a saúde dos agricultores. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 30, n. 2, p. 309-321. 2006.

FILIPAK NETO, F. Pollutants and Oxidative Stress. In: ALMEIDA, E. A.; RIBEIRO, C. A. O. (Ed.). **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems**. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 84-131.

GAGNÉ, F. **Biochemical Ecotoxicology: principles and methods**. London, Waltham, San Diego: Elsevier, 2014. 257 p.

GARUTTI, V.; BRITTISK, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS: Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 13, p. 65-88, 2000.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. São Paulo: Editora da UNESP, 2003. 332 p.

GENTRONIX. **MicroFlow® Micronucleus Test**. Disponível em: <<http://www.gentronix.co.uk/product/micro-nucleus-test/>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

GIBBONS, D.; MORRISSEY, C.; MINEAU, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 22, n. 1, p. 103–118. 2015.

GHISI, N. C.; CESTARI, M. M. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 185, n. 4, p. 3201-

3207, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 18, p. 187-190, 1973.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J. **Handbook of Ecotoxicology**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. 2003. 1290 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS RENOVÁVEIS. **Boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil: 2013a**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. **Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins: histórico de vendas – 2000 a 2012**. Brasília: Ibama, 2013b.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Dimensão ambiental: terra – uso de agrotóxicos. In: IBGE. **Indicadores de desenvolvimento sustentável: Edição 2015**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ids/default.asp?o=8&i=P>>. Acesso em: 7 jan. 2016.

JEBALI, J.; BANNI, M.; GUERBEJ, H.; ALMEIDA, E. A.; BANNAOUI, A.; BOUSETTA, H. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 32, n. 1, p. 93-98, 2006.

JEON, H.; LEE, Y.; MO, H.; KIM, M.; AL-WABEL, M. I.; KIM, Y.; CHO, K.; KIM, T.; OK, Y. S.; LEE, S. Chlorpyrifos-induced biomarkers in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 23, p. 1071-1080. 2016.

JESCHKE, P.; NAUEN, R. Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry. **Pest Management Science**, Hoboken, v. 64, n. 11, p. 1084-1098. 2008.

JESCHKE, P.; NAUEN, R.; SCHINDLER, M.; ELBERT, A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 2897-2908. 2011.

KARAM, D.; RIOS, J. N. G.; FERNANDES, R. C. **Agrotóxicos**. Sete Lagoas: Embrapa, 2014.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the Glutathione S-Transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KREUGER, J.; GRAAF, S.; PATRING, J.; ADIELSSON, S. **Pesticides in surface water in areas with open ground and greenhouse horticultural crops in Sweden 2008**. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2010. 49 p.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346-357, 1994.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2011.

MADIAN, A. G.; REGNIER, F. E. Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 8, p. 3766 – 3780, 2010.

MAIN, A. R.; HEADLEY, J. V.; PERU, K. M.; MICHEL, N. L.; CESSNA, A. J.; MORRISSEY, C. A. Widespread use and frequente detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's Prairie Pothole Region. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 1-12. 2014.

MANAHAN, S. E. **Toxicological chemistry and biochemistry**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2003.

MARTINEZ, C. B. R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: SOUZA, A. T. S. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA, 2006. p. 43-62.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, Oxford, v. 78, n. 3, p. 294-299, 2010.

MONTEIRO, D. A.; ALMEIDA, J. A. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology**,

Hayward, v. 143, n. 2, p. 141-149, 2006.

NASCIMENTO, E. Mecanismos bioquímicos dos agentes químicos: biotransformação. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008. p. 39-54.

NEWMAN, M. C.; CLEMENTS, W. H. **Ecotoxicology: a comprehensive treatment**. Boca Raton: CRC Press. 2008. 852 p.

NIKINMAA, M. **An introduction to Aquatic Toxicology**. Waltham, Oxford: Elsevier, 2014. 240 p.

NOGUEIRA, L. **Estudo comparativo do estresse oxidativo entre tilápias (*Oreochromis niloticus*) e cascudos (*Pterygoplichthys anisitsi*) expostos a óleo diesel e a biodiesel** (Dissertação). São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista. 2011. 81 p.

NUNES, C. F. **Citologia III** (2 de outubro de 2011). Disponível em: <<http://biofraganunes.blogspot.com.br/2011/10/citologia-iii.html>>. Acesso em: 19 mai. 2016.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 207-218, 2004.

OSÓRIO, V. M.; CARDEAL, Z. L. Analytical Methods to Assess Carbonyl Compounds in Foods and Beverages. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 24, n. 11, p. 1711-1718, 2013.

PEREIRA, L.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 1-8, 2013.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Org.) **É veneno ou remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. p. 21-41.

PETERSEN, P. Prefácio. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. (Org.). **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. p. 27-36.

PRETTI, E.; CAVALCANTE, D.; SIMONATO, J. D.; MARTINEZ, C. B. R. Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu, 2007.

PRINTES, L. B. Minicurso: Biomarcadores em Invertebrados Aquáticos para Análise Ambiental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 8., 2004, Florianópolis. **Resumo Estendido das Palestras**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia, 2004. 27 p.

RAMSDORF, W. A.; GUIMARAES, F. S. F.; FERRARO, M. V. M.; GABARDO, J.; TRINDADE, E. S.; CESTARI, M. M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 673, n. 1, p. 78-81, 2009.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 7, p. 1199-1208, 2014.

R&D SYSTEMS. **Single Cell Gel Electrophoresis Assay/CometAssay®**. Disponível em: <<https://www.rndsystems.com/products/single-cell-gel-electrophoresis-assay-cometassay>>. Acesso em: 7 mar. 2016.

RIGOTTO, R. M.; PORTO, M. F. S.; FOLGADO, C. A. R.; FARIA, N. M. X.; AUGUSTO, L. G. S.; BEDOR, C. N. G.; BÚRIGO, A. C.; CARNEIRO, F. F.; CASTRO, F. P.; FERNANDES, G. B.; FERREIRA, M. J. M.; FRIEDRICH, K.; MARINHO, A. M. C. P.; MONTEIRO, D.; PIGNATI, W. A.; PINHEIRO, T. M. M.; PINHEIRO, A. R. O.; SILVA, N. R.; TYGEL, A. Conhecimento científico e popular: construindo a ecologia de saberes. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. (Org.). **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Parte 3.

ROSSI, S. C.; SILVA, M. D.; PIANCINI, L. D. S.; RIBEIRO, C. A. O.; CESTARI, M. M.; ASSIS, H. C. S. Sublethal effects of waterborne herbicides in tropical freshwater fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 87, n. 6, p. 603-607, 2011.

ROVER Jr., L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SANCHES, A. L. M. **Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax* sp.): testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidativo, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação** (Dissertação). São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista. 2014. 77 p.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; HYNE, R. V. Detection and analysis of neonicotinoids in river waters - Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. **Chemosphere**, Oxford, v. 99, p. 143-151. 2014.

SANTOS, T. G.; MARTINEZ, C. B. R. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, Oxford, v. 89, n. 9, p. 1118-1125, 2012.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, p. 9-15. 1975.

SIMIC, T.; SAVIC-RADOJEVIC, A.; PLJESA-ERCEGOVAC, M.; MATIC, M.; MIMIC-OKA, J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. **Nature Reviews Urology**, New York, v. 6, n. 5, p. 281-289. 2009.

SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C. H.; LIESS, M.; LONG, E.; McFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A. D.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J. P.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 22, n. 1, p. 5-34. 2015.

SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R., SCHNEIDER, E. L. A. Single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cellular Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191. 1988.

SMART, R. C.; HODGSON, E. **Molecular and biochemical toxicology**. 4th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. 2008.

SPADOTTO, C. A.; SCORZA Jr., R. P.; DORES, E. F. G. C.; GEBLER, L.; MORAES, D. A. C. **Documentos 78**: Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite. 2010. 46 p.

STARNER, K.; GOH, K. S. Detections of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in surface Waters of three agricultural regions of California, USA, 2010-2011. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 88, n. 3, p. 316-321. 2012.

TABASSUM, H.; DAWOOD, A. Q.; SHARMA, P.; KHAN, J.; RAISUDDIN, S.; PARVEZ, S. Multi-organ toxicological impact of fungicide propiconazole on biochemical and histological profile of freshwater fish *Channa punctata* Bloch. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 63, p. 359-365. 2016.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da glutathione S-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 243-248, 2004.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008. p. 327-346.

UNEME, H. Chemistry of clothianidin and related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 2932-2937. 2011.

VAN DIJK, T. C. **Effects of neonicotinoid pesticide pollution of Dutch surface water on non-target species abundance** (Thesis). Utrecht: Utrecht University, 2010. 77 p.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIEIRA, C. E. D. **Biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em duas espécies de peixes neotropicais para avaliação da contaminação aquática em áreas agrícolas no norte do Paraná** (Dissertação). Londrina: Universidade Estadual de Londrina. 2014. 132 p.

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. (Ed.). **Principles of ecotoxicology**. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, 2001.

WANG, K.; QI, S.; MU, X.; CHAI, T.; YANG, Y.; WANG, D.; LI, D.; CHE, W.; WANG, C. Evaluation of the toxicity, AChE activity and DNA damage caused by imidacloprid on Earthworms, *Eisenia fetida*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 95, n. 4, p. 475-480, 2015.

WU, H.; GAO, C.; GUO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; MA, E. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 115, p. 9-14. 2014.

WU, H.; ZHANG, R.; LIU, J.; GUO, Y.; MA, E. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). **Chemosphere**, Oxford, v. 83, n. 4, p. 599-604, 2011.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**.

2. ed. São Carlos: RiMa, 2008.



**ANEXO A - Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Itajubá para utilização de peixes neste projeto de pesquisa**

**14. TERMO DE RESPONSABILIDADE**

**(LEIA CUIDADOSAMENTE ANTES DE ASSINAR)**

Eu, Éryka Costa de Almeida (nome do responsável), certifico que:

- a) li o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;
- b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Assinatura:

*Éryka Costa de Almeida*

Data: 29 / 01 / 2015

Encaminhar em 2 vias.

A critério da CEUA, poderá ser solicitado o projeto, respeitando confidencialidade e conflito de interesses.

Quando cabível, anexar o termo de consentimento livre e esclarecido do proprietário ou responsável pelo animal.

**15. RESOLUÇÃO DA COMISSÃO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, na sua reunião de 30 / 03 / 15, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura:

*[Assinatura]*

Coordenador da Comissão