



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LAURA FERNANDA CONDOTA BORBA DE SOUZA

**EFEITOS DE FUNGICIDAS, ISOLADOS E EM MISTURA,  
PARA O TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus*:  
BIOMARCADORES GENOTÓXICOS, BIOQUÍMICOS E  
FISIOLÓGICOS**

---

Londrina  
2020

LAURA FERNANDA CONDOTA BORBA DE SOUZA

**EFEITOS DE FUNGICIDAS, ISOLADOS E EM MISTURA,  
PARA O TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus*:  
BIOMARCADORES GENOTÓXICOS, BIOQUÍMICOS E  
FISIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação em Habitats Fragmentados).

Orientadora:  
Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S729 SOUZA, LAURA.  
EFEITOS DE FUNGICIDAS, ISOLADOS E EM MISTURA, PARA O TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus*: : BIOMARCADORES GENOTÓXICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS / LAURA SOUZA. - Londrina, 2020.  
171 f. : il.

Orientador: CLAUDIA BUENO DOS REIS MARTINEZ.  
Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Ecotoxicologia - Tese. 2. Contaminantes emergentes - Tese. 3. Fungicidas - Tese. 4. Biomarcadores - Tese. I. BUENO DOS REIS MARTINEZ, CLAUDIA . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

LAURA FERNANDA CONDOTA BORBA DE SOUZA

**EFEITOS DE FUNGICIDAS, ISOLADOS E EM MISTURA,  
PARA O TELEÓSTEO *Prochilodus Lineatus*:  
BIOMARCADORES GENOTÓXICOS, BIOQUÍMICOS E  
FISIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mariana Machado Lauer  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Fernandes de Oliveira  
Instituto Federal do Paraná

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Thais Graciano dos Santos-Silva  
Colégio Estadual Profa. Roseli P. Roehrig

Londrina, 15 de maio de 2020.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente à minha orientadora, Profa. Cláudia, pela paciência, por ter me recebido em seu laboratório e pela contribuição para este trabalho. Sei que por muitos motivos eu não pude ser a orientada que ela esperava, mas a vida me direcionou para outros caminhos que não me permitiram me dedicar o quanto eu gostaria. Ao longo desses anos, vi muitos professores que não se interessavam mais em lutar pela ciência e você é uma luz no fim do túnel, um exemplo de professor dedicado e preocupado em ensinar. Levarei suas aulas nesse doutorado como um grande aprendizado, seus puxões de orelha e sua preocupação. Obrigada!

Agradeço a todos os professores que me ajudaram a estar aqui. Infelizmente, essa profissão tão bonita tem passado por tanta desvalorização e mesmo assim, seguem forte lutando pela Universidade. Agradeço em especial aos membros da banca, pela disponibilidade em ajudar a contribuir com este trabalho, prof. Dra. Juliana Delatim Simonato, prof. Dra Thaís Graciano, prof. Dra Mariana Machado Lauer e prof. Dra Luciana Fernandes de Oliveira.

Agradeço a minha família, que sentiu minha ausência nesses últimos anos, que não pude visita-los com a frequência que gostaria. À minha madrinha, guerreira, que também me apoiou de longe, mesmo com nossa perda.

Agradeço ao meu marido, que sofreu junto comigo, não me deixou desistir em todos os momentos que eu pensei em trancar esse curso, que deixou de aproveitar feriados, férias e recessos para estar me dando apoio em casa. Ele sabe que não sou das melhores em falar de meus sentimentos e o quanto foi difícil chegar até aqui. Meu amor por você é imenso, obrigada pela paciência e por dividir sua vida comigo!

Agradeço aos meus amigos, em especial, a Kássia, Fabiane, José Guilherme, Rafael, Carla, Gabriela, Natália, Higo e Karina, que aguentaram minhas crises de choro e cansaço, que venceram junto comigo as dificuldades dos últimos três anos. Agradeço em especial também a minha amiga Cris Abade, pelo carinho, apoio e parceria. À Mariana Bortholazzi, que agora é professora!! Sempre me ajudou, desde as aulas sobre cromatografia até virar minha amiga do coração!

À minha amiga Kathya, pelas risadas e companheirismo, sentirei sua falta! Sentirei falta dos nossos almoços gordos no shopping em meios à correria das análises a serem finalizadas. Obrigada pelas mensagens de incentivo e pelo seu alto astral.

Ao Wagner, que desde o primeiro dia sempre foi tão acolhedor e amigo! Obrigada pela força!

À prof. Dra. Juliana Simonato, pela ajuda quando as dúvidas e o desespero por não entender “coisas” de peixes apareceram, pelo carinho e pelo apoio. Além de exemplo como professora, você é um exemplo de pessoa, obrigada!

Gostaria de agradecer também à profa Dra. Cassiana Montagner, que me abriu caminhos no mestrado e me ajudou também nessa etapa!

Ainda, gostaria de agradecer aos meus pacientes. Desde a formatura, sempre tive dificuldades em escolher qual deveria ser a área que eu seguiria...e hoje, sei qual caminho realmente devo seguir. Cada rabinho balançando de alegria ao me receber e cada estrelinha que pude ajudar a ter uma vida melhor foram importantes. Aos animais que infelizmente foram envenenados e me deixaram com a vontade de entender como poderia trabalhar para salvar outras vidas e lutar pelos maus tratos e crimes de envenenamento, tão comuns na nossa rotina.

E como veterinária e “mãe de *pets*”, não poderia faltar o agradecimento aos meus cães, Lugano e Amarula e à mais nova integrante da família, nossa gata Maya. Com certeza, vocês são anjos que habitam nossa casa, trazem alegria em meio ao caos e que muitas vezes, ficam tanto tempo sozinhos, aguardando a minha chegada.

Por fim, gostaria de agradecer à Universidade Estadual de Londrina, pelos 14 anos de caminhada e à CAPES, pela oportunidade. Novamente, gostaria de agradecer à banca e à minha orientadora, por se disporem em enfrentar uma pandemia, em tempos turbulentos e incertos, para que eu pudesse finalizar esta etapa e seguir meu caminho.

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

*Ao meu padrinho José Luiz Condotta (in  
memorian), que me estimulou tanto a  
estudar e a não desistir desse doutorado,  
mas que não pode estar aqui para  
comemorar a sua finalização, mas que  
com certeza, de outro plano, se orgulha  
desta conquista.  
O senhor faz muita falta, tio!*

SOUZA, Laura Fernanda Condota Borba de. **Efeitos de fungicidas, isolados e em mistura, para o teleósteo *Prochilodus lineatus***: biomarcadores genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos. 2020. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

A presença de agrotóxicos no meio ambiente é alvo de diversos estudos ecotoxicológicos, principalmente relacionados aos efeitos promovidos pela presença de herbicidas e inseticidas em diferentes compartimentos ambientais. Os fungicidas são compostos amplamente utilizados para o controle de pragas no Brasil e no mundo, porém, os efeitos adversos que estes podem provocar no meio ambiente ainda são pouco esclarecidos. Os fungicidas azoxistrobina (AZX), carbendazim (CBZ) e tebuconazol (TBZ) têm se destacado como contaminantes comuns no ambiente aquático e são causadores de efeitos que podem interferir na qualidade de vida de diferentes organismos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição aguda a dois fungicidas isolados, o CBZ e TBZ e a mistura dos fungicidas CBZ, AZX e TBZ, para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, por meio de diferentes biomarcadores, em período de 24h de exposição. Desta forma, peixes juvenis foram colocados em aquários contendo água limpa (CTRL), concentrações de 5, 50 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , de cada fungicida isolado (CBZ5, CBZ50 e CBZ500 para o CBZ e TBZ5, TBZ50 e TBZ500 para o TBZ) e a uma mistura de fungicidas em concentrações intermediárias (100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , de CBZ, TBZ e AZX) e ao solvente metanol (solvente de TBZ e AZX). Peixes também foram expostos à água de manancial do Rio Tibagi, onde já havia sido detectada a presença destes fungicidas. Dos resultados obtidos, pode-se destacar que o CBZ promoveu a diminuição do hematócrito, aumento da glicemia e hipernatremia, aumento da defesa antioxidante com glutathiona (GSH) no fígado e também aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em cérebro. O TBZ foi responsável por desencadear aumento do hematócrito e no número de eritrócitos circulantes (RBC), hiperglicemia e aumento de íons plasmáticos, menor concentração de GSH hepática e aumento da atividade da glutathiona-S-transferase (GST) hepática. Ainda, promoveu peroxidação lipídica e aumento da atividade da anidrase carbônica branquial e de danos ao DNA em eritrócitos. A análise de contaminantes da água de manancial mostrou a presença de agrotóxicos como AZX, os herbicidas atrazina e diuron e o inseticida imidacloprid, que também promoveram efeitos adversos, como aumento de íons plasmáticos, menor concentração de GSH hepática e aumento da AChE cerebral e muscular. Já a mistura de fungicidas também se mostrou nociva para *P. lineatus*, uma vez que promoveu aumento de hematócrito e da glicemia, alterações em íons plasmáticos, diminuição da concentração de GSH hepática e aumento na atividade de AChE de cérebro e músculo, bem como induziu ao aumento de danos ao DNA de eritrócitos. Em conjunto, nossos resultados demonstram que os fungicidas isolados e em mistura são capazes de promover estresse oxidativo bem como desequilíbrio iônico e danos no DNA de *P. lineatus*. Deve-se ressaltar que estes fungicidas não estão presentes na legislação ambiental e que, devido às alterações significativas promovidas na espécie estudada após exposição aguda, reforçamos a sugestão de que estes sejam monitorados e estudados, para entendimento do seu comportamento no meio ambiente, principalmente em situações de exposições crônicas.

**Palavras-chave:** azoxistrobina; carbendazim; tebuconazol; AChE.

SOUZA, Laura Fernanda Condota Borba de. **The effects of fungicides, isolated and in mixture, for the teleost *Prochilodus lineatus***: genotoxic, biochemical and physiological biomarkers. 2020. 168 f. Thesis (PhD Thesis in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

The presence of pesticides in the environment is the target of several ecotoxicological studies, mainly related to the effects promoted by the presence of herbicides and insecticides in different environmental compartments. Fungicides are compounds widely used for pest control in Brazil and worldwide, however, the adverse effects they can cause on the environment are still poorly understood. The fungicides azoxystrobin (AZX), carbendazim (CBZ) and tebuconazole (TBZ) have stood out as common contaminants in the aquatic environment and cause effects that can interfere with the quality of life of different organisms. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of acute exposure to two isolated fungicides, CBZ and TBZ and the mixture of fungicides CBZ, AZX and TBZ, for the neotropical fish *Prochilodus lineatus*, through different biomarkers, in 24h exposure. Thus, juvenile fish *Prochilodus lineatus* were placed in aquariums containing clean water (CTRL), concentrations of 5, 50 and 500 µg L<sup>-1</sup>, of each fungicide isolated (CBZ5, CBZ50 and CBZ500 for CBZ and TBZ5, TBZ50 and TBZ500 for TBZ) and a mixture of fungicides in intermediate concentrations (100 µg L<sup>-1</sup>, from CBZ, TBZ and AZX) and to the methanol solvent (TBZ and AZX solvent). Fish were also exposed to spring water in the Tibagi River, where the presence of these fungicides had already been detected. From the results obtained, it can be highlighted that CBZ promoted a decrease in hematocrit, increased glycemia and hypernatremia, induced an increase in antioxidant defense glutathione (GSH) in the liver and also increased acetylcholinesterase (AChE) activity in the brain. TBZ was responsible for triggering an increase in hematocrit and in the number of circulating red blood cells (RBC), hyperglycemia and an increase in plasma ions, lower concentration of hepatic GSH and increased activity of hepatic glutathione-S-transferase (GST). Furthermore, it promoted lipid peroxidation and increased activity of branchial carbonic anhydrase and DNA damage in erythrocytes. The analysis of contaminants in spring water showed the presence of pesticides such as AZX, the herbicides atrazine and diuron and the insecticide imidacloprid, which also promoted adverse effects, such as increased plasma ions, lower concentration of hepatic GSH and increased cerebral and muscle AChE. The mixture of fungicides was also harmful to *P. lineatus*, since it promoted an increase in hematocrit and glycemia, changes in plasma ions, a decrease in hepatic GSH concentration and an increase in AChE activity in the brain and muscle, as well as induced increased damage to erythrocyte DNA. Together, our results demonstrate that fungicides alone and in mixture are capable of promoting oxidative stress, as well as imbalance ion regulation and DNA damage in *P. lineatus*. It should be noted that these fungicides are not present in the environmental legislation and that, due to the significant changes promoted in the studied species after acute exposure, we reinforce the suggestion that these be monitored and studied, in order to understand their behavior in the environment, especially in chronic exposure situations.

**Keywords:** azoxystrobin; carbendazim; tebuconazole; AChE.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Crescimento da utilização de agrotóxicos no Brasil (FAO, 2019)..... 23
- Figura 1.2** - Classe dos fungicidas Azoxistrobina, Carbendazim e Tebuconazol e suas respectivas estruturas químicas. CAS: número de referência de compostos e substâncias químicas adotados pelo Chemical Abstract Service..... 26
- Figura 1.3** - Fontes de contaminação ambiental por agrotóxicos (Veiga et al., 2006) ..... 27
- Figura 1.4** - Em situação de estresse, diversos efeitos fisiológicos são desencadeados, em respostas primárias, secundárias ou terciárias (Adaptado de Barton 2002)..... 33
- Figura 1.5** - Fluxo de íons nas células de cloreto das brânquias de teleósteos de água doce. Os círculos representam os sistemas de transporte. Setas laranja: difusão; ma: membrana apical; mb: membrana basolateral; ac: naidrase carbônica. Adaptado de Becker e Baldisserotto, 2014..... 35
- Figura 1.6** - Representação esquemática do mecanismo de ação da AChE e da hidrólise da ACh (Adaptado de Socratic.org) ..... 37
- Figura 1.7** - Xenobióticos tóxicos podem ser difundidos pela membrana plasmática e ao chegarem dentro da célula, são direcionados para a reação de fase 1, das quais as principais enzimas são pertencentes à família do citocromo P450. Ao entrar na reação de fase 2, as GST promovem a conjugação dos metabólitos da fase 1 com GSH endógeno e o conjugado será eliminado da célula por diferentes bombas de efluxo transmembrana. (Allocati et al., 2018) ..... 39
- Figura 1.8** - Peixe nativo dulcícola *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) (BIRINDELLI, MZ/UEL) ..... 41
- Figura 2.1** - Concentração de glicose em plasma de *P. lineatus*, mantidos em situação controle e expostos ao carbendazim a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500) µg L<sup>-1</sup>, durante 24 h. Os dados representam a média ± EP, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p<0,05)..... 75

- Figura 2.2** - Atividade da anidrase carbônica (AC) de *P. lineatus* em situação controle (CTRL) e expostos ao carbendazim nas concentrações de 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24h. Não houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p=0,97$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$  ..... 76
- Figura 2.3** - (A) Atividade da acetilcolinesterase em cérebro (A) e músculo (B) de *P. lineatus* sob condição controle (CTRL) ou expostos ao carbendazim, nas concentrações de 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos testados ( $p<0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$  ..... 76
- Figura 2.4** - Atividade da glutathione-S-transferase (GST) em fígado de *P. lineatus*, em exposição controle (CTRL) ou expostos ao carbendazim a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h de exposição. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ ..... 77
- Figura 2.5** - Concentração da glutathione (GSH) em fígado de *P. lineatus*, em exposição controle (CTRL) ou expostos ao carbendazim a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Houve diferença significativa entre os grupos, durante o período de exposição ( $p=0,001$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ ..... 77
- Figura 2.6** - Lipoperoxidação (LPO) em fígado de *P. lineatus*, em exposição controle (CTRL) ou expostos ao carbendazim a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Houve diferença significativa entre os grupos, durante o período de exposição ( $p=0,049$ ) Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$  ..... 78
- Figura 2.7** - Níveis de proteínas carboniladas (PCC), em fígado de *P. lineatus*, em exposição de 24 h ao carbendazim, a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24h. Não houve diferença significativa entre os grupos, durante o período de exposição ( $p=0,39$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ ..... 78
- Figura 2.8** - Escore de danos no DNA em hemácias de *P. lineatus* em situação controle (CTRL) e expostos ao carbendazim, nas concentrações de 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$

1, durante 24 h. Não houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p=0,96$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$  ..... 79

- Figura 3.1** - Resultados dos parâmetros hematológicos, (A) Porcentagem de hematócrito, (B) concentração de hemoglobina e (C) número de eritrócitos de *P. lineatus*, expostos durante 24 h apenas à água (CTRL), ao solvente metanol (MEOH) ou ao tebuconazol nas concentrações de  $5\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ5), de  $50\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ50), de  $500\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ500). Os dados representam a média,  $\pm$ EP,  $n=6$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ,  $p=0,243$  e  $p < 0,001$ , respectivamente ..... 110
- Figura 3.2** - Resultados dos parâmetros iônicos, (A) Concentração de  $\text{Na}^+$ , (B) Concentração de  $\text{K}^+$ , (C) Glicemia plasmática e (D) Concentração de  $\text{Cl}^-$  de *P. lineatus*, expostos durante 24 h apenas à água (CTRL), ao solvente metanol (MEOH) ou ao tebuconazol nas concentrações de  $5\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ5), de  $50\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ50), de  $500\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ500). Os dados representam a média,  $\pm$ EP,  $n=6$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ,  $p=0,243$  e  $p < 0,001$ , respectivamente ..... 111
- Figura 3.3** - Concentração da glutathiona (GSH) e glutathiona-S-transferase (GST) em fígado de *P. lineatus*, expostos durante 24 h apenas à água (CTRL), ao solvente metanol (MEOH) ou ao tebuconazol nas concentrações de  $5\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ5), de  $50\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ50), de  $500\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ500). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p=0,001$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$  ..... 112
- Figura 3.4** - Lipoperoxidação (LPO) em fígado de *P. lineatus*, expostos durante 24 h apenas à água (CTRL), ao solvente metanol (MEOH) ou ao tebuconazol nas concentrações de  $5\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ5), de  $50\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ50), de  $500\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ500). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p=0,001$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$  ..... 113
- Figura 3.5** - Atividade da acetilcolinesterase em cérebro (A) e músculo (B) de

- P. lineatus*, expostos durante 24 h apenas à água (CTRL), ao solvente metanol (MEOH) ou ao tebuconazol nas concentrações de 5 µg L<sup>-1</sup> (TBZ5), de 50 µg L<sup>-1</sup> (TBZ50) e 500 µg L<sup>-1</sup> (TBZ500). Os dados representam a média ± EP, n=6 ..... 115
- Figura 3.6** - Escore de danos ao DNA de eritrócitos de *P. lineatus*, em exposição controle (CTRL) ou expostos ao MEOH ou TBZ a 5 (TBZ5), 50 (TBZ50) e 500 (TBZ500) µg L<sup>-1</sup>, durante 24 h. Houve diferença significativa entre os grupos, durante o período de exposição (p p=0,001). Os dados representam a média ± EP, n=6 ..... 115
- Figura 4.1** - Atividade da glutiona-S-transferase (GST) em fígado de *P. lineatus* expostos durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (AGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Não foram detectadas diferenças significativas em entre os grupos testados (p=0,11). Os dados representam a média±EP, n=6..... 143
- Figura 4.2** - Concentração da glutiona (GSH) em fígado de *P. lineatus* expostos durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (AGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Houve diferença significativa entre os grupos testados (p=0, 02). Os dados representam a média±EP, n=6..... 143
- Figura 4.3** - Lipoperoxidação (LPO) em fígado de *P. lineatus* expostos durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (ÁGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos testados (p=0,67). Os dados representam a média ± EP, n=6 ..... 144
- Figura 4.4** - Atividade da acetilcolinesterase em cérebro (A) e musculo (B) de *P. lineatus* expostos durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (ÁGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos testados (p<0,001). Os dados representam a média ± EP, n=6..... 145
- Figura 4.5** - Escore de danos ao DNA de eritrócitos de *P. lineatus*, expostos

durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (ÁGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p < 0,001$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP, n=6 ..... 146

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1** - Concentração do fungicida CBZ, para os aquários controle (CTRL) e para as diferentes concentrações de CBZ (5, 50 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ )..... 74
- Tabela 2.2** - Parâmetros hematológicos de *P. lineatus*, sob condição controle (CTRL) ou expostos ao CBZ 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24h ..... 75
- Tabela 2.3** - Parâmetros fisiológicos de *P. lineatus*, sob condição controle (CTRL) ou expostos ao CBZ a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24h ..... 76
- Tabela 2.4** - Frequência de MN e AENs em hemácias de *P. lineatus* em situação controle (CTRL) e expostos ao carbendazim nas concentrações de 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Não houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p=0,14$ ) ..... 80
- Tabela 3.1** Frequência de AENs de eritrócitos de *P. lineatus*, em exposição controle (CTRL) ou expostos ao MEOH ou TBZ a 5 (TBZ5), 50 (TBZ50) e 500 (TBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Não houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p=0,18$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$  ..... 115
- Tabela 4.1** Concentração de fungicidas para condição controle (CTRL), metanol (MEOH), água do Rio Tibagi (AGUA) e para a mistura dos fungicidas AZX, CBZ e TBZ..... 141
- Tabela 4.2** Parâmetros hematológicos e iônicos em *P. lineatus* expostos, durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), à água de manancial (AGUA) e à mistura de fungicidas (MIS) ..... 142
- Tabela 4.3** Frequência de micronúcleo (MN) e outras AENs (núcleo segmentado, em forma de rim, lobulado e células binucleatas) em eritrócitos de *P. lineatus* expostos durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (ÁGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Não houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p=0,99$ ). Os

dados representam a média  $\pm$  EP, n=6 ..... 146

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC	Anidrase carbônica
AChE	Acetilcolinesterase
AZX	Azoxistrobina
CBZ	Carbendazim
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
GSH	Glutathiona Reduzida
GST	Glutathiona-S-transferase
H <sup>+</sup>	Próton
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
Hct	Hematócrito
Hb	Hemoglobina
HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
NaCl	Cloreto de Sódio
OH	Radical hidroxil
PCO	Proteínas Carboniladas
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBZ	Tebuconazol
TRC	Taxa de reação Catalisada
TRNC	Taxa de reação não catalisada
UEL	Universidade Estadual de Londrina

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	20	
<b>CAPÍTULO 1</b>		
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	21	
1.1. CRESCIMENTO POPULACIONAL E DA AGRICULTURA.....	21	
1.2. UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL E NO MUNDO.....	22	
1.2.1. Utilização de Fungicidas .....	24	
1.2.2. Contaminação Aquática por Fungicidas.....	26	
1.3. ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA .....	30	
1.4. BIOMARCADORES.....	31	
1.4.1. Biomarcadores Fisiológicos.....	32	
1.4.2. Biomarcadores de Neurotoxicidade .....	36	
1.4.3. Biomarcadores Bioquímicos.....	37	
1.4.4. Biomarcadores Genotóxicos .....	39	
1.5. <i>Prochilodus lineatus</i> COMO MODELO BIOLÓGICO.....	40	
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	42	
<b>3. HIPOTESES</b> .....	43	
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	44	
4.1. OBJETIVO GERAL.....	44	
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44	
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45	
<b>CAPÍTULO 2</b>		
<b>ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS NO TELEÓSTEO <i>Prochilodus lineatus</i> APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA AO FUNGICIDA CARBENDAZIM</b> .....		63
<b>RESUMO</b> .....		63
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	64	
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	67	
2.1. DESENHO EXPERIMENTAL.....	67	
2.2. BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS.....	69	
2.3. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	71	

2.4.	BIOMARCADORES GENOTÓXICOS – TESTE DO COMETA.....	73
2.5.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	74
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>74</b>
3.1.	DETERMINAÇÃO DE CBZ NA ÁGUA .....	74
3.2.	BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS.....	74
3.3.	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	77
3.4.	BIOMARCADORES GENOTÓXICOS .....	79
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>88</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

### **CAPÍTULO 3**

#### **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA DO TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus* AO FUNGICIDA**

	<b>TEBUCONAZOL.....</b>	<b>101</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>101</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>102</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>104</b>
2.1.	DESENHO EXPERIMENTAL.....	104
2.2.	ANÁLISE DE BIOMARCADORES.....	106
2.3.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	109
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>109</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>115</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>121</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>122</b>

### **CAPÍTULO 4**

#### **EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA A MISTURA DE AGROTÓXICOS PARA O PEIXE TELEÓSTEO *Prochilodus***

	<b><i>lineatus</i>.....</b>	<b>130</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>131</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>132</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>135</b>

2.1.	ACLIMATAÇÃO .....	135
2.2.	COLETA DE ÁGUA .....	136
2.3.	DESENHO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM .....	136
2.4.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS FUNGICIDAS NA ÁGUA .....	137
2.5.	BIOMARCADORES.....	138
2.5.1.	Fisiológicos.....	138
2.5.2.	Bioquímicos.....	138
2.5.3.	Genotóxicos .....	140
2.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	140
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>141</b>
3.1.	DETERMINAÇÃO DE FUNGICIDAS NA ÁGUA .....	141
3.2.	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS .....	141
3.3.	DANOS OXIDATIVOS E DEFESA ANTIOXIDANTE .....	142
3.4.	ATIVIDADE DA ACHE .....	144
3.5.	DANOS GENOTÓXICOS .....	145
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>146</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>153</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>154</b>

## **CAPÍTULO 5**

	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>164</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>167</b>
	ANEXO A Aprovação dos procedimentos com animais pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina .....	168

## APRESENTAÇÃO

Esta tese foi organizada de maneira a atender as exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina. Inicialmente, no Capítulo 1, é apresentada uma Introdução Geral, que contextualiza o cenário de contaminação ambiental por fungicidas estudados neste trabalho, com justificativa e objetivo. Posteriormente, são apresentados três capítulos que representam cada manuscrito produzido para esta tese.

O Capítulo 2, intitulado “Alterações hematológicas e bioquímicas no teleósteo *Prochilodus lineatus* após exposição aguda ao fungicida carbendazim se refere ao ensaio ecotoxicológico referente à exposição aguda (24H) do peixe *Prochilodus lineatus* ao fungicida Carbendazim, com apresentação dos resultados de biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e genotóxicos.

O Capítulo 3, refere-se ao manuscrito “Avaliação dos efeitos da exposição aguda do peixe teleósteo *Prochilodus lineatus* ao Tebuconazol” e aborda a exposição do peixe *P. lineatus* ao fungicida Tebuconazol, durante 24 horas. Este trabalho aborda os resultados obtidos com a avaliação de biomarcadores genotóxicos, fisiológicos e bioquímicos.

E finalmente, o Capítulo 4, intitulado “Efeitos da exposição aguda à mistura de agrotóxicos para o peixe teleósteo *Prochilodus lineatus*” refere-se ao ensaio de exposição aguda à uma mistura de fungicidas frequentemente detectados em águas superficiais, sendo eles o Carbendazim, o Tebuconazol e o Azoxistrobina, fungicida recém lançado no mercado, bem como foram avaliados efeitos da água de manancial, para o peixe *P. lineatus*, para a avaliação dos mesmos biomarcadores mensurados nos demais capítulos.

Por fim, a tese é finalizada com as considerações finais (Capítulo 5), em que há a apresentação das conclusões referentes aos resultados do trabalho.

## CAPÍTULO 1

---

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

#### 1.1. CRESCIMENTO POPULACIONAL E DA AGRICULTURA

A população mundial tem crescido de forma exponencial, de maneira que este fato resulta em maior necessidade de produção alimentar, para garantir a vida desse volume de pessoas. Atualmente, a estimativa da população mundial é de 7,75 bilhões de pessoas (WORLDMETERS, 2020). De acordo com dados da ONU (2017), a previsão é de que a população tem aumentado na média de 83 milhões de pessoas por ano e deve chegar a 8,6 bilhões de pessoas em 2030 e de 11,2 bilhões em 2100.

O aumento demográfico resulta em maior necessidade de produção de alimentos e a manutenção da agricultura, da forma como é realizada atualmente, resulta em maior consumo hídrico, com grande parte de áreas agricultáveis sendo geralmente localizadas próximas a corpos d'água (STEFFEN *et al.*, 2011). Juntamente a isso, o crescimento das cidades e o aumento do consumo *per capita* mostram que o modelo atual de produção precisa ser revisto, para atender as necessidades por alimentos (SAATH E FACHINELLO, 2018; CARRIQUIBORDE *et al.*, 2014).

Alertas da *Food and Agriculture Organization* (FAO) mostram a necessidade da ampliação da produção e do desenvolvimento agrícola sustentável para a produção de alimentos, uma vez que, se o ritmo do consumo alimentar continuar da forma como é realizado atualmente, em 2050 serão necessários 60% a mais de alimentos, 50% mais energia e 40% mais água disponível para a população, o que demonstra o mau uso dos recursos naturais e o desperdício de alimentos ao redor do mundo (ONU, 2015).

Ao longo da história humana, a agricultura exerceu um papel extremamente importante para o desenvolvimento das civilizações e para o crescimento demográfico, pois foi a partir dela que surgiram culturas mais poderosas e inclusive aquelas que sofreram e se tornaram vulneráveis devido à fome e escassez de alimentos (LIMA, 2017). No entanto, o uso inadequado das terras agrícolas é extenso, e em 2017 cerca de 25% de todas as terras agrícolas já apresentavam características de serem altamente degradadas e cerca de 44% apresentam degradação moderada

ou leve (DE CLERCQ *et al.*, 2018). Juntamente com a degradação de solos, existe a preocupação com os recursos hídricos, que também sofrem impacto com a ampliação da agricultura, e devido a diversos outros fatores, como as mudanças climáticas e contaminação antrópica (ALISSON, 2013).

O modelo atual de agricultura despertou preocupação mundial devido ao seu impacto ambiental, principalmente no que se refere à contaminação dos recursos hídricos por diversos compostos, como nutrientes, agrotóxicos, dentre outros (RIBEIRO E DORES, 2013). A modernização da agricultura é uma necessidade real, pois há uma quantidade limitada de terras adequadas à produção e o uso de habitats naturais para a agricultura não deve mais ser uma opção (CARRIQUIBORDE *et al.*, 2014).

## 1.2. UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL E NO MUNDO

O crescimento populacional e a maior demanda por alimentos culminaram no aumento da necessidade de novas técnicas que promovessem o aumento da produtividade, como o uso de agrotóxicos (STEFFEN *et al.*, 2011). De acordo com Fan (2017), em 2015 a China liderou a produção de agrotóxicos, com média de 3,75 milhões de toneladas e a comercialização destes, com 1,7 milhões de toneladas, o que estimulou a fundação do Escritório de Gerenciamento de Pesticidas, neste país, para regularização da produção, venda e utilização destes produtos.

Os agrotóxicos são produtos químicos utilizados em diversos setores de produção, armazenamento ou beneficiamento de produtos agrícolas, de pastagens, para ambientes urbanos ou rurais, com o intuito de proteção contra a ação danosa de diversos tipos de organismos indesejáveis, entretanto seu uso, pode ter efeitos adversos em organismos não alvos (BRASIL, 1989; MONTAGNER *et al.*, 2014; CHOULDHARY *et al.*, 2018;). A grande variedade de pragas existentes pode afetar a produção, com estimativa que ao redor do mundo chega em torno de 9000 espécies de insetos e ácaros, 50000 espécies de patógenos vegetais e 8000 mil plantas daninhas, fato que estimula a utilização de produtos para o controle destes (ZHANG *et al.*, 2011; ZHANG, 2018).

A utilização de agrotóxicos no mundo pode ser dividida em três fases ou etapas. Na primeira fase (período anterior a 1870), eram utilizados basicamente

pesticidas naturais, como o enxofre, que foi muito utilizado na Grécia Antiga; na segunda fase (período entre 1870 e 1945), os sintéticos inorgânicos foram amplamente utilizados, bem como substâncias naturais e inorgânicas. Já na terceira fase (a partir de 1945), destacaram-se os agrotóxicos sintéticos, como DDT, 2,4-D e desde então, a maior parte dos agrotóxicos é sintética, o que levou ao termo “pesticidas químicos” (ZHANG *et al.*, 2001; ZHANG, 2018); O uso destes compostos pelo mundo é amplo, de forma que nos EUA 80% das culturas de frutas e legumes utilizam fungicidas e estima-se que sem o uso de agrotóxicos, a produção e exportação de trigo, soja e algodão diminuiriam em torno de 27% (ZHANG *et al.*, 2011; ZHANG, 2018).

A partir da Revolução Verde, iniciada na década de 1950 no Brasil, houve a implementação de novas tecnologias, como aumento de insumos químicos e mecanização e resultou no aumento do uso de agrotóxicos (Brasil, 2015). O comércio brasileiro destas substâncias tem aumentado com o passar dos anos, com crescimento de 190% no país até 2015, quando comparado ao restante do mundo, que cresceu 93% (ANVISA, 2012; BORSOI *et al.*, 2014; SINPAF, 2015). Dados da FAO (2019) também destacam o crescimento da utilização de agrotóxicos, principalmente a partir de 2006, com maior pico de uso ocorrido no ano de 2015, e com uso de 5,95 kg/ha em 2017, conforme demonstrado na Figura 1.1.

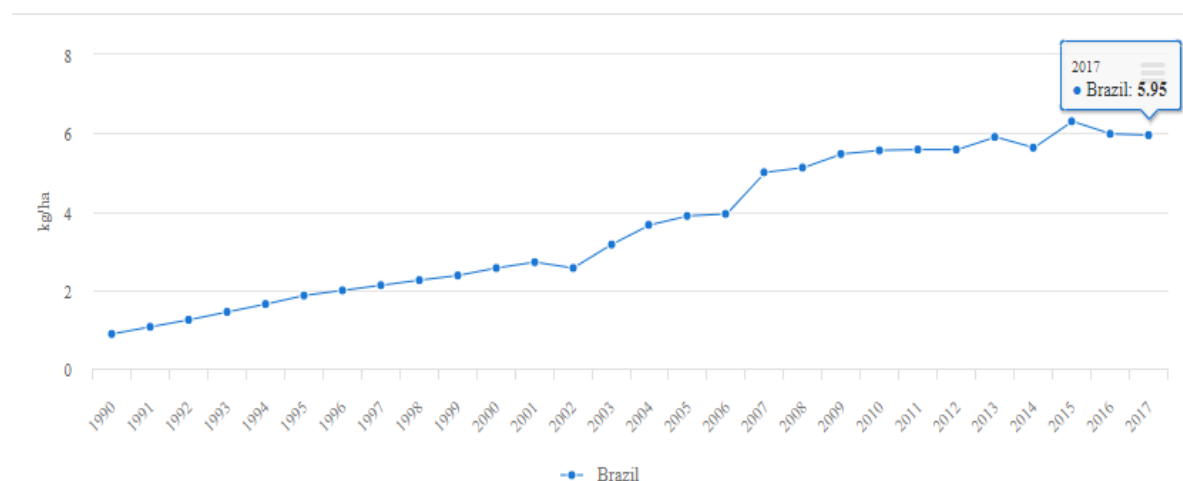


Figura 1.1. Crescimento da utilização de agrotóxicos no Brasil (FAO, 2019).

Sabe-se que o consumo de agrotóxicos no mundo já chegou em torno de 2

milhões de toneladas, sendo a Europa responsável por cerca de 45% deste total, os EUA cerca de 24% e o restante distribuído entre os demais países do mundo (ABHILASH E SINGH, 2009; UQAB *et al.*, 2016).

Atualmente, utilizando dados do comércio de agrotóxicos comparados à área utilizada, o Brasil lidera como maior consumidor mundial de agrotóxicos, o que chama a atenção para a presença destes como um dos principais contaminantes encontrados em corpos d'águas e conseqüentemente, sua relação com a toxicidade e efeitos adversos a organismos não alvos (MONTAGNER *et al.*, 2014). Sabe-se que o consumo global de agrotóxicos aumentou muito nos últimos anos, de forma a atingir o mercado atual de \$45 bilhões (CHLOUDHARY *et al.*, 2018). Em 2016, estimou-se que os agricultores chineses utilizaram três vezes a média global de agrotóxicos (ZHANG, 2018). O mercado mundial de agrotóxicos se concentra em 42% de inseticidas, 27% de herbicidas, 22% para fungicidas e o restante, para as demais categorias de compostos (CHLOUDHARY *et al.*, 2018). A ampla utilização de agrotóxicos pode prejudicar o meio ambiente e principalmente, o ambiente aquático, ao atingir rios, lagos e até mesmo os lençóis freáticos, o que tem diminuído a quantidade de água doce limpa disponível no planeta (CALDAS *et al.*, 2011; UQAB *et al.*, 2016).

#### 1.2.1. Utilização de fungicidas

Dentre os agrotóxicos amplamente utilizados no Brasil, destacam-se os fungicidas, que são compostos destinados a atingir um grupo específico ou uma variedade de fungos patogênicos (KARLSSON *et al.*, 2014; CHOUDHURY, 2018). Atualmente, apenas na União Européia, o comércio de fungicidas representa cerca de 40% da venda total de agrotóxicos, sendo que a venda dos fungicidas orgânicos representa quase 60% de todos os fungicidas comercializados (ZUBROD *et al.*, 2019).

A utilização dos fungicidas geralmente é realizada com aplicação em sementes ou uso direto nas diversas culturas e muitos deles apresentam efeitos sistêmicos, com absorção pela planta ao qual foi aplicado (ZUBROD *et al.*, 2019). Assim como os demais agrotóxicos, os fungicidas podem ser nocivos para os organismos não alvos, de forma a influenciar o metabolismo, mesmo quando presentes em concentrações muito baixas, alterando as atividades enzimáticas e

interferindo no equilíbrio fisiológico destes organismos (EKINCI E SENTURK, 2010).

Dentre uma grande variedade de fungicidas utilizados no Brasil e no mundo e que tem sido frequentemente detectados em corpos d'água, destaca-se o azoxistrobina (AZX), o carbendazim (CBZ) e o tebuconazol (TBZ) como importantes contaminantes (MONTAGNER *et al.*, 2014), os quais já foram relacionados a efeitos nocivos em diferentes organismos (EPA, 2014), como em peixes (CHOUDHURY *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2015; RAMA *et al.*, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2010; PAN, 2006) e até na espécie humana (MERCADANTE *et al.*, 2014).

O fungicida AZX, pertencente ao grupo químico das estrobilurinas, tem ampla utilização em diversas culturas de frutas e grãos (ANVISA, 2014). Com ação sistêmica, o AZX rapidamente se tornou um dos fungicidas mais utilizados no mundo (RODRIGUES *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016), com vendas mundiais em torno de 1,16 bilhões apenas no ano de 2016 (LU *et al.*, 2019) e tem se destacado como contaminante de águas (WU E TIEDEMAN, 2001; ANDRADE, 2011; SOUZA *et al.*, 2019). O AZX é classificado como muito tóxico para organismos aquáticos, além de possuir persistência de moderada a alta no meio ambiente (LU *et al.*, 2019). Seu mecanismo de ação envolve a atuação no complexo respiratório mitocondrial III, o que interfere na transferência de elétrons e resulta na morte dos fungos devido ao estresse oxidativo (RODRIGUES *et al.*, 2015).

O fungicida CBZ, da classe dos benzimidazóis, apresenta seu mecanismo pela ação em microtúbulos, dada sua afinidade à tubulina  $\beta$ , o que já é relacionado com alterações no desenvolvimento e morte celular (NWANI *et al.*, 2015). Este fungicida é utilizado no Brasil para diferentes culturas, como grãos e frutas. O CBZ é altamente persistente no meio ambiente, muito tóxico para organismos aquáticos e tóxico para outras espécies, como abelhas e aves (IBAMA, 2010). Diversos trabalhos apontam a toxicidade do CBZ para espécies de peixes, como zebrafish (JIANG *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2014), bagres africanos (NWANI *et al.*, 2015) e em mamíferos, como ratos (MIN E KANG, 2008).

O TBZ é um fungicida amplamente utilizado para diversas culturas, com ação na síntese do ergosterol, componente estrutural da membrana de fungos, que resulta na morte dos fungos (ALTHENHOFEN *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2019). Alguns trabalhos já demonstram que o TBZ é um composto tóxico para organismos aquáticos, sendo que a preocupação aumenta em vista de ser facilmente carregado por chuvas

para os compartimentos aquáticos, bem como pela sua facilidade de adsorção nestes ambientes (ESPENSHADE E HUGHES, 2007; SKOLLNESS *et al.*, 2013; CUI *et al.*, 2018). No Brasil, a concentração máxima de TBZ permitida na água para consumo humano é de  $180 \mu\text{g L}^{-1}$  (Portaria da Consolidação nº5/2017; Portaria MS 2914, 2011), entretanto, este fungicida também não está incluído na Resolução CONAMA 357 (2005). Os grupos químicos dos fungicidas estão descritos na Figura 1.2.

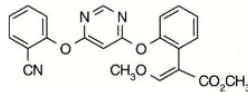
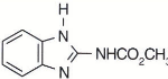
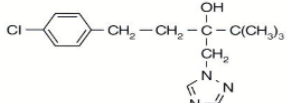
Fungicidas	Grupo químico	Fórmula molecular	Estrutura química	Nº CAS*
Azoxistrobina	Estrobilurina	$\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$		131860-33-8
Carbendazim	Benzimidazol	$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$		10605-21-7
Tebuconazol	Triazol	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$		107534-96-3

Figura 1.2. Classe dos fungicidas Azoxistrobina, Carbendazim e Tebuconazol e suas respectivas estruturas químicas e número CAS (número de referência de compostos e substâncias químicas adotados pelo Chemical Abstract Service).

### 1.2.2. Contaminação aquática por fungicidas

Atualmente, os recursos hídricos têm sido alvo de estudos e preocupação com relação à contaminação por agrotóxicos, devido à qualidade da água distribuída para a população e para uso por animais e ainda, para preservação de organismos aquáticos, uma vez que diversos trabalhos já demonstram riscos relacionados à exposição a estes compostos (SILVA, 2013; CLIMENT *et al.*, 2018). A contaminação dos ecossistemas aquáticos pode ocorrer de diversas maneiras, sendo a lixiviação e o escoamento superficial (ou deflúvio superficial) as vias mais importantes, as quais permitem o carreamento de substâncias acompanhando o fluxo das águas resultando na chegada desses compostos nas águas superficiais e até mesmo profundas (Figura 1.3). Neste contexto, é importante ressaltar que trabalhos sugerem cerca de 55% do agrotóxico utilizado contamina o ambiente, sem sequer atingir os organismos alvos

(GRAVILESCU, 2005; MARTINI, 2012). No entanto, de acordo Zhang et al (2011) a estimativa de contaminação pode ser ainda maior. Estes autores sugerem que 99% dos agrotóxicos aplicados são liberados em solos, corpos d'água e atmosfera, com absorção por quase todos os organismos expostos.

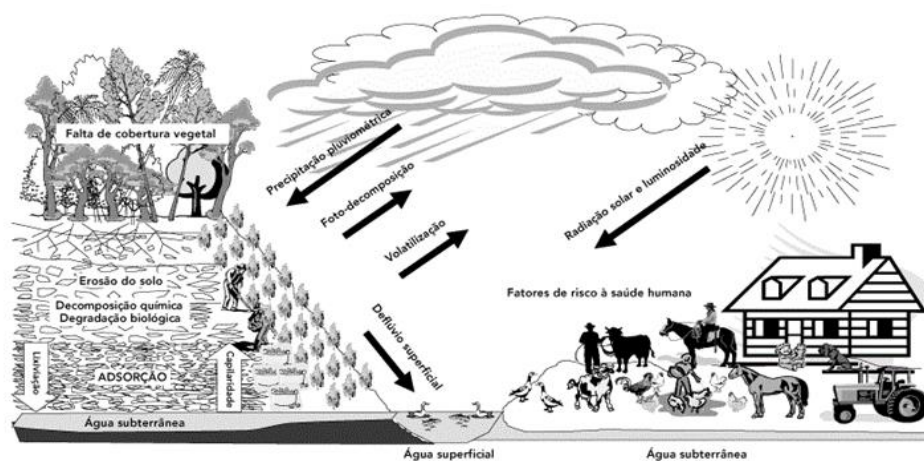


Figura 1.3. Fontes de contaminação ambiental por agrotóxicos (Veiga et al., 2006).

Também é importante ressaltar que a escassa assistência técnica recebida por produtores rurais é um fator que contribui para a contaminação aquática, devido à destinação incorreta de agrotóxicos utilizados durante a limpeza de equipamentos e instrumentos (FELSOT; *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2019;). A presença de agrotóxicos em compartimentos aquáticos tem chamado a atenção, devido à ampla quantidade de compostos detectados, muitas vezes em concentrações maiores do que as estabelecidas pelas legislações (CHOULDHARY *et al.*, 2018).

Cabe ressaltar que na maior parte das vezes a detecção não é de apenas um contaminante, mas de vários que chegam ao ambiente, dos quais pouquíssimos são legislados e monitorados, ou seja, os efeitos que a mistura de compostos provoca em organismos aquáticos ainda são pouco conhecidos (SOUZA *et al.*, 2019; ALMEIDA *et al.*, 2019) e a portaria COMAMA 357/2005 que regulamenta os corpos hídricos no Brasil não contempla boa parte dos contaminantes que vem sendo detectados na água (BRASIL, 2005)

Ao contaminar um corpo de água, os agrotóxicos podem sofrer volatilização, serem degradados de maneira total ou parcial, se manterem inalterados ou serem sedimentados, o que pode promover a sua acumulação em organismos aquáticos

(CLIMENT *et al.*, 2018). O monitoramento da utilização de fungicidas ao redor do mundo é importante, uma vez que o aumento do seu uso pode resultar em aumento nas concentrações traços destes compostos no meio ambiente (BATTAGLIN *et al.*, 2010). Diversos fungicidas têm sido detectados em corpos de água ao redor do mundo, como na Espanha (HERRERO-HERNANDEZ *et al.*, 2012; HERRERO-HERNANDEZ *et al.*, 2013; MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2013;), Alemanha (BEREZEN *et al.*, 2005), Suíça (KAHLE *et al.*, 2008), Portugal (GONÇALVES *et al.*, 2007), Estados Unidos (BATTAGLIN *et al.*, 2011; REILLY *et al.*, 2012; BOESTEN *et al.*, 2017;), Costa Rica (ECHEVERRÍA-SÁENZ *et al.*, 2012) e Austrália (WIGHTWICK *et al.*, 2012), o que reforça a importância do monitoramento dos efeitos adversos destes compostos.

Apesar de ser amplamente utilizado, ainda são poucos os estudos que abordam a presença e os efeitos do fungicida AZX em corpos de água e seus efeitos em organismos aquáticos (CHOUDHURY *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2019;), bem como de seus metabólitos, os quais são considerados menos perigosos que o AZX (EFSA, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2013). A presença de AZX em compartimentos aquáticos chama a atenção em diversos países, como na Alemanha, onde a concentração de 29,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  já foi detectada (BEREZEN *et al.*, 2005) e nos Estados Unidos, onde a AZX foi o fungicida mais detectado em amostras de águas de riachos (BATTAGLIN *et al.*, 2011). No Brasil, alguns trabalhos também já mostram a presença de AZX em corpos de água em diferentes cidades. Em Londrina (PR), a presença de AZX foi detectada em 95% das amostras de água do Rio Tibagi e de abastecimento público, com concentrações máximas de 0,0491  $\mu\text{g L}^{-1}$  (SOUZA *et al.*, 2019). Em amostras de água e de esgoto do estado de São Paulo a AZX foi abundantemente encontrada, com concentração máxima de 0,0 431  $\mu\text{g L}^{-1}$  (MONTAGNER *et al.*, 2019).

A presença de CBZ também tem se mostrado comum em corpos de água em diferentes regiões do mundo. Em dezembro de 2019, a ANVISA publicou um edital de chamamento público, que visa a reavaliação dos agrotóxicos à base de CBZ (ANVISA, 2019). No Brasil, a concentração máxima de CBZ permitida na água para consumo humano é de 120  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Portaria da Consolidação nº 5/2017; Portaria MS 2914/2011), entretanto, o CBZ não está incluído na Resolução que estabelece limites individuais para diferentes substâncias para diferentes classes de corpos de água (Resolução CONAMA 357/2005). Em um estudo realizado na bacia do Rio Traiguen, localizada

na região Sul do Chile, o CBZ já foi detectado em concentrações de até 1200 ng L<sup>-1</sup> (PALMA *et al.*, 2004). Em estudo realizado na bacia do Rio Guadalquivir, na Espanha, o CBZ também foi detectado em 17% das amostras e em diferentes concentrações (MASIÁ *et al.*, 2013). Em Portugal, o CBZ foi o fungicida mais detectado em amostras de águas superficiais e subterrâneas (DUJAKOVIC *et al.*, 2010). A utilização urbana do CBZ tem se mostrado como potencial contaminante de águas, uma vez que foi detectada a presença do CBZ em concentrações maiores do que as permitidas pela legislação suíça para a potabilidade da água (BURKHARDT, 2007). No Brasil, o CBZ também já foi detectado em diferentes corpos de água, em diferentes pontos de amostragem no Estado de São Paulo, onde este foi o fungicida mais frequente e com as maiores concentrações detectadas, com variação de 0,8 a 4520 ng L<sup>-1</sup> (MONTAGNER *et al.*, 2019). Na região de nascente do Rio São Lourenço, estado do Mato Grosso, o CBZ já foi detectado em amostras de águas superficiais, com concentrações variando entre 4 a 28 µg L<sup>-1</sup> (RIBEIRO *et al.*, 2013). No município de Londrina (PR), o CBZ foi detectado em 83% das amostras de águas coletadas no Rio Tibagi e em 8% das amostras de água para abastecimento público, com concentração máxima de 86,50 ng L<sup>-1</sup>, a partir de coletas realizadas com amostras antes e após o tratamento, por LC-MS/MS (SOUZA *et al.*, 2019). Como foi analisado

Em estudos de avaliação da contaminação de águas superficiais argentinas, o TBZ foi detectado em concentrações médias de 0,035 µg L<sup>-1</sup> (GERONIMO *et al.*, 2014). Amostras de águas superficiais e subterrâneas avaliadas na região de área vinícola, em La Rioja (Espanha), mostraram o TBZ como um dos contaminantes mais presentes na água, durante o período estudado (HERRERO-HERNANDEZ *et al.*, 2016). Na região de lagos suíços, o TBZ foi detectado em amostras de águas residuais tratadas e não tratadas, de forma que os autores sugerem que este composto não é afetado pelos tratamentos realizados nas estações de tratamento (KAHLE *et al.*, 2008). O TBZ também foi detectado em 33% das amostras de águas do Rio Tibagi e para abastecimento público, na região de Londrina (PR), em concentrações abaixo do limite de quantificação (SOUZA *et al.*, 2019). Em diferentes regiões do Estado de São Paulo, o TBZ foi detectado em 31% das amostras, com concentração média de 39 ng L<sup>-1</sup>, porém, houve detecção de concentração de até 1071 ng L<sup>-1</sup> (MONTAGNER *et al.*, 2019).

A presença simultânea de AZX e TBZ também já foi detectada. Amostras de

água coletadas em 29 córregos, de 13 estados americanos entre 2005 e 2006 mostraram que o AZX foi o fungicida mais frequentemente detectado (45% das amostras, concentração máxima de  $1,13 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e que o TBZ também é contaminante comum das águas (6% das amostras, com máxima concentração de  $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (BATTAGLIN *et al.*, 2011). Estes autores sugerem que a presença comum de AZX em amostras de água podem estar relacionadas à sua alta solubilidade e sua ampla utilização nos EUA. No Brasil, em pesquisa de resíduos de agrotóxicos, o TBZ e AZX juntos foram detectados em amostras de águas do rio Camanducaia, região de fronteira entre o Estado de Minas Gerais e São Paulo, sendo o TBZ detectado em concentrações de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  e AZX em concentração de  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$  (BARIZON *et al.*, 2019).

### 1.3. ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

No contexto da ecotoxicologia, os efeitos adversos promovidos pelos fungicidas receberam muito menos atenção, quando comparados aos inseticidas e herbicidas, com cerca de apenas 13% dos estudos realizados entre 1991 a 2013 (KOHLENER *et al.*, 2013; ZUBROD *et al.*, 2019). Os estudos da ecotoxicologia são ferramentas importantes para a avaliação de efeitos adversos promovidos nos ecossistemas, principalmente o aquático, que sofre com a descarga de grandes volumes de contaminantes oriundos da agricultura (DEPLEDGE, 2009; SALAMAT E ZARIE, 2012).

Ao longo dos últimos anos, a toxicologia aquática mudou a forma de investigar os efeitos adversos promovidos por contaminantes aos diferentes organismos, com menos estudos utilizando concentrações muito elevadas, incompatíveis com a vida e mais pesquisas para avaliar os efeitos ocasionados por concentrações baixas, que não necessariamente levam à morte em menores períodos de exposição mas que fazem com que os indivíduos expostos apresentem alterações biológicas (HOGARH *et al.*, 2008; LAM, 2009; SALAMAT E ZARIE., 2012).

A utilização de organismos aquáticos, como os peixes, é fundamental para o monitoramento de efeitos induzidos por contaminantes (OOST *et al.*, 2003; KAPTANER *et al.*, 2014). A exposição aos diferentes tipos de xenobióticos pode ocasionar diversos danos à saúde de peixes, como alterações estruturais, que podem

---

afetar toda uma população exposta, em graus variáveis de toxicidade ou ainda, promover efeitos adicionais, através de interações aditivas, antagonistas ou até mesmo sinérgicas, em situação de exposição a mais de um composto (LAM, 2009).

#### 1.4. BIOMARCADORES

O uso de biomarcadores tem sido fundamental para o entendimento dos efeitos provocados pelos poluentes em ecossistemas aquáticos, uma vez que permite a identificação de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, o que favorece o entendimento e mensuração da avaliação dos riscos pela presença dos xenobióticos no meio ambiente (JANZ *et al.*, 2013). Os biomarcadores apresentam como função principal mostrar sinais de alertas precoces, antes que sejam desenvolvidos efeitos biológicos mais significativos ou irreversíveis, sendo considerados ferramentas sensíveis e rápidas para demonstrar efeitos adversos ou letais em organismos de diferentes ecossistemas (LAM, 2009; COLIN *et al.*, 2016).

O conceito de biomarcador consiste em variação bioquímica, celular, fisiológica, genotóxica, histológica ou até comportamental, que pode ser mensurada em tecidos ou fluidos e demonstrar um ou mais efeitos frente à exposição a contaminantes, que atuam de forma complementar a análises químicas ou outras (DEPLEDGE, 1993; FORBES *et al.*, 2006; Lam, 2009; LIEBEL; TOMOTAKE E RIBEIRO, 2013; VIEIRA *et al.*, 2014). A utilização conjunta de diversos biomarcadores é extremamente benéfica, uma vez que o uso único pode não demonstrar ou refletir o grau de comprometimento da saúde de um organismo, ou a maneira como este pode se adaptar em um ambiente contaminado (ZORITA *et al.*, 2008; LUNARDELLI *et al.*, 2018).

Inicialmente, os efeitos ocorrem em nível molecular, seguidos de respostas bioquímicas, teciduais, em órgãos e finalmente, acometem todo o organismo animal, sendo que as respostas encontradas nos níveis moleculares e bioquímicos, apesar de serem individuais de cada organismo, podem ajudar na percepção de uma interferência mais relevantes aquele ecossistema e serem incorporados em programas de biomonitoramento (FORBES E FORBES, 1994; CHAFFAI, 2014).

Diversas agências ambientais mundiais têm utilizado os biomarcadores como ferramenta para a avaliação de contaminação ambiental, principalmente pela

possibilidade de detecção de danos de maneira precoce. No entanto, deve-se levar em consideração que existem componentes bióticos e abióticos que podem interferir nas respostas (CHAFFAI, 2014).

#### 1.4.1. Biomarcadores fisiológicos

A resposta de estresse é considerada uma adaptação induzida no organismo em situações adversas ou alteradas, que desencadeiam uma série de reações que preparam o animal para situações de alerta, de forma a garantir que este tenha capacidade energética, perceptiva e emocional para a sobrevivência naquele ambiente (VOLPATO, 2014). No entanto, se houver uma intensa resposta ao estressor ou a situação estressora está prolongada, os mecanismos fisiológicos de resposta podem ser comprometidos, o que pode prejudicar a saúde do peixe (BEITINGER, 1990; BARTON, 2002).

Ao ocorrer uma situação estressora, respostas diferentes podem ocorrer em estágios ou etapas (Figura 1.4). A primeira resposta se dá pela ativação do sistema simpático e respostas adaptativas com o objetivo de tentar promover o retorno à homeostase que e, finalmente, a terceira etapa que ocorre em situações de longos períodos estressores, que culminam em exaustão biológica e morte do animal (URBINATI *et al.*, 2014).

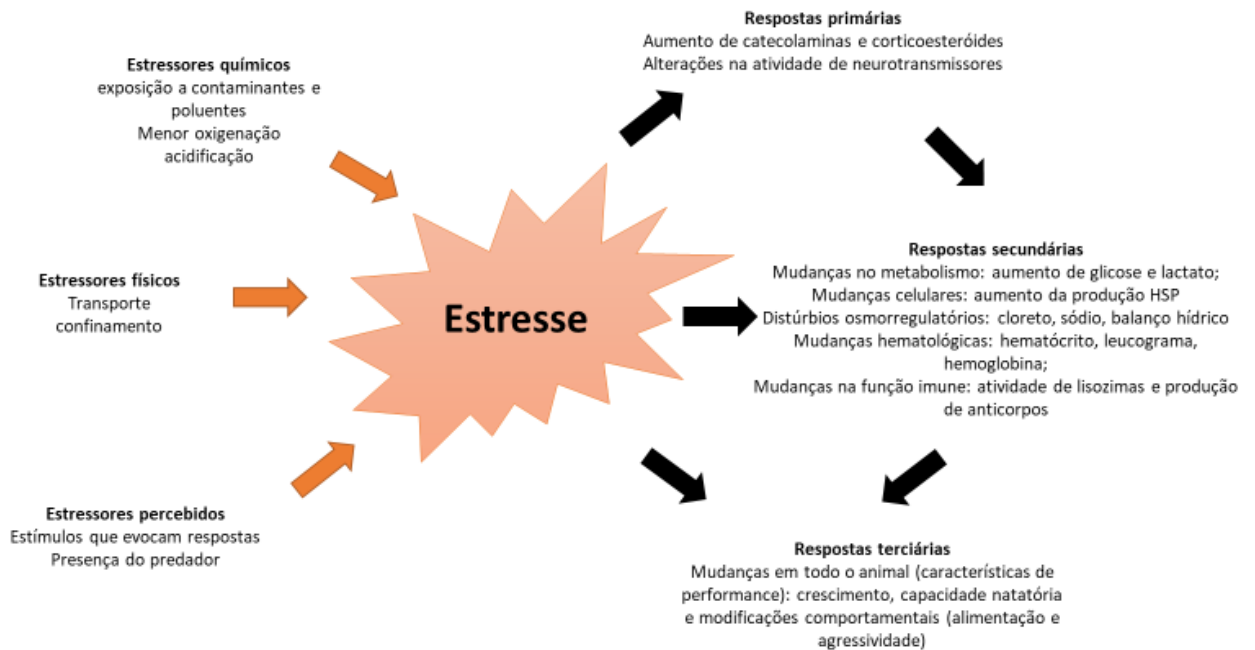


Figura 1.4. Em situação de estresse, diversos efeitos fisiológicos são desencadeados, em respostas primárias, secundárias ou terciárias (Adaptado de Barton 2002).

Inicialmente, em situação de estresse, são desencadeados complexos mecanismos neurais e neuro-hormonais mediados pelo sistema nervoso simpático, com estimulação da liberação de catecolaminas e de cortisol, pelo sistema hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) (BARTON, 2002; VOLPATO, 2014).

Ao ser exposto a um agente estressor, a resposta se inicia com percepção da ameaça, realizada pelo SNC e então, há estimulação das células cromafins que são inervadas por fibras nervosas simpáticas, com liberação de catecolaminas, de forma que a liberação de adrenalina e noradrenalina é realizada muito rapidamente, o que gera o aumento destas imediatamente à situação de estresse (Barton, 2002). A partir da liberação das catecolaminas, diversos ajustes e respostas ocorrem no organismo para promover maior oxigenação tecidual e mobilização energética, como a contração esplênica e liberação de eritrócitos, aumento da ventilação e capacidade respiratória, aumento da glicemia pela glicogenólise hepática, além de efeitos inotrópicos e cronotrópicos no coração (GAMPERL *et al.*, 1994; BARTON, 2002; FABBRI *et al.*, 1998). Após alguns minutos da ativação das células cromafins, se dá a ativação do eixo HHI, em uma cascata de reações: estimulação do hipotálamo a liberar o fator de liberação de corticotropina (CRH), seguido da liberação de adrenocorticotropina

(ACTH) pela hipófise e então, a estimulação das células interrenais a aumentarem a produção de cortisol (URBINATI *et al.*, 2014).

Em situação de novas e prolongadas condições estressoras, se inicia a resposta adaptativa, para a manutenção das funções celulares e metabólicas, no sistema imunológico e osmorregulação (NARDOCCI *et al.*, 2014). Ocorre a perda de íons plasmáticos, principalmente sódio e cloreto e as altas concentrações de cortisol promovem a manutenção da hiperglicemia e podem desencadear, juntamente com a glicogenólise, a mobilização de aminoácidos oriundos da quebra de proteínas orgânicas (URBINATI *et al.*, 2014). Ainda, as alterações moleculares induzidas pelo estresse resultam em alterações na função mitocondrial e nos sistemas de defesas antioxidantes (WENDERLAAR BONGA, 1997).

Por fim, devido à mobilização energética para a resposta de alarme, como para a manutenção das funções cardiovasculares e respiratórias e osmorregulatórias e para o reparo tecidual, há prejuízo em outras funções como a defesa imunológica, crescimento, reprodução e comportamentais, o que caracteriza a resposta terciária (BARTON, 2002; URBINATI *et al.*, 2014).

Dentre os biomarcadores para a avaliação do estresse em peixes, o aumento da glicemia tem sido relacionada com a presença de contaminantes, sendo que a concentração da glicose tem sido bastante utilizada para mensurar a resposta ao estresse de peixes, quando expostos a agrotóxicos (YEKENN *et al.*, 2013; URBINATI *et al.*, 2014), como o CBZ (NWANI *et al.*, 2015) e TBZ (TONI *et al.*, 2016). Em decorrência da liberação de catecolaminas e contração esplênica, frequentemente se observa que o estresse promove o aumento dos valores hematológicos, como hematócrito, RBCs e hemoglobina, em exposição a contaminantes (SANCHO *et al.*, 2010; WENDERLAAR BONGA, 2011). Em situações estressoras, o cortisol também pode fornecer informações sobre a resposta dos peixes, uma vez que tende a aumentar frente à exposição de agrotóxicos, o que pode prejudicar a osmorregulação (WENDERLAAR BONGA, 2011; URBINATI *et al.*, 2014).

Além dos biomarcadores diretamente associados à resposta de estresse, variáveis relacionadas à manutenção do equilíbrio osmoiônico também podem ser utilizadas como biomarcadores fisiológicos. Os peixes teleósteos dulcícolas são hiperosmóticos, ou seja, mais concentrados em relação à água doce e, portanto, precisam manter o equilíbrio iônico por meio do balanço entre a entrada de água e a

saída de íons. O balanço de água nestes peixes é regulado pela filtração glomerular e conseqüente grande produção de urina e para que não haja extensa perda de sais, há reabsorção tubular de íons importantes para a manutenção da homeostase, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo o  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  principalmente encontrados no fluido extracelular e  $\text{K}^+$ , no fluido intracelular (BECKER E BALDISSEROTTO, 2014) (Figura 1.5).

Para a manutenção do equilíbrio iônico, existem mecanismos que são regulados pelas brânquias, rins e intestinos dos teleósteos. Nas brânquias, existem células com adaptação específica para estas funções, como as células ricas em mitocôndrias (células de cloreto e células pavimentosas). Na membrana basolateral das células de cloreto, pode-se encontrar bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , o que facilita a entrada de  $\text{Na}^+$  e a bomba de  $\text{H}^+$  (HATPase), que são responsáveis por eliminar o  $\text{H}^+$  e favorecer a entrada do  $\text{Na}^+$  pelo canal de  $\text{Na}^+$ , pela membrana apical e ainda, há o trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que atua para a manutenção do pH (HWANG, LEE E LIN, 2011; BECKER E BALDISSEROTTO, 2014). O equilíbrio do pH dos peixes se dá pelo controle da concentração de bicarbonato plasmático, com excreção de  $\text{H}^+$  ou do próprio bicarbonato. A anidrase carbônica (AC) é uma metaloenzima presente no citosol, responsável pela hidratação de  $\text{CO}_2$ , com formação de  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{H}^+$ , que serão excretados pela HATPase presente na membrana apical (EVANS; PIERMARINI E CHOE, 2005; GILMOUR E PERRY, 2009) (Figura 1.6).

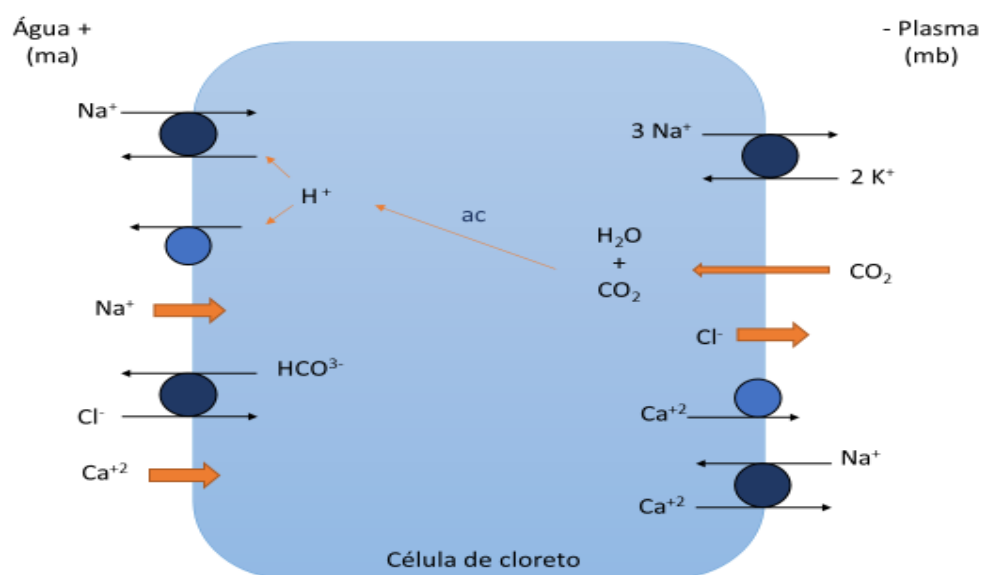


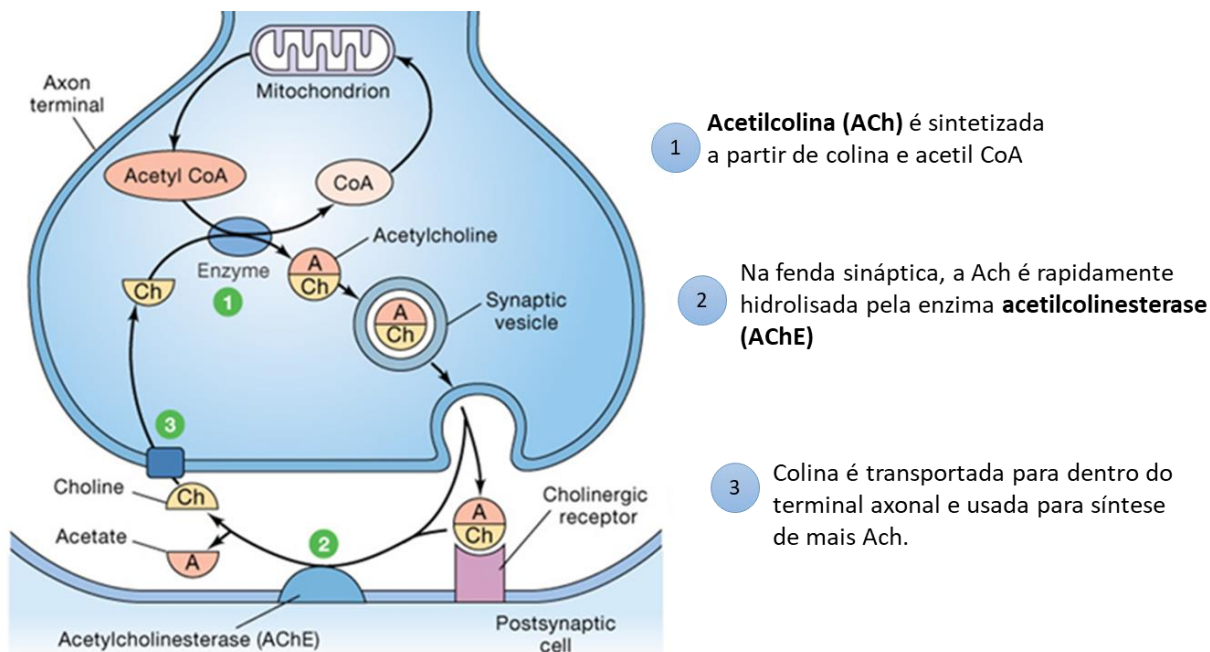
Figura 1.5. Fluxo de íons nas células de cloreto das brânquias de teleósteos de água doce. Os círculos representam os sistemas de transporte. Setas laranja: difusão; ma: membrana apical; mb: membrana basolateral; ac: naidrase carbônica. Adaptado de Becker e Baldisserotto, 2014.

Os agrotóxicos e demais contaminantes podem promover diversos efeitos relacionados à desequilíbrios iônicos em peixes, alterando a permeabilidade branquial a íons e água, de forma que a avaliação das atividades das ATPases branquiais são importantes para avaliação de danos e são indicadoras de toxicidade, uma vez que estas podem sofrer inativação ou interferência de suas atividades (CHOWDHURY *et al.*, 2016). Somando-se a estas análises, a atividade da AC pode também fornecer informações importantes sobre o equilíbrio iônico e osmótico, pois contaminantes podem provocar menor eficiência na eliminação de CO<sub>2</sub> e alterar a função desta enzima (KAVIRAJ *et al.*, 2004; GILMOUR E PERRY, 2009).

#### 1.4.2. Biomarcadores de neurotoxicidade

A determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) é um importante indicador da exposição a agrotóxicos, uma vez que esta possui papel fundamental na transmissão sináptica colinérgica central e neuromuscular e está presente em vertebrados e invertebrados (SANTI *et al.*, 2011; MURUSSI *et al.*, 2014;). Esta enzima é sítio de ação para os compostos organofosforados e carbamatos, que inibem a sua função de hidrolisar a acetilcolina (ACh) em acetato e colina, de forma a acumular este neurotransmissor na fenda sináptica, promovendo estimulação excessiva de receptores colinérgicos (FUKUTO, 1990; YI *et al.*, 2006; THAM *et al.*, 2009;). O mecanismo de ação da AChE na fenda sináptica está representado na Figura 1.6.

Apesar de ser muito relacionada à exposição aos carbamatos e organofosforados, a atividade da AChE tem sido amplamente estudada para avaliação de toxicidade de diversos outros contaminantes em peixes, como em situações de associação a agrotóxicos (Vieira *et al.*, 2014), ou isolados, como a herbicidas (MODESTO E MARTINEZ, 2010), inseticidas (VIEIRA E MARTINEZ, 2018) e fungicidas (KOLESÁROVÁ *et al.* 2013; JIANG *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2019). Apesar de comumente os agrotóxicos causarem a sua inibição, alguns fungicidas estão sendo relacionados ao aumento da atividade desta enzima, uma vez que parecem desencadear apoptose com a diminuição da ACh (JIANG *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2019).



- 1 Acetilcolina (ACh) é sintetizada a partir de colina e acetil CoA
- 2 Na fenda sináptica, a Ach é rapidamente hidrolisada pela enzima **acetilcolinesterase (AChE)**
- 3 Colina é transportada para dentro do terminal axonal e usada para síntese de mais Ach.

Figura 1.62. Representação esquemática do mecanismo de ação da AChE e da hidrólise da ACh (Adaptado de Socratic.org).

### 1.4.3. Biomarcadores bioquímicos

Uma vez no ambiente, os contaminantes podem causar efeitos, principalmente pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem promover danos em macromoléculas orgânicas, como lipídios da membrana, proteínas e até mesmo o DNA (KAPTANER *et al.*, 2014). As espécies reativas do oxigênio (ERO), como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radicais hidroxil (·OH), dentre outras, podem promover efeitos indesejáveis para o metabolismo celular (VALKO *et al.*, 2006). Com o desequilíbrio entre a sua geração e neutralização, o excesso de ERO promove a oxidação de biomoléculas celulares, o que pode culminar em diminuição da homeostase e alteração das funções biológicas e conseqüentemente, gerar eventos patológicos, como processos carcinogênicos e degenerativos (BARBOSA *et al.*, 2010; NIKINMAA, 2014; KAPTANER *et al.*, 2014).

O uso de ensaios para mensurar a defesa antioxidante e outros parâmetros para danos oxidativos são importantes para avaliação do estresse oxidativo, como por exemplo a peroxidação lipídica (KAPTANER *et al.*, 2014). Em condições subtóxicas, há ativação de defesas antioxidantes, o que resulta em resposta adaptativa ao estresse. No entanto, em situações que ocasionam o aumento da peroxidação lipídica,

a extensão do dano oxidativo acaba sendo maior que a capacidade de reparo, os radicais formados podem atacar as membranas biológicas, o que poderia culminar em indução de apoptose (GROTTO *et al.*, 2009; AYALLA, MUÑOZ E ARGUELLES, 2014).

A excessiva formação de ERO pode também promover danos como a oxidação das proteínas, uma vez que estes podem alterar a atividade biológica de diversas macromoléculas, de maneira que se modifica a atividade catalítica e provoca desorganizações estruturais na membrana da célula e conseqüentemente, ficam mais sujeitas à citólise ou apoptose (SUZUKI, CARINI E BUTTERFIELD, 2010). A carbonilação de proteínas pode ser então considerada um dos principais distúrbios resultantes do estresse oxidativo (FEDOROVA; BOLLINENI E HOFFMANN, 2013).

Alguns ensaios podem facilitar a avaliação do estresse oxidativo, como o teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que mede a peroxidação lipídica através da formação do malondialdeído (MDA) (FERERICI *et al.*, 2007) e o teste para carbonilação de proteínas, pela determinação de grupamentos carbonilas presente nas amostras (LEVINE *et al.*, 1994).

Quando há estresse oxidativo, diversas respostas antioxidantes podem ser desencadeadas para aumentar a proteção celular, como o aumento de glutathiona reduzida (GSH) e da atividade da glutathiona-S-transferase (GST) (Li, 2009). A GST constitui uma família de enzimas relacionadas com funções de conjugação e detoxificação de compostos tóxicos ou de metabólitos da reação de fase 1 (Figura 1.7) (NIKINMAA, 2014). A GST tem como sua principal função detoxificar os produtos do estresse oxidativo oriundos principalmente a partir da oxidação de lipídios, ácidos nucléicos e proteínas, e ainda protege o DNA contra danos que poderiam promover ou induzir a carcinogênese (HERMES-LIMA, 2005; ALLOCATI *et al.*, 2018;). Durante a metabolização, já foi descrito que o CBZ utiliza a glutathiona durante a conjugação (Hámlton, 2004) e o TBZ utiliza o ácido glicurônico ou grupos sulfatos (FAO, 2008).

A GSH é um tripeptído endógeno, que pode ser considerado um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante e ainda atua como substrato para a ação da GST. Ao participar nas reações redox, a GSH atua como antioxidante não enzimático e elimina uma grande variedade de ERO formadas, bem como espécies reativas ao nitrogênio, que foram geradas de maneira endógena ou a partir de compostos tóxicos ou pró oxidantes (ALLOCATI *et al.*, 2018; NIKINMAA, 2014; Li,

2009).

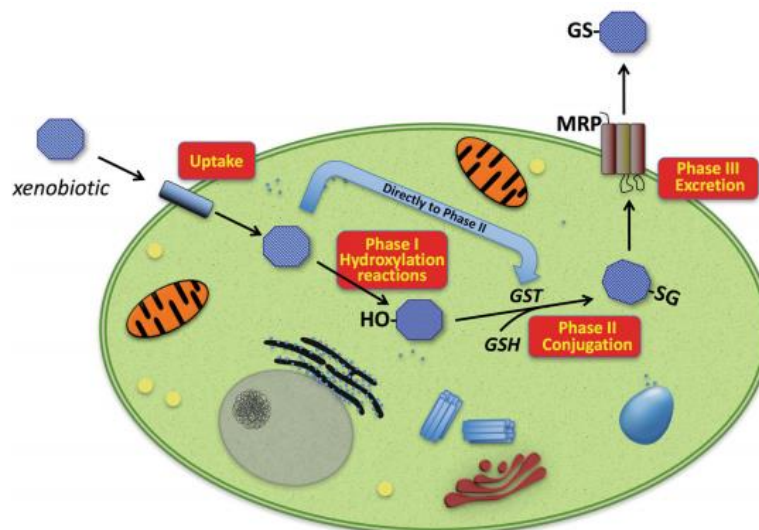


Figura 1.7. Xenobióticos tóxicos podem ser difundidos pela membrana plasmática e ao chegarem dentro da célula, são direcionados para a reação de fase 1, das quais as principais enzimas são pertencentes à família do citocromo P450. Ao entrar na reação de fase 2, as GST promovem a conjugação dos metabólitos da fase 1 com GSH endógeno e o conjugado será eliminado da célula por diferentes bombas de efluxo transmembrana. (Allocati et al., 2018)

Para mensuração do estresse oxidativo provocado por contaminantes como os agrotóxicos, pode-se utilizar da análise de diversos biomarcadores, como as enzimas antioxidantes GST, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). Ainda, análises da concentração de antioxidantes não enzimáticos, como a GSH e o ácido ascórbico também podem ser ferramentas importantes para avaliação do estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2010; POLAT *et al.*, 2012;). O aumento da LPO, já descrito como efeito à agrotóxicos como os fungicidas pode auxiliar na mensuração de danos à membrana e possível morte celular (CLASEN *et al.*, 2018; TONI *et al.*, 2011). O estresse oxidativo também pode ser mensurado pela formação de proteínas carboniladas, resultando inclusive em morte celular, que já foram detectados em exposição a agrotóxicos (STADMAN E LEVINE, 2000; VIEIRA *et al.*, 2018;) e fungicidas (FEDOROVÁ *et al.*, 2014; SCHARBACHEROVÁ *et al.*, 2016).

#### 1.4.4. Biomarcadores genotóxicos

Mesmo cercado de defesas antioxidantes, o excesso de ERO pode provocar o surgimento de danos ao material genético, em decorrência da oxidação de bases,

formação de adutos ou até mesmo por alterações durante os processos de reparo e replicação do DNA (GUPTA E LUZ, 1999; OHE *et al.*, 2004).

A utilização do teste do cometa pode demonstrar quebras nas ligações na molécula de DNA, uma vez que essa metodologia tem se demonstrado bastante sensível para a detecção destes danos (SINGH *et al.*, 1988; OOST *et al.*, 2003). Neste teste, baseado na eletroforese celular após exposição a um xenobiótico, pode ser observada a fragmentação do DNA, uma vez que há migração mais rápida do DNA fragmentado do que do DNA intacto, o que leva à formação de cauda e quanto maior esta cauda, maior é a fragmentação do DNA (FRENZILLI; NIGRO E LYONS, 2009; NIKINMAA, 2014;).

Outros testes que podem ser utilizados para avaliação de danos genotóxicos é o ensaio do micronúcleo (MN) e de alterações eritrocíticas nucleares (ENA). Os MN em eritrócitos de peixes são formados durante a divisão celular e demoram em torno de uma semana para que estes sejam liberados na circulação, de maneira que geralmente não são encontrados em exposições curtas a contaminantes (NIKINMAA, 2014). Os MN são formados em decorrência da condensação de fragmentos cromossômicos ou por cromossomos que não foram incluídos no núcleo após a anáfase, permanecendo no citoplasma (AL-SABTI E METCALFI, 1995). Já as ENA, podem se apresentar como alterações no formato do núcleo dos eritrócitos, como em núcleos segmentados, lobulados ou em formato de rim e complementam os resultados para avaliação da genotoxicidade (AYLLÓN E GARCIA-VAZQUEZ, 2001).

O aumento de danos ao DNA e de MN já foram relacionados à exposição a agrotóxicos, como a inseticidas da classe dos piretróides e de neonicotinóides (VIEIRA E MARTINEZ, 2018; ALVIM E MARTINEZ, 2019) e inclusive fungicidas (AL-SABDI E METCALFE, 1995; TAXVIG *et al.*, 2007; PALANIKUMAR *et al.*, 2014; CASTRO *et al.*, 2018), de maneira que o uso destes biomarcadores são fundamentais para a mensuração de danos mutagênicos.

#### 1.5. *Prochilodus lineatus* COMO MODELO BIOLÓGICO

Diversos trabalhos ecotoxicológicos utilizam os peixes como modelo biológico para a avaliação de efeitos provocados por xenobióticos, tanto pela facilidade em realização de estudos em campo ou laboratoriais como também porque estes animais

demonstram respostas adaptativas e de estresse quando em ambientes contaminados (NIKINMAA, 2014).

O peixe *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836) (Figura 1.8), conhecido popularmente como curimba, é uma espécie neotropical dulcícola, pertencente à ordem Characiformes, família Prochilodontidae. Estes peixes apresentam corpo de tamanho médio a grande, lábios grossos com denticulos, escamas ctenóides e coloração prateada. Esta espécie tem distribuição restrita ao sul da América do Sul (bacias Paraná-Paraguai e Paraíba do Sul) e é um dos peixes mais utilizados para consumo humano na região sul e sudeste do Brasil. Apresenta comportamento detritívoro e devido à sua sensibilidade a diversos tipos de poluentes, tem sido amplamente utilizado para ensaios ecotoxicológicos (SHIBATTA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018). Por ser um peixe de fundo, é mais suscetível à contaminação por substâncias presentes tanto na água como no sedimento e mostra alterações fisiológicas na presença de diversos agrotóxicos, mesmo em exposições curtas ou em baixas concentrações (LANGIANO E MARTINEZ, 2008; VIEIRA *et al.*, 2018; ALVIM E MARTINEZ, 2019; VIEIRA *et al.*, 2019; ANDRADE *et al.*, 2019).



Figura 1.8. Peixe nativo dulcícola *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (BIRINDELLI, MZ/UEL).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os fungicidas são compostos amplamente utilizados na agricultura e pecuária brasileira para o controle de diversos tipos de fungos patogênicos. No entanto, a presença destes no ambiente tem chamado a atenção, principalmente devido à detecção frequente em corpos de água, em diferentes regiões do planeta. Apesar de serem encontrados em concentrações baixas, os efeitos da exposição a estes compostos ainda são pouco estudados e a preocupação aumenta com a falta de legislação e de dados que confirmem sobre a segurança de seu uso.

Dentre os fungicidas que são utilizados em escala mundial, a azoxistrobina, o carbendazim e o tebuconazol têm sido frequentemente detectados em amostras de águas e de esgoto, no Brasil e no mundo. A presença destes fungicidas em ambientes dulcícolas desperta atenção pois são compostos tóxicos para organismos aquáticos.

Em um cenário de contaminação ambiental por fungicidas, os estudos ecotoxicológicos são ferramentas importantes para a avaliação de toxicidade destes compostos para os organismos aquáticos, que estão frequentemente expostos a contaminantes de diferentes origens e efeitos. A utilização de peixes como modelos biológicos para estudos de toxicidade é relevante para a avaliação de risco frente à exposição por esta classe de agrotóxicos, que ainda é pouco estudada, quando comparada aos inseticidas e herbicidas. A utilização de biomarcadores auxilia na avaliação dos impactos provocados por contaminantes, bem como as alterações fisiológicas e bioquímicas que podem ser desencadeadas em um organismo contaminado. Ao se utilizar espécies nativas em ensaios laboratoriais, pode-se estimar um pouco dos efeitos que estes animais sofrem no ambiente natural e pode colaborar com o entendimento de efeitos ecotoxicológicos reais.

Desta forma, este trabalho visa contribuir com informações a respeito dos efeitos que estes três fungicidas podem provocar em uma espécie nativa de peixe, expostas a concentrações ambientalmente relevantes, considerando-se diferentes biomarcadores, para fornecer subsídios para regulamentação de concentrações seguras destes no ambiente aquático.

### 3. HIPÓTESES

- Os fungicidas azoxistrobina, carbendazim e tebuconazol promoverão alteração em parâmetros fisiológicos, bioquímicos e genotóxicos nos peixes testados, nas diferentes concentrações utilizadas;
- Os peixes expostos à mistura dos fungicidas, em concentrações próximas às encontradas na legislação para TBZ e CBZ demonstrarão efeitos em biomarcadores;
- Peixes expostos à água de manancial coletadas na Estação de Tratamento de Água Tibagi (ETA Tibagi – SANEPAR) apresentarão alterações nos biomarcadores relacionadas com a presença dos fungicidas;

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos fungicidas carbendazim e tebuconazol, isolados e a mistura destes com o fungicida azoxistrobina, bem como os possíveis efeitos da água coletada na Estação de Tratamento de Água Tibagi (SANEPAR), por meio da análise de diversos biomarcadores, integrando diferentes níveis de organização biológica, utilizando como modelo biológico o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do carbendazim e tebuconazol em parâmetros fisiológicos, bioquímicos e genotóxicos de *P. lineatus*;
- Comparar os efeitos destes fungicidas em mistura com a azoxistrobina e analisar as interações entre esses agrotóxicos e se eles promoverão efeitos nos mesmos biomarcadores do que quando expostos isoladamente;
- Quantificar a presença destes fungicidas em água de manancial, coletada na Estação de Tratamento de Água (ETA TIBAGI – SANEPAR) e os efeitos desta água para *P. lineatus*, considerando-se os mesmos biomarcadores descritos anteriormente;
- Elencar os melhores biomarcadores para avaliar a resposta a esses fungicidas;

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, P. C.; Singh, N. Pesticide use and application: An Indian scenario. **Journal of Hazardous Materials**, v.165, p.1-12. 2009.

ALISSON, E. 2013. **Agência Fapesp: Mudanças no clima do Brasil até 2100**. Disponível em: <<http://agencia.fapesp.br/mudancas-no-clima-do-brasil-ate-2100/17840/>>. Acesso em 08 jan. 2020.

ALLOCATI, N.; Masulli, M.; Di Iloi, C.; Fererici, L. Gluthatione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in câncer and neurodegenerative diseases. **Oncogenesis**, 7 (8), 2018.

ALMEIDA, M. B.; Madeira, T. B.; Watanabe, L. S.; Meletti, P. C.; Nixdorf, S. L. Pesticide determination in water samples from a rural área by multi-target method applying Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.30, n.8, p.1657-1666, 2019.

ALTENHOFEN, S.; Nabinger, D. D.; Wiprich, M. T.; Pereira, T. C. B.; Bogo, M. R.; Bonan, C. D. Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v.180, p.483-490, 2017.

AL-SABTI, K.; Metcalfe, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p.121-135, 1995.

ALVIM, T. T.; Martinez, C. B. R. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.842, p.85-93, 2019.

ANDRADE, L L.; Pereira, A. E. S.; Fraceto, L. F.; Martinez, C. B. R. Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. **Science of the Total Environment**, v.663, p.548-559, 2019.

ANDRADE, A. S.; Queiroz, V. T.; Lima, D. T.; Drumond, L. C. D. Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em municípios do Alto Parnaíba - MG. **Rev. Química nova**, 34 (7), 1129-1135, 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Reavaliação **Toxicológica: ANVISA inicia a reavaliação do carbendazim**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/noticias//asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-inicia-a-reavaliacao-do-carbendazim/219201/pop\\_up?inheritRedirect=false](http://portal.anvisa.gov.br/noticias//asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-inicia-a-reavaliacao-do-carbendazim/219201/pop_up?inheritRedirect=false)>. Acesso em 27 dez. 2019.

ASSIS, C R. D.; Linhares, A. G.; Oliveira, V. M.; França, R. C. P.; Maciel Carvalho, E. V. M.; Bezerra, R. S.; Carvalho Jr, L. B. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase ein tropical fish. **Science of Total Environment**, v.441, p.141-150, 2012.

AYALLA, A.; Muñoz, M. F.; Arguelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014, 1-31, 2014.

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

BALKAN, S.; Aktaç, T. Study on the liver functions in rats exposed to benomyl. **Journal of Biological Sciences**, v.5 n.5, p.666-669, 2005.

BARBOSA, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfenas, R. C. G.; De Paula, S. O.; Minim, V. P. R.; Bressan, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**, Campinas, v.23 n.4, p.629-643, 2010.

BATTAGLIN, W. A.; Sandstrom, M. W.; Kuivila, K. M.; Kolpin, D. W.; Meyer, M. T. Occurrence of azoxystrobin, propiconazole and selected other fungicides in US Streams, 2006-2006. **Water Air and Soil Pollution**, v.218, p.307-322, 2011.

BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, 42 (3), 517-525, 2002.

BARIZON, R. R. M.; Figueiredo, R. O.; Souza Dutra, D. R. C.; Regitano, J. B.; Ferracini, V. L. Pesticides in the surfasse Waters of the Camanducaia River watershed, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p.1-10, 2019.

BECKER, A. G.; Baldisserotto, B. **Regulação Osmótica e Iônica. In: Baldisserotto, B; Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C. Biologia e Fisiologia de peixes neotropicais de água doce.** Jaboticabal, FUNEP, UNESP, 253-264, 2014.

BEITINGER, T. L. Behavioral reactions for the assessment of stress in fishes. **Journal of Great Lakes Research**, v.16 n.4, p.495-528,1990.

BEREZEN, N.; Lentzen-Godding, A.; Probst, M.; Schulz, H.; Schulz, R.; Liess, M. A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. **Chemosphere**, v.58, p.683-691, 2005.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação n.5, de 28 de setembro de 2017.** Consolidação das normas para as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, 2017. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de017.pdf>>. Acesso em 02 jan. 2020

BRASIL. **Lei nº7802, de julho de 1989.** Diário Oficial de União, Brasília, D. F., 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 12 set 2018.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Resolução CONAMA n.357, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 18 mar., 2005. Disponível em: < <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em 23 mai. 2018.

BOESTEN, J. J. T. I. Conceptual considerations on exposure assessment goals for aquatic pesticide risks at EU level. **Pest Management Science**, 74 (2), 2017.

BORSOI, A.; Santos, P. R. R.; Taffarel, L. E.; Gonçalves Jr, A. C. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, v.3, n.1, p.86-100, 2014.

BURKHARDT, M.; Kupper, T.; Han, S.; Haag, R.; Schmid, P.; Kohler, M.; Boller, M. Biocides used in building materials and their leaching behavior to sewer systems. **Water Science and Technology**, v.56 n.12, p.63-67, 2007.

CALDAS, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G. Principais técnicas de preparo de amostras para a determinação de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e espectrometria de massas. **Revista Química Nova**, v.34 n.9, p.133-143, 2011.

CARRAQUIBORDE, P.; Mirabella, P.; Waichman, A.; Solomon, K.; Van den Brink, P. J.; Maund, S. Aquatic Risk Assessment of Pesticide in Latin America. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v.10 n.4, p.539-542, 2014.

CASTRO, T. F. D.; Souza, J. G. S.; Carvalho, A. F. S.; Assis, I. L.; Palmieri, M. J.; Vieira, L. F. A.; Marcussi, S.; Machado, M. R. F.; Murgas, L. D. S. Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.62, p.140-146, 2018.

CHAFFAI, A. H. Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring. **International Journal of Biotechnology for wellness industries**, v.3, n.4, p.19-26, 2014.

CHOUHDURY, N. Ecotoxicology of aquatic system: a review on fungicide induced toxicity in fishes. **Progress in Aqua Farming and Marine Biology**, v.1 n.1. 2018.

CHOWDHURY, M. J.; Girgis, M.; Wood, C. M. Revisiting the mechanisms of copper toxicity to rainbow trout: time course, influence in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environ. Safety**, v.52, p.83-91, 2016.

CLASEN, B.; Loro, V. L.; Murussi, C. R.; Tietcher, T. L.; Moraes, B.; Zanella, R. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* in a rice-fish system. **Science of the Total Environment**, v.626, p.737-743, 2018.

CLIMENT, M. J.; Sánchez-Martín, M. J.; Rodríguez-Cruz, M. S.; Pedreros, P.; Urrutia, R.; Herrero-Hernández, E. Determination of pesticides in river surface Waters of Central Chile using SPE-GC-MS multi-residue method. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v.63, n.2, p.4023-4031, 2018.

COLIN, N.; Porte, C.; Fernandes, D.; Barata, c.; Padrós, F.; Carrassón, M.; Monroy, M.; Cano-Rocabayera, O.; Sostoa, A.; Pina, B.; Maceda-Veiga, A. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. **Science of Total Environmental**, v.540, p.307-323, 2016.

COSTA, e. P.; Bottrel, S. E.; Starling, M. C. V. M.; Leão, M. M. D.; Amorin, C. C. Degradation of carbendazim in water via photo-Fenton in Raceway Pond Reactor: assessment of acute toxicity and transformation products. **Environmental Science and Pollution Research**, v.26, n.5, p.4324-4336, 2018.

CUI, N.; Xu, H.; Yao, S.; He, Y.; Zhang, H.; Yu, Y. Chiral triazole fungicide tebuconazole: enantioselective, bioaccumulation, bioactivity, acute toxicity and dissipation in soils. **Environmental Science and Pollution Research**, v.25, n.5, p.25468-25475, 2018.

DE CLERCQ, M.; Vats, A.; Biel, A. 2018. **Agricultura 4.0: The future of farming technology.** **World Government Summit.** Disponível em: <<https://www.worldgovernmentsummit.org/api/publications/document?id=95df8ac4-e97c-6578-b2f8-ff0000a7ddb6>>. Acesso em 08 jan. 2020.

DEPLEDGE, M. H. Novel approaches and technologies in pollution assessment and monitoring: a UK perspective. **Ocean & Coastal Management**, 52, 336-341, 2009.

DEPLEDGE, M. H. **Nondestructive biomarkers in vertebrates.** Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 1993.

DUJAKOVIC, N.; Grujic, S.; Radisic, M.; Vasiljevic, T.; Lausevic, M. Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.678 n.1, p.63-72, 2010.

ESPENSHADE, P. J.; Hughes, A. L. Perulation of sterol synthesis in eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, v.41, p.401-427, 2007.

EFSA. European Food Safety Authority. The 2010 **European Union Report on Pesticide Residues in Food**. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3130>>. Acesso em 03 jan. 2020.

EKINCI, D.; Senturk, M. Interaction of fungicides and pesticides with specific enzymes. In: Carisse, O. (Ed.), **Fungicides. In-Tech**, p.383-404, 2010.

EVANS, D. H.; Piermarini, P. M.; Choe, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. **Physiological reviews**, v.85 n.1, p.97-177, 2005.

FAN, L. Y. 2017. **China finds pesticides office to combat pollution, overuse**. Disponível em: <<https://www.sixthtone.com/news/1000987/china-finds-pesticide-office-to-combat-pollution%2C-overuse>>. Acesso em 03 jan. 2020.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT: Pesticide indicators**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>>. Acesso em 04 jan. 2020.

FEDOROVA, M.; Bollineni, R. C.; Hoffmann, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. **Mass Spectrometry Reviews**, v.33 n.2, p.79-97, 2014.

FELSOT, A. S.; Racke, K. D.; Hamilton, D. J. Disposal and degradation of pesticide waste. **Reviews of environmental Contamination and Toxicology**, p.177, 123-200, 2003.

FEDERICI, G.; Shaw, B. J.; Handy, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v.84, p.415-430, 2007.

FORBES, V. E.; Forbes, T. L. **Ecotoxicology in Theory and Practice**. London: Chapman and Hall, p.247, 1994.

FRENZILLI, G.; Falleni, A.; Scarcelli, V.; Del Barga, I.; Pellegrini, S.; Savarino, G.; Mariotti, V.; Benedetti, M.; Fattorini, D.; Regoli, F.; Nigro, M. Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus* from a contaminated freshwater ecosystem. **Aquatic toxicology**, v.89, p.188-196, 2008.

FUKUTO, R. T. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v.87, p.245-254. 1990.

GAMPERL, A. K.; Vikayan, M. M.; Boutilier, R. G. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.4, p.215-255, 1994.

GERECKE, A. C.; Scharer, M.; Singer, H. P.; Muller, S. R.; Schwarzenbach, R. P.; Sagesser, M.; Ochsenbein, U.; Popow, G. Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants- current situation and reduction potential, **Chemosphere**, v.48, p.307-315, 2002.

GERÓNIMO, E.; Aparicio, V. C.; Bárbaro, S.; Portocarrero, R.; Jaime, S.; Costa, J. L. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. **Chemosphere**, p.107, 2014.

GILMOUR, K. M.; Perry, S. F. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v.212, p.1647-1661., 2009

GRAVILESCU, M.; Fate of pesticide in the environment and its bioremediation. **Engineering in Life Science**, v.5 n.6, p.497-526, 2005.

GROTTO, D.; Maria, L. S.; Valentini, J.; Paniz, C.; Schimitt, G.; Garcia, S. C. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Rev. Química Nova**, v.32, n.1, p.169-174, 2009.

GRUBER, S.; J.; Munn, M. D. Organophosphate and carbamate insecticides in agricultural waters and cholinesterase (ChE) inhibition in Common Carp (*Cyprinus carpio*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.35, p.391-396, 1998.

---

GUPTA, R. C.; Lutz, W. K. Background DNA damage for endogenous and unavoidable exogenous carcinogens: a basis for spontaneous cancer incidence? **Mutation Research**, v.424 n.1, p.1-8, 1999.

HAN, Y.; Liu, T.; Wang, J.; Zhang, C.; Zhu, L. Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (*Danio rerio*) livers. Pesticide **Biochemistry and Physiology**, v.133, p.13-19, 2016.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Functional metabolism: **Regulation and Adaption**, 319-368, 2005.

HERRERO-HERNANDEZ, E.; Pose-Juan, E.; Sánchez-Martín, M. J.; Andrades, M. S.; Rodríguez-Cruz, M. S. Intra-annual trends of fungicide residues in waters from vineyard areas in La Rioja region of northern Spain. **Environmental Science and Pollution Research International**, 23 (22), 22924-22936, 2016.

HERRERO-HERNANDEZ, Pose-Juan, E.; Alvarez-Martín, A.; Andradesw, M. S.; Rodríguez-Cruz, M. S.; Sánchez-Martín, M. J. Pesticides and degradation products in groundwaters from a vineyard region: optimization of a multiresidue method based on SPE and GC-MS. **Journal of Separation Science**, v.35, n.24, p.3492-3500, 2012.

HERRERO-HERNÁNDEZ, E.; Andrades, M. S.; Álvarez-Martín, A.; Pose-Juan, E.; Rodríguez-Cruz, M. S.; Sánchez-Martín, M. J. Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. **Journal of Hydrology**, v.486, p.234-254, 2013.

HOGARNH, J. N.; Fobil, J. N.; Ofosu-Budu, G. K.; Carboo, D.; Ankrah, N. A.; Nyarko, A. Assessment of heavy metal contamination and macro-nutrient content of composts for environmental pollution control in Ghana. **Global Journal of Environmental Research**, v.2 n.3, p.133-139, 2008.

HWANG, P. P.; Lee, T. H.; Lin, L. Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. **American Journal of Physiology**, v.301, p.29-47, 2011.

IBAMA. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem Ambiental.** Brasília, D. F. Disponível em <<https://docplayer.com.br/7853213-lbama-m-m-a-produtos-agrotoxicos-e-afins-comercializados-em-2009no-brasil-uma-abordagem-ambiental.html>> Acesso em 08 jan. 2020.

Janz, D. M. 2013. **Biomarkers in Fish Ecotoxicology.** *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology.* Berlin: Féraud, J & C. Claise.

JIANG, J.; Wu, S.; Wang, Y.; An, X.; Cai, L.; Zhao, X.; Wu, C. Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae development. **Toxicology in Vitro**, v.29, p.1473-1481, 2015.

JIANG, J.; Wu, S.; Wu, C.; An, X.; Cai, L. Embryonic exposure to carbendazim induces the transcription of genes related to apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & Shelfish Immunology**, v.41, p.493-500, 2014.

KAPTANER, B.; Kankaya, E.; Dogan, A.; Çelic, I. Histopathology and oxidative stress in the liver of *Chalcalburnus tarichi* living in lake Van, Turkey. **Life Science Journal**, v.11, n.8, p.66-77, 2014.

KARLSSON, I.; Friberg, H.; Steinberg, C.; Persson, P. Fungicide effects of fungal community composition in the wheat phyllosphere. **Plos One**, v.9, n.11, p.01-12, 2014.

KUMAR, N.; Awoyemi, O.; Willis, A.; Schmitt, C.; Ramalingam, L.; Moustaid-Moussa, N.; Crago, J. Comparative lipid peroxidation and apoptosis in Embryo-Larval Zebrafish exposed to three azole fungicides, tebuconazole, propiconazole, and myclobutanil, at environmentally relevant concentrations. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.38,n.7, p.1455-1466, 2019.

KAHLE, M.; Buerge, I. J.; Hauser, A.; Muller, M. D.; Poiger, T. Azole Fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. **Environmental Science and Technology**, v.42, p.7193-7200, 2008.

KOHLER, H. R.; Tribskorn, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we Track Effects to the population level and beyond? **Science**, 341 (6147), 759-765, 2013.

LAM, P. K. S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, 52, 348-354, 2009.

LANGIANO, V. C.; Martinez, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v.147, n.2, p.222-231, 2008.

LEVINE, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Aamici, A.; Climent, I.; Lenz, A. G.; ... & Stadtman, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **In: Methods in enzymology**, v.186, p.464-478, 1990.

LIEBEL, S.; Tomotake, M. E. M.; Ribeiro, C. A. O. Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v.8, n.2, p.9-15, 2013.

LI, X. Glutathione and glutathione-S-Transferase in Detoxification mechanisms. In: Ballantyne, B.; Marrs, T. C.; Syversen, T., editors. **General and Applied Toxicology**. Hoboken, N. J: John Wiley & Sons, 411-423. 2009.

LIMA, J. S. G. Segurança alimentar e nutricional: sistemas agroecológicos são a mudança que a intensificação ecológica não alcança. **Ciencia e Cultura**, v.69, n.2, p.49-50, 2017.

LU, T.; Zhang, Q.; Lavoie, M.; Zhu, Y.; Ye, Y.; Yang, J.; Paerl, H. W.; Qian, H.; Zhu, Y. G. The fungicide azoxystrobin promotes freshwater cyanobacterial dominance through altering competition. **Microbiome**, v.7 n.128, p.1- 13, 2019.

LUNARDELLI, B.; Cabral, M. T.; Vieira, C. E. D.; Oliveira, L. F.; Risso, W. E.; Meletti, P. C.; Martinez, C. B. R. 2018. Chromium accumulation and biomarker responses in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of tannery activities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.153, p.188-194, 2019.

MALTBY, L.; Brock, T. C. M.; Brink, P. J. V. D. Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: Importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime. **Environmental Science & Technology**, v.43, p.7556-7563, 2009.

MARTINI, L. F. D.; Caldas, S. S.; Bolzan, C. M.; Bundt, A. D. C.; Primel, E. g.; Avia, L. A. Risco de contaminação das águas de superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.10, p.1715-1721, 2012.

MASIÁ, A.; Campo, J.; Vázquez-Roig, P.; Blasco, C.; Picó, Y. Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain). *Journal of Hazardous Materials*, 263, 95-104, 2013.

MIN, E. Y.; Kang, J. C. Effect of waterborne benomyl on the hematological and antioxidante parameters of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.92, p.138-143, 2008.

MONTAGNER, C. C.; Sodr , F. F.; Acayaba, R. D.; Vidal, C.; Campestrini, I.; Locatelli, M. A.; Pescara, I. C.; Albuquerque, A. F.; Umbuzeiro, G. A.; Jardim, W. F. Ten yerar-snapshot of the occurrence of emerging contaminants in drinking, surface and ground waters and wastewaters from São Paulo State, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.30, n.3, p.614-632, 2019.

MONTAGNER, C. C.; Vidal, C. Acayaba, R. D.; Jardim, W. C.; Umbuzeiro, G. A. Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surfasse and drinking water from the State of São Paulo (Brazil). **Royal Society of Chemistry.**, 6, 6668-6677, 2014.

MORENO-GONZÁLEZ; Campillo, j. A.; García, V.; León, V. M. Seasonal input of regulated and emerging organic pollutants through surface watercourses to a Mediterranean costal lagoon. **Chemosphere**, v.92, n.3, p.247-257, 2013.

MURUSSI, C.; Horn, R. C.; Santi, A.; Clasen, B. E.; Reis, G.; Souza, D.; Bortolotto, J. W.; Manfio, C. E.; Loro, V. L. Changes in oxidative markers, endogenous antioxidantes and activity of the enzyme acetylcholinestarse in farmes exposed to agricultural pesticides – a pilot study. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v.44, n.7, p.1186-1193, 2014.

NARDOCCI, G.; Navarro, C.; Cortés, P. P.; Imarai, M.; Montoya, M.; Valenzuela, B.; Jara, P.; Acuña-Castillo, C.; Fernández, R. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v.40, n.2, p.531-538, 2014.

NIKINMAA, M. An Introduction to Aquatic Toxicology. **Elsevier**, p.87-98. 2014.

NWANI, C. D.; Omah, M. C.; Ivoke, N.; Nwamba, H. O.; Ani, C.; Ogbonna, S. U. Biochemical, haematological and morphological variations in juvenile *Clarias gariepinus* exposed to Carbendazim fungicide. **African Journal of Aquatic Science**. v.40, n.1, p.63-71, 2015.

OHE, T.; Watanabe, T.; Wakabayashi, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v.567, p.109-149, 2004.

ONU. Organização das Nações Unidas. FAO: **Se o atual ritmo de consumo continuar, em 2050 o mundo precisará de 60% mais alimentos e 40% mais água.** Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/fao-se-o-atual-ritmo-de-consumo-continuar-em-2050-mundo-precisara-de-60-mais-alimentos-e-40-mais-agua/>>. Acesso em 08 jan. 2020.

ONU. Organização das Nações Unidas. 2017. **ONU News: População mundial atingir 7,6 bilhões de habitantes.** Disponível em: <<https://news.un.org/pt/story/2017/06/1589091-populacao-mundial-atingiu-76-bilhoes-de-habitantes>>. Acesso em 08 jan. 2020.

OOST, R. V. D.; Beyer, J; Vermeulen, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p.57-149, 2003.

PALANIKUMAR, L.; Kumaraguru, A. K.; Ramakritnam, C. M.; Anand, M. Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.75, n.1, p.187-197, 2012.

PALMA, G.; Sánchez, A.; Olave, Y.; Encin, F.; Palma, R.; Barra, R. Pesticides levels in surface Waters in an agricultural-forestry basin in Southern Chile. **Chemosphere**, v.57, n.8), p.763-770, 2004.

PAN. 2014. **Pesticide Action Network UK. Carbendazim**. Disponível em: <http://pan-uk.org/pestnews/Actives/Carbenda.htm>.>Acesso em 10 dez 2019.

PATIL, N. V.; Lonare, M. K.; Sharma, M.; Lalhriatpuia, P. C.; Saini, S. P. S.; Rampal, S. Hemato-Biochemical Alterations Mediated by Carbendazim Exposure and Protective Effects of Quercetin in Male Rats. **Toxicology International**, v.25, n.1, p.7-18, 2018.

PINHEIRO, A.; Silva, M. R.; Kraisch, R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v.7 n.2, p.17-26. 2010

RAMA, E. M.; Bortolan, S.; Vieira, M. L.; Gerardin, D. C. C.; Moreira, E. G. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.69, p.476-486, 2014.

RELYEA, R. A. A cocktail of contaminants: how mixture of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. **Oecologia**, v.159, p.363-376, 2009.

RIBEIRO, A. C. A.; Dores, E. F. G. C.; Amorim, R. S. S.; Lourencetti, C. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do Rio São Lourenço – MT: Validação de método por extração em fase sólida e Cromatografia Líquida. **Química Nova**, v.36, n. 2, p.284-290, 2013.

ROCHA, A. A.; Monteiro, S. H.; Andrade, G. C. R. M.; Vilca, F. Z.; Tornisielo, V. L. Monitoring of pesticide residues in surface and subsurface Waters, sediments and fish in Center-Pivot Irrigation areas. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.26 n.11, p.2269-2278., 2015.

RODRIGUES, E. T.; Pardal, M. A.; Laizé, V.; Cancela, M. L.; Oliveira, P. J.; Serafim, T. L. Cardiomyocyte H9c2 cells present a valuable alternative to fish lethal testing for azoxystrobin. **Environmental Pollution**, v.206, p.619-626, 2015.

RODRIGUES, E. T.; Lopes, I.; Pardal, M. A. Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: a review. **Environmental International**, v.53, p.18-28, 2013.

SAATH, K. C. O.; Fachinello, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.56, n.2, 2018.

SALAMAT, N.; Zarie, M. Using of fish pathological alterations to assess aquatic pollution: a review. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v.4 n.3, p.223-231, 2012.

SCHARBACHEROVÁ, V.; Wnuk, M.; Lewinska, A.; Potocki, L.; Zebrowski, J.; KOZIOROWSKI, M.; Holecková, B.; Siviková, K.; Dianovský, J. Evaluation of cytotoxic and genotoxic activity of fungicide formulation Tango Super® in bovine lymphocytes., **Environmental Pollution**, 220, 255-263, 2016.

SANTI, A.; Menezes, C.; Duarte, M. M. F.; Leitemperger, J.; Lopes, T.; Loro, V. Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (in vitro). **Interdisciplinary Toxicology**, v.4, n.3, p.149-153, 2011.

SILVA, A. R. R.; Santos, C.; Ferreira, N. G. C.; Morgado, R.; Cardoso, D. N.; Cruz, A.; Mendo, S.; Soares, A. M. V. M.; Loureiro, S. Multigenerational effects of carbendazim in *Daphnia magna*: From a subcellular to a population level. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.38, p.412-422, 2019.

SHIBATTA, O. A.; Gealh, A. M.; Bennemann, s. T. 2007. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do Rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v.7, n.2, 2007.

SILVA, M. R.; Campos, A. C. E.; Bohm, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **Rev. Saúde e Biologia**, v.8, n.2, p.46-58, 2013

SINGH, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SINPAF. **Brasil é o maior mercado de agrotóxicos do mundo e 64% dos alimentos estão contaminados.** Disponível em: <<http://www.sinpaf.org.br/brasil-e-o-maior-mercado-de-agrotoxicos-do-mundo-e-64-dos-alimentos-estao-contaminados/>>.

Acesso em 02 jan. 2020.

SKOLLNESS, S. Y.; Blanksma, C. A.; Cavallin, J. E.; Churchill, J. J.; Durhan, E. J.; Jensen, K. M.; Johnson, R. D.; Kahl, M. D.; Makynen, E. A.; Villeneuve, D. L.; Ankley, G. T. Propiconazole inhibits steroidogenesis and reproduction in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). **Toxicological Sciences**, v.132, n.2, p.284-297, 2013.

SOUZA, L. F. C. B.; Montagner, C. C.; Almeida, M. B. Kuroda, E. K.; Vidal, C.; Freire, R. L. Determination of pesticides in the source and drinking Waters in Londrina, Paraná, Brazil. **Semina Ciências Agrárias**, v.40, n.3, p.1153-1164, 2019.

STADMAN, E. R.; Levine, R. Protein Oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.899, p.191-208, 2000.

STEFFEN, G. P. K.; Steffen, R. B.; Antonioli, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Revista Tecno-Lógica**, v.15, n.1, 2011.

SUZUKI, Y. J.; Carini, M.; Butterfield, D. A. Protein Carbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.12, n.3, p.323-325, 2010.

TAXVIG, C.; Hass, U.; Axelstad, M.; Dalgaard, M.; Boberg, J.; Andeasen, H. R.; Vinggaard, A. M. Endocrine-Disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. **Toxicological Sciences**, v.100, n.2, p.464-473, 2007.

THAM, L. G.; Perumal, N.; Syed, M. A.; Shamaan, N. A.; Shukor, M. Y. Assessment of *Clarias batrachus* as a source of acetylcholinesterase (AChE) for the detection of insecticides. **Journal of Environmental Biology**, v.30, n.1, p.135-138, 2009.

UQAB, B.; Mudasir, S.; Nazir, R. Review on Bioremediation of Pesticides. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v.7, n.3, 2016.

URBINATI, E. C.; Zanuzzo, F. S.; Biller-Takahashi, J. D. **Estresse e Sistema Imune em Peixes In: Baldisserotto, B; Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C. Biologia e Fisiologia de peixes neotropicais de água doce.** Jaboticabal, FUNEP, UNESP, 87-106, 2014.

DER OOST, V.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v.13, n.3, p.57-149, 2003.

VALKO, M.; Rhodes, C.; Moncol, J.; Izakovic, M. M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chemico-biological interactions*, v.160, n.1, p.1-40. 2006.

VIEIRA, C. E. D.; Costa, P. G.; Caldas, S. S.; Tesser, M. E.; Risso, W. E.; Escarrone, A. L. V.; Primel, E. G.; Bianchini, A.; Martinez, C. B. R. Na integrated approach in subtropical agro-ecosystems: active biomonitoring, environmental contaminants, bioaccumulation, and multiple biomarkers in fish. **Science of the Total Environment**, v.666, p.508-524, 2019.

VIEIRA, C. E. D.; Perez, M. R.; Acayaba, R. D. A.; Raimundo, C. C. M.; Dos Reis Martinez, C. B. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in diferente tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v.195, p.125-134, 2018.

VIEIRA, C. E. D.; Almeida, M. S.; Galindo, B. A.; Pereira, L.; Martinez, C. B. R. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural áreas. **Neotropical Ichthyology**, v.12, n.1, p.153-164, 2014.

VOLPATO, G. L. Comportamento e Bem estar. *In: Baldisserotto, B; Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C. Biologia e Fisiologia de peixes neotropicais de água doce.* Jaboticabal: FUNEP, UNESP. p.59-86, 2014.

WENDELAAR BONGA, S. E. **Hormonal responses to stress. Encyclopedia of fish: fish physiology from genome to environment**, 2, 1515-1523, 2011.

WIGHTWICK, A. M.; Bui, A. D.; Zhang, P.; Rose, G.; Allinson, M.; Myers, J. H.; Reichman, S. M.; Menzies, N. W.; Pettigrove, V.; allinson, G. Environmental fate of fungicides in surface Waters of a horticultural-production catchment in southeastern Australia. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.62 n.3, p.380-390, 2012.

WORLDOMETERS. 2020. **População mundial**. Disponível em: <<https://www.worldometers.info/br/>>. Acesso em 08 jan. 2020.

YI, M. Q.; Liu, H. X.; Shi, X. Y.; Liang, P.; Gao, X. W. Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *Carassius auratus* in vitro. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v.143, p.113-116, 2006.

ZARI, T. A.; Al-Attar, A. M. Therapeutic effects of olive leaves extract on rats treated with a sublethal concentrations of carbendazim. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.15, p.413-426, 2011.

ZHANG, W. J. Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v.8, n.1, p.1-27, 2018.

ZHANG, W. J.; Jiang, F. B.; Ou, J. F. Global Pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceeding of the Internation Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v.1, n.2, p.125-144, 2011.

ZORITA, I.; Ortiz-Zarragoitia, M.; Apraiz, I.; Cancio, I.; Orbea, A.; Soto, M.; Marigómez, I.; Cajaraville, M. P. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterran Sea using red mullets as sentinel organisms. **Environmental Pollution**, v.153, n.1, p.157-168, 2008.

ZUBROD, J. P.; Bunduschuh, M.; Arts, G.; Bruhl, C. A.; Imfeld, G.; Knabel, A.; Payraudeau, S.; Rasmussen, J. J.; Rohr, J.; Scharmullher, A.; Smalling, K.; Stehle, S.; Schulz, R.; Schafer, R. B. Fungicides: An overlooked pesticide class? **Environmental Science & Technology**, v.53, p.3347-3365, 2019.

## CAPÍTULO 2

---

### **Alterações hematológicas e bioquímicas no teleósteo *Prochilodus lineatus* após exposição aguda ao fungicida carbendazim**

Laura Fernanda Condota Borba de Souza; Cassiana Caroline Montagner; Claudia Bueno dos Reis Martinez

Manuscrito a ser submetido para avaliação no periódico *Ecotoxicology and Environmental Safety*

Normas disponíveis em:

<https://www.elsevier.com/journals/ecotoxicology-and-environmental-safety/0147-6513/guide-for-authors>

**Alterações hematológicas e bioquímicas no teleósteo *Prochilodus lineatus*  
após exposição aguda ao fungicida carbendazim**

Laura Fernanda Condota Borba de Souza<sup>1</sup>; Cassiana Caroline Montagner<sup>2</sup>; Claudia  
Bueno dos Reis Martinez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL),  
Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química, Universidade Estadual de  
Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

\* Autor correspondente:

Claudia Bueno dos Reis Martinez – Laboratório de Ecofisiologia Animal,  
Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia  
Celso Garcia Cid, km380, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brasil, CEP  
86057-970. Tel: +55 (43)3371-5146. Email: claudiabrmartinez@gmail.com;  
cbueno@uel.br.

**RESUMO**

A contaminação em corpos hídricos pelo fungicida carbendazim (CBZ) tem chamado a atenção devido ao seu potencial extremamente tóxico para organismos aquáticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do CBZ (*Derosal 500*<sup>®</sup>) por meio de biomarcadores em peixes da espécie *Prochilodus lineatus*, em concentrações de 5, 50 e 500 µg L<sup>-1</sup>, durante 24 h. Foi observado que o CBZ induziu a diminuição do

hematócrito, promoveu hiperglicemia, hipernatremia, aumento da glutathiona hepática (GSH) e da atividade cerebral de acetilcolinesterase (AChE). Assim, a exposição aguda ao CBZ provocou toxicidade aos peixes testados, com alterações em diferentes biomarcadores, que sugerem resposta de estresse e ativação das defesas antioxidantes. Efeitos como o aumento da AChE demonstram que o CBZ pode interferir na função neural, bem como ele pode promover um quadro de anemia em peixes, devido a hemólise. Nosso trabalho reforça a importância do monitoramento deste fungicida, uma vez que mesmo concentrações baixas demonstraram efeitos nocivos e que podem afetar a qualidade de vida de organismos aquáticos.

**Palavras-chave:** benzimidazóis, estresse oxidativo, biomarcadores, AChE, carbendazim

## 1. INTRODUÇÃO

Diversos novos compostos são produzidos com o intuito de beneficiar a vida humana e animal, otimizar a produção de alimentos, para o tratamento de doenças e pragas em humanos e animais, mas os resíduos dessas substâncias podem atingir o meio ambiente e contaminar solo, água e ar (Montagner *et al.*, 2019). Dentre os diferentes tipos de contaminantes, se destacam os agrotóxicos, que estão relacionados a diversos efeitos nocivos em organismos não alvos (Albuquerque *et al.*, 2016).

A intensificação do uso dos agrotóxicos no Brasil se iniciou a partir da Revolução Verde e logo depois surgiram os primeiros relatórios sobre o impacto ambiental causado por essas substâncias, com objetivo de conscientizar sobre outras formas de controle de pragas e para o controle da contaminação (Costa *et al.*, 2016).

Entretanto, estes produtos são extensamente difundidos nas práticas agrícolas atuais, culminando no aumento crescente de sua comercialização e uso. A partir de 2008, o Brasil se tornou o maior consumidor mundial de agrotóxicos, sendo que somente em 2019, até o mês de julho, foi autorizada a comercialização de 260 novos produtos (Brasil, 2019).

São grandes as perdas econômicas decorrentes de contaminação fúngica, que pode ocorrer em várias etapas do processamento de grãos, de forma que os fungicidas são utilizados para melhorar a produção e sua qualidade com diferentes modos de ação (Singh *et al.*, 2016; Karlsson *et al.*, 2014). Apesar da grande utilização de fungicidas, as informações referentes aos seus efeitos nocivos aos diferentes ecossistemas são escassas (Regueiro *et al.*, 2015; Cuppen, 2000).

No Brasil, o fungicida Carbendazim (metil-1-benzimidazol-2-ilcarbamato) (CBZ) tem uso autorizado pela ANVISA para diferentes culturas, como algodão, soja e trigo (Brasil, 2011). Pertencente ao grupo dos benzimidazóis, fungicidas com atuação sistêmica de amplo espectro em fungos (Singh *et al.*, 2016). O CBZ é um composto considerado altamente persistente no ambiente (incluído na classe ambiental III – produto perigoso) e muito tóxico para organismos aquáticos e abelhas (classe toxicológica II – altamente tóxico), porém com baixa capacidade de bioacumulação (PAN, 2014; IBAMA, 2010). Apesar de possuir uma porção carbamato na molécula, o carbendazim não apresenta atividade como inibidor das colinesterases (O'Malley, 2010).

Atualmente, o carbendazim se destaca como um dos contaminantes ambientais mais utilizados, com alto potencial de lixiviação e escoamento para ecossistemas aquáticos e já sabe-se que este é capaz de promover efeitos prejudiciais aos animais (incluindo humanos), como alterações imunotóxicas e

---

desregulação endócrina (Silva *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2014 ; Rama *et al.*, 2014; Ludwikowska *et al.*, 2013; Rajeswary *et al.*, 2007).

De acordo com Gupta (2018), o carbendazim atua através da alteração da ligação da tubulina e da formação de microtúbulos, o que pode estar relacionado às alterações de desenvolvimento. Os microtúbulos são componentes do citoesqueleto de eucariotos e apresentam duas subunidades, a  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo que o carbendazim tem maior afinidade pela subunidade  $\beta$ , de forma que pode induzir à mutação por não disjunção cromossômica, inibição da mitose e morte celular (Nwani *et al.*, 2015; Hollomon *et al.*, 1997; Davidse, 1986). O carbendazim não tem concentração máxima prevista pela Resolução CONAMA 357/2005 para corpos de água, mas está contemplado na Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde, que determina a concentração máxima de  $120 \mu\text{g L}^{-1}$  e foi mantido pela Portaria de Consolidação nº5 (2017) (Brasil, 2017; Brasil, 2011).

Estudos já têm demonstrado a presença do carbendazim em águas superficiais, em diferentes regiões brasileiras, como em diferentes regiões de São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (Starling *et al.*, 2019), na região de Londrina (PR) (Souza *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2019), o que reforça a importância do monitoramento dos efeitos nocivos que este composto pode provocar em organismos não alvo, principalmente para a comunidade aquática (Dores e De-Lamonica-Freire, 2001).

Alguns estudos já demonstram efeitos prejudiciais em peixes expostos ao CBZ, em diferentes concentrações e exposições. Estudos feitos com zebrafish (*Danio rerio*) expostos por 96 horas a este fungicida mostraram diversas anomalias de desenvolvimento e comportamentais, o que pode interferir diretamente na fase adulta dos animais expostos (Andrade *et al.*, 2016). Ludwikowska *et al.* (2013) também demonstraram que o carbendazim interfere na sobrevivência e sucesso da eclosão de

embriões de carpa da Prússia (*Carassius gibelio*). Jiang *et al.* (2014) sugerem que a exposição embrionária ao composto promove alteração na expressão de genes relacionados à apoptose, imunotoxicidade e desregulação endócrina em zebrafish.

O peixe nativo dulcícola *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), tem sido amplamente utilizado como modelo biológico para o estudo dos efeitos de diversos contaminantes, uma vez que se mostra sensível aos efeitos de diferentes agrotóxicos, como inseticidas e herbicidas e tem sua biologia e fisiologia conhecidas (Vieira *et al.*, 2019; Alvim e Martinez, 2019; Santos *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2018; Santos e Martinez, 2012; Modesto e Martinez, 2010; Langiano e Martinez, 2008).

Estudos desenvolvidos por Oliveira *et al.* (2015) em *Prochilodus costatus*, na Bacia do São Francisco, detectou o carbendazim em 38,9% dos peixes coletados, em amostras de músculo e vísceras, por LC-MS/MS. A CL<sub>50</sub> do carbendazim para peixes varia entre 0,36 a 5,5 mg L<sup>-1</sup> (Rebelo e Caldas, 2014), de forma que é considerado um composto extremamente tóxico para estes organismos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição de 24h ao CBZ, em concentrações subletais e avaliar os efeitos em biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e genotóxicos em diferentes órgãos do peixe *P. lineatus*, em concentrações próximas às previstas na legislação de potabilidade.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Desenho experimental

Exemplares de peixes juvenis da espécie *P. lineatus*, conhecido popularmente como curimba ou curimbatá, (n=24, peso médio 31,6 ±1,2 g; 13,7 ± 0,2 cm), fornecidos da piscicultura Schneider (Toledo, PR, Brasil), foram aclimatados durante cinco dias,

em tanques de 300 L, contendo água limpa desclorada e com aeração constante, com fotoperíodo de 12h:12h (claro/escuro). Durante o período de aclimação, a renovação de água ocorreu a cada 48 h, com fornecimento de ração comercial realizada antes da renovação, sendo suspensa em 24 h antes da montagem dos experimentos. Durante todo o período de experimento, houve o monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água ( $23^{\circ}\text{C} \pm 0,07$ ;  $\text{pH } 7,95 \pm 0,05$ ;  $120 \mu\text{S cm}^{-1} \pm 0,0$ ;  $6,97 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{O}_2$  dissolvido e  $83,09 \pm 3,3$  de %  $\text{O}_2$ ).

Após o período de aclimação, os peixes foram divididos em 4 grupos ( $n=6$  peixes/grupo) e mantidos em 2 aquários com 50 L de água desclorada para cada grupo. O grupo CTRL foi mantido apenas com água desclorada e os demais grupos foram expostos também a diferentes concentrações nominais de produto comercial *Derosal 500*®, a partir de uma solução estoque de  $5 \text{ g L}^{-1}$  (carbendazim  $500 \text{ g L}^{-1}$ , Bayer®), durante 24h, nas seguintes concentrações: 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ . No dia do experimento, as doses de *Derosal*® foram distribuídas sobre a água e misturadas, antes da inserção dos peixes.

Com o final do período de exposição, os animais foram anestesiados com benzocaína 0,5% ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ), pesados, medidos e posteriormente, o sangue foi retirado da veia caudal com o uso de seringas heparinizadas. Logo após, os animais foram mortos por secção medular para a retirada de fígado, brânquia, cérebro e músculo. Uma alíquota de sangue total foi utilizada para análises hematológicas e para a realização do ensaio do cometa. O restante do sangue foi centrifugado para separação do plasma, o qual foi armazenado em ultrafreezer ( $-72^{\circ}\text{C}$ ) para realização de análises de íons e glicose. Os órgãos foram então armazenados em ultrafreezer ( $-72^{\circ}\text{C}$ ) até a realização dos ensaios. Os procedimentos utilizados neste estudo foram autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de

Londrina (Protocolo n. 17279.2019.28).

Amostras de água foram coletadas em tubos falcon (50mL) imediatamente antes da inserção dos peixes no aquário para análises cromatográficas, mantidas sob refrigeração e enviadas no dia seguinte para o Laboratório de Química Ambiental da UNICAMP, para determinação da concentração do CBZ. Para a extração em fase sólida (SPE), foram utilizados 250 mL de amostra filtrada em membrana de nylon (0,22  $\mu\text{m}$  x 47 mm) e cartuchos para SPE com sorvente C-18 500 mg/3 mL. A eluição dos analitos foi realizada com 3 mL de metanol e 3 mL de acetonitrila, após foram evaporados em fluxo de nitrogênio ultra puro, com recuperação do composto de interesse com volume final de 1 mL em solução de água e metanol 70/30 (v/v). As análises cromatográficas foram realizadas em LC-MS/MS em cromatógrafo Agilent 1200 Series LC acoplado a espectrômetro de massas Agilent 6410, com fonte de ionização por electrospray (ESI) e analisador triplo quadrupolo e software MassHunter para controle e instrumentação de dados cromatográficos. A separação cromatográfica foi obtida a 30°C, com coluna da fase reversa Zorbax SB-C18 (2.1 x 30 mm, tamanho de partícula 3,5  $\mu\text{m}$ ). As análises cromatográficas foram realizadas de acordo com o método descrito por Montagner *et al.*, 2014.

## 2.2. Biomarcadores Fisiológicos

A partir de uma alíquota de sangue total, foi realizada a determinação do hematócrito (Hct), com uso de microcapilares de vidro heparinizados, centrifugados (1200 g, 7 min, em centrífuga Luguimac S.R.L, Modelo L5, Argentina), para realização de leitura em cartão padronizado, que determina a porcentagem de eritrócitos na amostra. A determinação da hemoglobina (Hb) foi realizada pelo método de cianeto de metahemoglobina, utilizando-se kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil), em

espectrofotômetro (Libra, S32, Biochrom, Reino Unido), a 540 nm. Outra alíquota de sangue (5  $\mu\text{L}$ ) foi diluída em solução tampão de formol citrato (1:200), para a contagem de eritrócitos (RBC), por  $\text{mm}^3$  de sangue, em câmara de Neubauer sob microscópio óptico. Para a mensuração dos índices hematimétricos e auxiliar na classificação da anemia quanto ao tamanho das hemácias e o teor de hemoglobina, calculou-se o VCM (Volume Corpuscular Médio), CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) e o HCM (Hemoglobina Celular Média). O VCM (fL) é obtido a partir da fórmula  $\text{Hct (\%)} \times 10/\text{He (milhões/ } \mu\text{L)}$ ; O CHCM (%) é obtido a partir de  $\text{Hb (g/dL)} \times 100/\text{Hct (\%)}$  e o HCM (pg) por  $\text{Hb (g/dL)} \times 10/\text{He (milhões/ } \mu\text{L)}$ .

A concentração de glicose foi determinada utilizando kit comercial colorimétrico (Doles Reagentes Ltda, Brasil), com base no método da glicose oxidase e leitura em espectrofotômetro (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA) à 550 nm. Do plasma ainda foram analisadas as concentrações de sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e Cloreto ( $\text{Cl}^-$ ). As concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram realizadas após diluição do plasma em água deionizada (1:100), com leitura em fotômetro de chama (DM-62, Digimed, Brasil). A concentração do cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) foi determinada com uso de kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil), pelo método do tiocianato de mercúrio, com leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

A atividade da anidrase carbônica (AC) foi realizada nos filamentos branquiais, de acordo com Vitale *et al.* (1999). As amostras foram homogeneizadas (1:10 m:v) em solução tampão (manitol 225 mM, sacarose 75mM, tris-base 10 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM, pH 7,4) e centrifugados (1000 g, 20 min, 4°C). A atividade da anidrase carbônica foi realizada com adição de água saturada com  $\text{CO}_2$  ao sobrenadante, sendo a enzima quantificada de acordo com a variação do pH, determinada por 20 segundos, com uso de pHmêtro (Jenway 3510, USA). A partir da

variação do pH ao longo do tempo, é gerada uma taxa de reação catalisada (TC) e de reação não catalisada (TNC), gerada pela ausência da amostra, da qual foi substituída pelo tampão e então obtêm-se uma inclinação da reta. A partir das duas medições, calcula-se a atividade da anidrase carbônica pela fórmula:  $AC = [TC/TNC].mg\ ptn^{-1}$ . A concentração da proteína para o cálculo da AC, também foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A concentração das proteínas foi realizada através do método de Bradford (1976), do qual se baseia na reação das proteínas da amostra com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, sendo a curva de calibração determinada com uso de soro de albumina bovina (BSA) e a absorbância lida em leitora de ELISA (Bio-Tek Instruments, ELX 800, USA) a 595 nm.

### 2.3. Biomarcadores Bioquímicos

Para análise dos biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo, as amostras de fígado armazenadas em ultrafreezer foram descongeladas, homogeneizadas (1:10 m:v) em solução tampão de fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), centrifugadas (20 min, 16000 g, 4°C) e a partir do sobrenadante, foram realizadas os ensaios bioquímicos.

O ensaio para a atividade da glutathione-S-transferase (GST) do fígado foi realizado a partir da complexação da glutathione reduzida (GSH) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), com leitura em espectrofotômetro a 340 nm (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA) e expressa em nmol CDNB conjugados  $min^{-1}mg$  de proteína<sup>-1</sup> (Keen *et al.*, 1976).

A concentração do tripeptídeo glutathione (GSH) foi determinada pela reação da glutathione com o substrato, através da reação dos grupamentos -SH com o

---

reagente de cor 5,5 ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), com formação do tiolato (TNB), quantificado em espectrofotômetro (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA) a 412 nm, de acordo com o método de Beutler *et al.* (1973).

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada através do método TBARS, por meio da quantificação de um de seus produtos, o malondialdeído, em espectrofotômetro de fluorescência (ex/em: 535/590) e a concentração de TBARS determinada através de uma curva padrão de malondialdeído (MDA) e a concentração expressa em nmol de MDA mg de proteína<sup>-1</sup> (Camejo *et al.*, 1998)

Os danos oxidativos em proteínas podem ser mensurados a partir da reação de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, com formação de dinitrofenil-hidrazonas, detectadas a 358-370 nm (Levine *et al.*, 2014). Para o ensaio, 200 µl do sobrenadante foram normalizados para 2 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína e adicionados em eppendorf e misturados com 500 µl de DNPH a 10 mM, preparado com HCl a 2M. O conteúdo foi agitado em vórtex por 5 minutos e incubados a 30°C por 90 minutos. Após essa etapa, foi realizada a precipitação de proteínas em 700 µl de TCA (28%) e a centrifugação a 9000 g por 10 minutos. Foi realizada a lavagem do *pellet* três vezes por ressuspensão (etanol/acetato de etila 1:1), homogeneização em vórtex e centrifugados. A solubilização das proteínas foi realizada com hidrocloreto de guanidina a 6M, centrifugadas a 9000 g por 5 minutos, de forma a retirar resíduos. Para o branco, não houve adição do DNPH. A expressão dos resultados se deu por nmol carbonilas por mg<sup>-1</sup> de proteína.

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi realizada utilizando tecido muscular e cerebral. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5; 1:10 m:v) e centrifugadas (16000 g, 20 min, 4°C), de acordo com o método de Ellman *et al.* (1961) e adaptado por Alves-Costa *et al.* (2007), com

---

leitura em microplacas a 415 nm (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA). A atividade da AChE (nmol DTNB.min<sup>-1</sup>.mg ptn<sup>-1</sup>) é determinada pela reação do iodeto de acetilcolina (9 nM) com ditionitrobenzoato (0,5 mM), um reagente de cor. A mensuração do produto de degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE após reação com o DTNB é feita com espectrofotômetro (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA) a cada 3 minutos, por 6 minutos, com atividade da enzima expressa em nmol DTNB.min.prot<sup>-1</sup>.

#### *2.4. Biomarcadores Genotóxicos*

Os biomarcadores genotóxicos foram avaliados pelo ensaio do cometa com eritrócitos (SINGH *et al.*, 1988 modificado por VIEIRA *et al.*, 2016). Os danos genotóxicos foram quantificados pela extensão da migração do DNA, com leitura de 100 nucleoides por lâminas e classificação visual em quatro classes, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA, sendo classe 0, nucleoides sem danos aparentes; classe 1, com comprimento da cauda menor do que o diâmetro do nucleoides; classe 2 aquelas com comprimento da cauda duas vezes maiores do que o diâmetro do nucleoides e por fim, classe 3, com comprimento de cauda três vezes maiores que o diâmetro do nucleoides. A partir desta classificação, determinou-se o valor de escore de danos ao DNA através da multiplicação do total de células para cada classe, pelo valor da classe, o que gera valores entre 0 a 300.

Os testes de micronúcleo (MN) e de alterações eritrocíticas nucleares (AENs), foram determinados a partir de uma gota de sangue em esfregaço em lâmina e posteriormente coradas com 20 µL de laranja de acridina (0,003%) e imediatamente analisadas em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000x, com contagem de 3000 eritrócitos para cada amostra. Durante a leitura, foram pesquisadas células com a presença de MN e AENs, sendo estas classificadas em núcleo lobulado,

segmentado ou em formato de rim, além de células binucleadas (Ueda et al, 1992).

### 2.5. Análises Estatísticas

Os resultados obtidos para cada tecido foram analisados com uso do software Sigma Plot. Inicialmente foram testados quanto à normalidade e homogeneidade da variância e em seguida, utilizou-se a análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguida de testes de comparação múltipla (teste de Student-Newman-Keuls ou Dunns), quando indicado, sendo consideradas as diferenças significativas cujo o  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Determinação de CBZ na água

As concentrações iniciais determinadas do CBZ na água se apresentam na Tabela 2.1, com taxa de recuperação variando entre 68 a 91% para os grupos.

Tabela 2.1. Concentração do fungicida CBZ, para os aquários controle (CTRL) e para as diferentes concentrações de Derosal 500® (5, 50 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Concentração de CBZ (LC-MS/MS)			
CTRL	CBZ5	CBZ50	CBZ500
0 $\mu\text{g L}^{-1}$	3,4 $\mu\text{g L}^{-1}$	33,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	454,5 $\mu\text{g L}^{-1}$

### 3.2. Biomarcadores Fisiológicos

Durante os experimentos, não houve mortalidade de peixes em nenhum tratamento experimental. Foi observada maior quantidade de muco na pele dos peixes expostos à maior concentração do CBZ.

De acordo com a análise de variância, houve diferença significativa para do hematócrito ( $p=0,033$ ;  $F=0,033$ ), sendo que o CTRL apresentou maior média, com

diminuição significativa nas maiores concentrações do CBZ. Para a concentração de hemoglobina ( $p=0,20$ ;  $F=1,48$ ), para os números de RBC ( $p=0,36$ ;  $F=0,603$ ) e para os valores de VCM ( $p=0,34$ ;  $H=10,09$ ) e HCM ( $p=0,32$ ;  $H=10,31$ ) não houve diferenças significativas, porém, houve diferenças entre o CHCM do grupo controle e grupos testados, com aumento dos valores ( $p<0,001$ ;  $H=37,07$ ) (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Parâmetros hematológicos de *P. lineatus*, sob condição controle (CTRL) ou expostos ao CBZ 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24h.

Parâmetros Hematológicos	CTRL	CBZ5	CBZ50	CBZ500
Hemoglobina ( $\text{mg.dL}^{-1}$ )	$16,1 \pm 1,04^a$	$13,71 \pm 1,11^a$	$13,26 \pm 1,80^a$	$11,7 \pm 1,08^a$
Hematócrito (%)	$37 \pm 2,10^a$	$35 \pm 1,90^a$	$32,6 \pm 2,20^b$	$28,1 \pm 1,70^b$
RBCs ( $\times 10^6 \text{ cel.mm}^3$ )	$1,6 \pm 0,11^a$	$1,4 \pm 0,03^a$	$1,31 \pm 0,15^a$	$1,38 \pm 0,12^a$
VCM (fL)	$226,98 \pm 17,44^a$	$201,73 \pm 19,98^a$	$196,30 \pm 13,65^a$	$177,95 \pm 9,90^a$
HCM (pg)	$11,26 \pm 0,80^a$	$10,41 \pm 0,35^a$	$10,28 \pm 1,49^a$	$9,13 \pm 0,77^a$
CHCM (%)	$33,09 \pm 1,22^a$	$48,41 \pm 4,96^b$	$51,91 \pm 2,68^b$	$55,66 \pm 3,89^b$

Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p<0,05$ ).

Com relação à concentração da glicose, foram observados valores maiores de concentração da glicose em CBZ 500 ( $p < 0,001$ ;  $H=22,74$ ), quando comparado ao grupo controle e todos os demais (Figura 3.1).

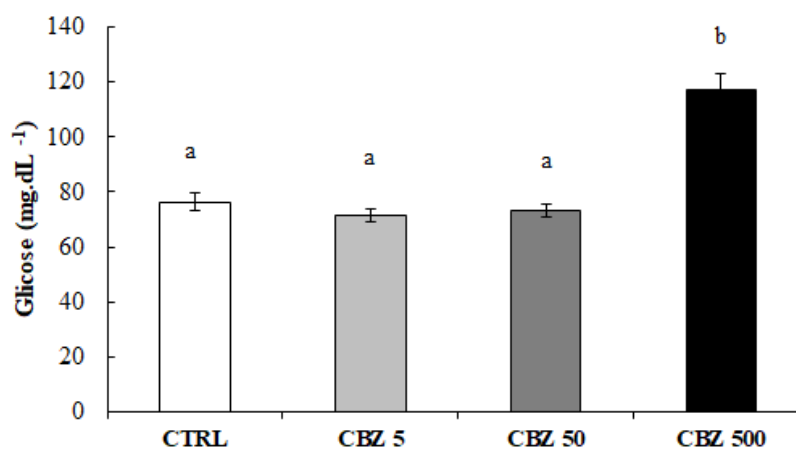


Figura 2.1. Concentração de glicose em plasma de *P. lineatus*, mantidos em situação controle e expostos ao carbendazim a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=10$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p<0,05$ ).

Houve aumento significativo para as concentrações de  $\text{Na}^+$  ( $p=0,001$ ), entre o CTRL e os grupos expostos ao CBZ. Para os parâmetros de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , não houveram diferenças significativas entre os grupos testados ( $p=0,69$  e  $p=0,32$ , respectivamente) (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Parâmetros fisiológicos de *P. lineatus*, sob condição controle (CTRL) ou expostos ao CBZ a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24h.

Íons plasmáticos	CTRL	CBZ5	CBZ50	CBZ500
$\text{Na}^+$ (mM)	149,9 $\pm$ 3,33 <sup>a</sup>	156,5 $\pm$ 2,46 <sup>b</sup>	175,0 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>	177,6 $\pm$ 6,6 <sup>b</sup>
$\text{K}^+$ (mM)	5,15 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	4,64 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	4,70 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	4,38 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>
$\text{Cl}^-$ (mM)	104,76 $\pm$ 2,39 <sup>a</sup>	105,54 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	113,79 $\pm$ 3,58 <sup>a</sup>	114,44 $\pm$ 3,19 <sup>a</sup>

Os dados representam a média  $\pm$ EP, n=6. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p<0,05$ ).

Não foram observadas diferenças ( $p=0,97$ ) na atividade da AC entre os animais do grupo CTRL e os grupos de exposição ao CBZ (Figura 2.2).

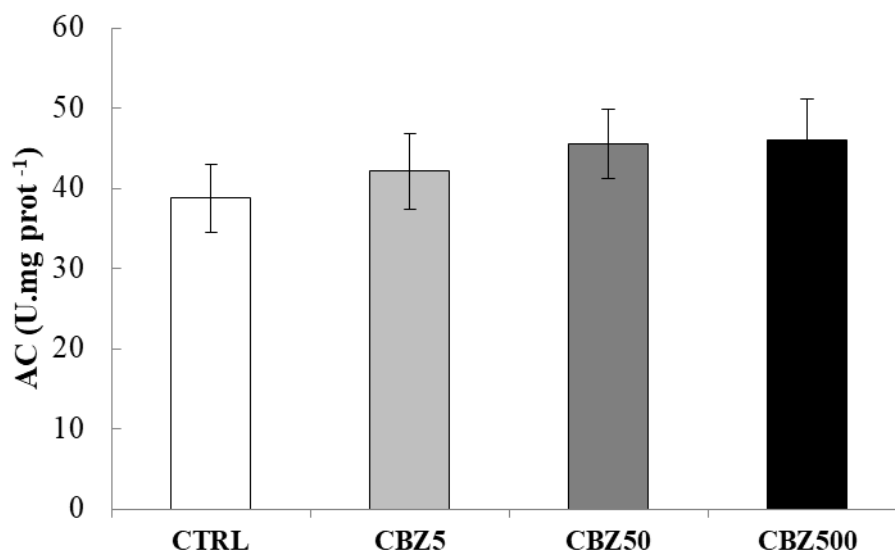


Figura 2.2. Atividade da anidrase carbônica (AC) de *P. lineatus* em situação controle (CTRL) e expostos ao carbendazim nas concentrações de 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24h. Não houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p=0,97$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP, n=6.

### 3.3. Biomarcadores bioquímicos

A exposição ao CBZ promoveu aumento na atividade da AChE no cérebro dos peixes expostos, nas três concentrações testadas ( $p=0,001$ ) (Figura 2.3 (A)). Já para a atividade da AChE no músculo, não foram observadas alterações significativas para a AChE ( $p=0,24$ ) (Figura 2.3 (B)).

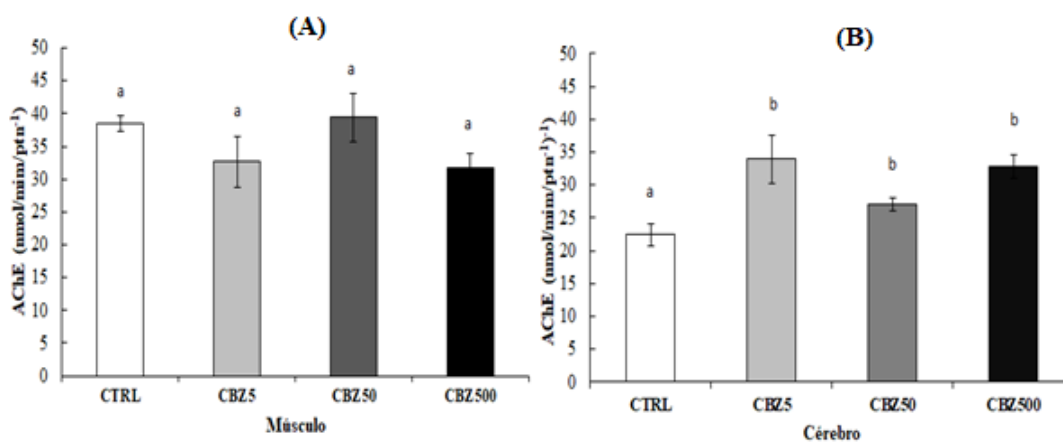


Figura 2.3. (A) Atividade da acetilcolinesterase em cérebro (A) e músculo (B) de *P. lineatus* sob condição controle (CTRL) ou expostos ao carbendazim, nas concentrações de 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos testados ( $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

A análise da GST hepática não demonstrou diferenças significativas entre o grupo CTRL e os grupos expostos ao CBZ ( $p=0,10$ ) (Figura 2.4).

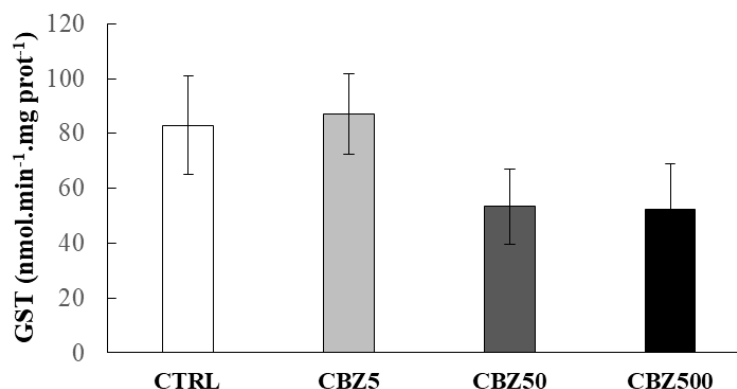


Figura 2.4. Atividade da glutatona-S-transferase (GST) em fígado de *P. lineatus*, em exposição controle (CTRL) ou expostos ao carbendazim a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h de exposição. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

Com relação à GSH hepática, houve aumento significativo ( $p=0,001$ ) entre o grupo exposto ao CBZ50 e CBZ500 em relação ao CTRL e CBZ5 (Figura 2.5).

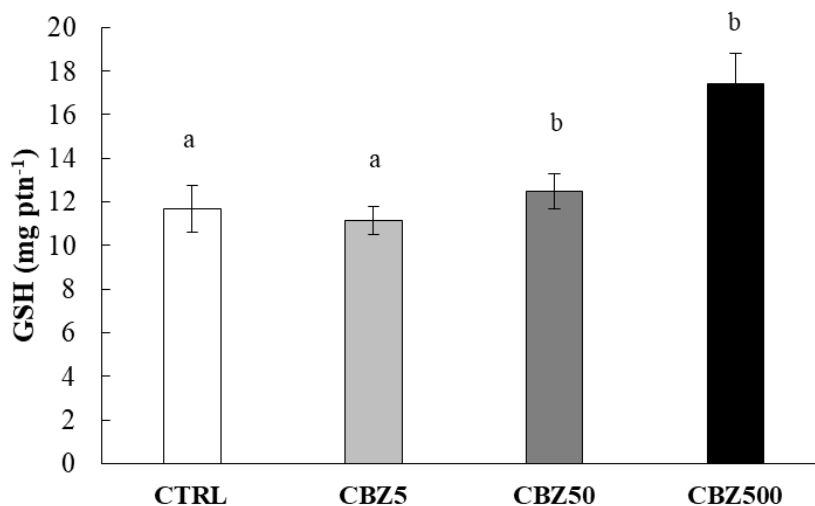


Figura 2.5. Concentração da glutatona (GSH) em fígado de *P. lineatus*, em exposição controle (CTRL) ou expostos ao carbendazim a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Houve diferença significativa entre os grupos, durante o período de exposição ( $p=0,001$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

Os peixes dos grupos CBZ50 e CBZ500 apresentaram valores de lipoperoxidação significativamente menores ( $p=0,049$ ), quando comparados ao CTRL (Figura 2.6).

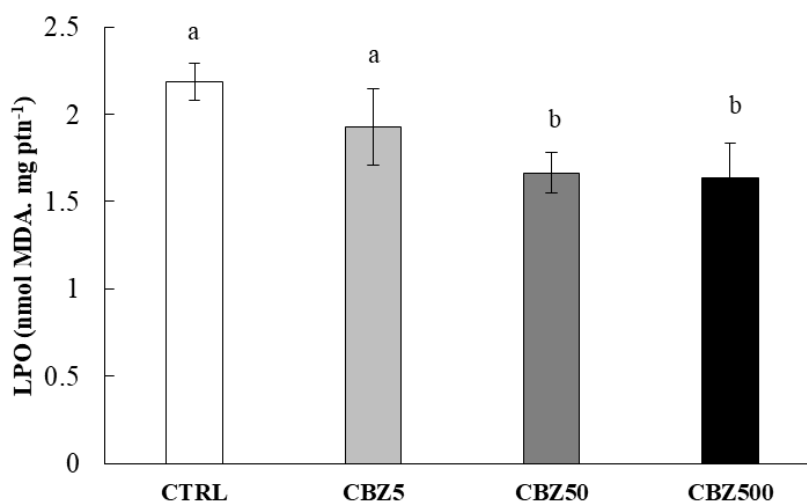


Figura 2.6. Lipoperoxidação (LPO) em fígado de *P. lineatus*, em exposição controle (CTRL) ou expostos ao carbendazim a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Houve diferença significativa entre os grupos, durante o período de exposição ( $p=0,049$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

Para os peixes expostos ao CBZ e comparados ao controle, não foi observada diferença estatística para as proteínas carboniladas ( $p=0,39$ ) (Figura 2.7).

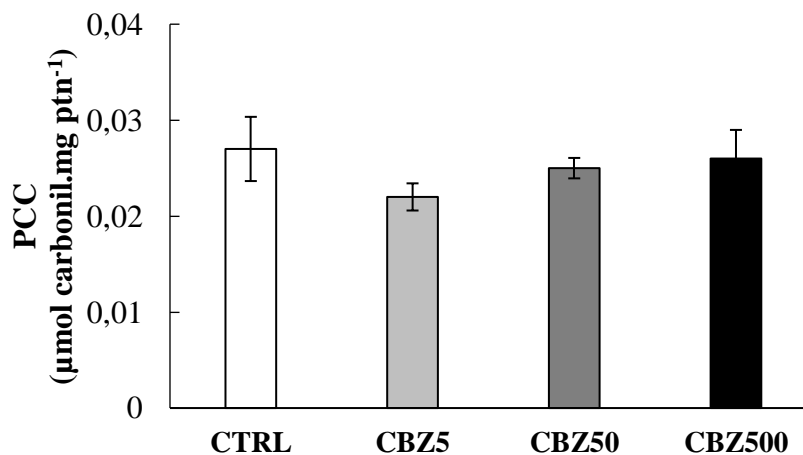


Figura 2.7. Níveis de proteínas carboniladas (PCC), em fígado de *P. lineatus*, em exposição de 24 h ao carbendazim, a 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500) µg L<sup>-1</sup>, durante 24h. Não houve diferença significativa entre os grupos, durante o período de exposição ( $p=0,39$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP, n=6

### 3.4. Biomarcadores genotóxicos

Durante o período de exposição, a exposição ao CBZ não promoveu alterações significativas no escore de danos ao DNA dos eritrócitos dos animais testados, quando comparados ao grupo controle ( $p=0,96$ ) (Figura 2.8).

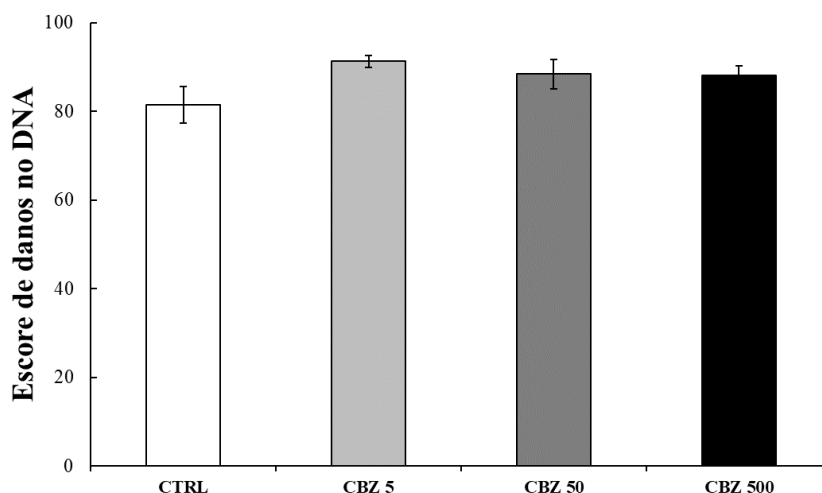


Figura 2.8. Escore de danos no DNA em hemácias de *P. lineatus* em situação controle (CTRL) e expostos ao carbendazim, nas concentrações de 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500) µg L<sup>-1</sup>, durante 24 h. Não houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p=0,96$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP, n=6.

No período experimental utilizado, não foi encontrada a presença de MN ( $p=1,0$ ) e não houve diferenças para a frequência de AENs ( $p=0,14$ ) (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Frequência de MN e AENs em hemácias de *P. lineatus* em situação controle (CTRL) e expostos ao carbendazim nas concentrações de 5 (CBZ5), 50 (CBZ50) e 500 (CBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Não houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p=0,14$ ).

	MN	N. SEGMENTADO	N. RIM	N. LOBULADO	BINUCLEADO
CTRL	0	9	13	0	0
CBZ5	0	8	4	0	0
CBZ50	0	18	9	2	0
CBZ500	0	11	3	7	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>46</b>	<b>29</b>	<b>9</b>	<b>0</b>

#### 4. DISCUSSÃO

Nossos resultados apontaram para a diminuição do hematócrito dos animais expostos CBZ, bem como a hiperglicemia e hipernatremia, o aumento da atividade da AChE no cérebro, diminuição de LPO e aumento de GSH, o que demonstra que mesmo em um curto período de exposição, o composto pode interferir em diversos biomarcadores.

Os resultados da concentração do CBZ na água mantiveram o gradiente de concentração estipulados para o trabalho, apesar dos valores quantificados terem sido menores do que os valores calculados para a exposição. Isso pode ter ocorrido devido à sedimentação do composto, uma vez que apresenta tendência de incorporação e baixa solubilidade (Da Costa *et al.*, 2018; IUPAC, 2016; Coutinho *et al.*, 2006; Cuppen *et al.*, 2000).

Os parâmetros hematológicos dos peixes testados foram afetados pela exposição aguda ao CBZ, uma vez que se observou diminuição nos valores de hematócrito, quando comparados ao grupo controle. Geralmente, em situação de estresse, há a liberação de catecolaminas, o que pode promover o aumento dos

parâmetros hematológicos devido a contração esplênica como forma de aumentar o fornecimento de oxigênio para os órgãos mais ativos, o que pode induzir ao aumento do hematócrito, RBC e hemoglobina em peixes (Wendelaar Bonga, 2011). Entretanto, a exposição ao CBZ neste estudo parece estar relacionada à hemólise devido à diminuição do hematócrito e aumento de CHCM.

Estudos desenvolvidos com a exposição de peixes bagres africanos (*Clarias gariepinus*) ao CBZ, em concentrações de 0,22 e 043 mg L<sup>-1</sup>, demonstraram diminuição significativa nos valores de RBC após 10 dias de exposição e aumento significativo nos valores de hemoglobina após 5 dias de exposição ao composto (Nwani *et al.*, 2015). Em *Oreochromis niloticus* expostos ao benomil, um dos metabólitos do CBZ, observou-se a diminuição no hematócrito, quando comparados ao controle em exposição de 400 µg L<sup>-1</sup> por 5 semanas, de forma que a diminuição no hematócrito pode ser indicativo de anemia, pela possível diminuição na hematopoiese ou por hemólise (Min e Kang, 2008). Ratos expostos ao ao benomil (200 mg kg<sup>-1</sup>) apresentaram diminuição dos valores de RBC, hemoglobina e hematócrito (Balkan e Aktaç, 2005). Patil *et al.* (2018) avaliaram possíveis efeitos hematológicos ocasionados pela exposição de ratos machos e observaram efeitos dose dependentes do CBZ (doses de 100, 200 e 400 mg kg<sup>-1</sup>, durante 28 dias), com diminuição de RBC, em decorrência de aumento da destruição dos eritrócitos, ou por interrupção da eritropoiese. Ainda em ratos, trabalhos sugerem que o CBZ pode induzir à diminuição (dose dependente) do número de hemácias, por prejuízo na capacidade eritropoiética em decorrência do estresse induzido pelo composto ou até mesmo por aumento na taxa de hemólise, o que pode levar a condições anêmicas (Zari e Al-Attar, 2011; Selmanoglu *et al.*, 2001).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, em 24h o CBZ poderia

---

ter induzido à hemólise nos animais testados, o que provocou a diminuição do hematócrito, apesar de que não foi observado o aumento de  $K^+$ . O aumento do sódio poderia estar relacionado com alterações na função da membrana, de forma que as células poderiam ter sofrido perda de água, diminuindo o seu tamanho, sem que ainda tivessem sido destruídas, o que pode ter interferido na captação do sódio pela hemácia, provocando o seu aumento no plasma. Portanto, o CBZ pode favorecer a hemólise, uma vez que em 24h de período experimental dificilmente seriam observados efeitos relacionados à diminuição da eritropoiese, como descrito em alguns trabalhos realizados em períodos maiores de exposição. É importante ressaltar que o aumento do CHCM, conforme há o aumento da concentração do CBZ é outro fator que sugere que o composto promove hemólise. As alterações morfológicas de RBC, poderiam ter sido melhor evidenciadas em esfregaço sanguíneo, para observação de hemácias crenadas ou pelo aumento de poiquilocitose.

A exposição ao CBZ, na maior concentração testada (CBZ 500), promoveu hiperglicemia nos peixes, o que pode indicar resposta de estresse fisiológico induzido pelo fungicida. A hiperglicemia é causada em decorrência do aumento da glicogenólise hepática, para suprir o aumento da demanda energética durante o período estresse. Juntamente com a ativação simpática, há efeitos no eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, que respondem aumentando as concentrações de cortisol, o que aumenta a mobilização energética para a resposta de luta e fuga. De forma semelhante, *Clarias gariepinus* expostos ao CBZ também demonstraram aumento significativo da glicose em concentrações de 0,22 e 0,43 mg L<sup>-1</sup>, quando comparados ao grupo controle (Nwani *et al.*, 2015). Outros trabalhos realizados em peixes demonstram que a hiperglicemia pode ser atribuída ao estresse fisiológico causado por agrotóxicos (Yekeen *et al.*, 2013; Min e Kang, 2008). Já se observou que

ratos expostos em concentrações subletais ao CBZ apresentaram menor disponibilidade de insulina, devido à inibição a glicogenólise (Zari e Al-Attar, 2011; Selmanoglu, *et al.*, 2001).

A AC é uma metaloenzima, presente nas células branquiais de peixes, que promove hidratação do CO<sub>2</sub>, com formação de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e H<sup>+</sup>, sendo fundamental para regulação da respiração e do equilíbrio ácido básico (Shekh *et al.* 2012; Evans *et al.*, 2005), mas nosso trabalho não mostrou alterações na função desta enzima, o que sugere que em 24h não houve alteração no tecido branquial, ou que essa resposta não foi evidente no período.

A atividade da AChE é amplamente utilizada para avaliar a atividade nervosa, uma vez que diversos agrotóxicos promovem a sua inibição e ocasionam hiperestimulação dos receptores pós-sinápticos da acetilcolina (Vieira *et al.*, 2014; Vieira e Martinez, 2008;). Apesar de possuir um grupamento carbamato na molécula, os quais são conhecidos por promover inibição da atividade da AChE, o CBZ tem se mostrado como indutor desta enzima, fato que foi percebido em todas as concentrações desta enzima de cérebro de *P. lineatus* expostos ao Derosal 500®, porém sem promover alterações na atividade desta enzima no músculo. É importante ressaltar que o aumento da AChE pode promover alterações importantes relacionadas à sobrevivência do peixe, como comportamento de luta ou fuga, reprodução e alimentação. Corroborando nosso resultado, em *Daphnia magna* expostas ao CBZ (5 µg L<sup>-1</sup>) em diversas gerações, percebeu-se também valores significativamente maiores da AChE do que nos organismos do grupo controle (Silva *et al.*, 2019).

Alguns autores sugerem que a AChE está envolvida em outros processos fisiológicos, como na indução da apoptose. Jiang *et al* (2014) desenvolveram estudos em *Danio rerio* em diversas concentrações (4, 20, 100 e 500 µg L<sup>-1</sup>) para avaliar como

o CBZ induz a apoptose e observou-se que o fungicida provoca alterações significativas na expressão de diversos genes envolvidos neste processo, com maior expressão destes genes na maior concentração ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Apesar do mecanismo não ser totalmente esclarecido, sugere-se também que a AChE atue na regulação da proliferação celular e da apoptose, uma vez que a acetilcolina (ACh) possui ação anti-inflamatória, através da supressão da produção de citocinas pró inflamatórias ativadas por macrófagos, linfócitos e outras células (Jiang *et al.*, 2008). Os inibidores da AChE podem atuar na diminuição da proliferação de linfócitos e das secreções destas citocinas, o que diminui a inflamação, pelo aumento da ACh na fenda sináptica. Já moléculas que possam atuar como indutoras da AChE, como o CBZ, podem atuar no estímulo das citocinas, o que pode culminar na ativação do processo inflamatório e conseqüentemente, na apoptose (Jiang *et al.*, 2015; Andrade *et al.* 2016; Jiang e Zhang, 2008; Gwilt *et al.*, 2007; Nizri *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002). Em contrapartida, a exposição de *Chanos chanos* a uma mistura de CBZ e clorpirifós demonstrou diminuição na atividade da AChE, quando comparados ao controle (Palanikumar *et al.*, 2014), provavelmente em decorrência de efeitos mais intensos relacionados ao organofosforado do que pelo CBZ.

A análise da atividade da GST e da concentração da GSH são amplamente utilizadas para avaliar a resposta antioxidante e ainda se esta via é usada pelos compostos para detoxificação, uma vez que autores sugerem que a atividade das GST pode não mostrar diferenças significativas em peixes, o que pode sugerir que a GST não atue na biotransformação do CBZ (Palanikumar *et al.*, 2014; Rajeswary *et al.*, 2007). Em *Oreochromis niloticus* expostos ao benomil, não houve aumento significativo na atividade das GST, em testes realizados com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  por 5 semanas de exposição, mas somente para as concentrações de 200 e  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  durante o

mesmo período (Min e Kang, 2008).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo endógeno, com importante função antioxidante não enzimática, a qual pode auxiliar na conjugação para inativar moléculas ou metabólitos reativos que poderiam se ligar a moléculas celulares, como o DNA. A GST é importante para a biotransformação e excreção de xenobióticos, de maneira que a depleção da glutathiona pode ser considerada um biomarcador de estresse oxidativo em peixes expostos a contaminantes e o aumento da GSH em CBZ50 e CBZ500 pode sugerir que houve resposta para combater o estresse oxidativo, provocado pelo fungicida.

A LPO pode ser considerada como indicador de danos oxidativos, principalmente em lipídios da membrana celular, após sequenciais lesões aos constituintes celulares. Uma vez que a LPO ocorre apenas quando os mecanismos antioxidantes não são eficazes, o resultado deste biomarcador pode ser associado aos resultados obtidos com a GSH, de forma que pode-se sugerir que o aumento da GSH foi suficiente para defesa antioxidante do organismo durante o período de exposição ou ainda, que tenha ocorrido LPO, porém sem o aumento do MDA. Em ratos expostos ao benomil, foi observada a diminuição da concentração da GSH e a indução da peroxidação lipídica (Baanks e Soliman, 1997). Alguns trabalhos descrevem que o CBZ pode induzir a lipoperoxidação, como demonstrado em *Chanos chanos* expostos ao composto durante 96h (Palanikumar *et al.*, 2014) e em ratos expostos por 48 dias, de forma que o composto também foi relacionado com prejuízos reprodutivos devido ao aumento no estresse oxidativo, interferência nos microtúbulos e consequente inibição da mitose (Rajeswary *et al.*, 2007).

O aumento da liberação de radicais livres pode resultar em formação de proteínas carboniladas, o que poderia resultar em desestruturação celular e de seus

---

transportes, bem como favorecer a apoptose (Vieira *et al.*, 2018 Andrade *et al.*, 2016; Swarzbacherová *et al.*, 2016; Coughlan *et al.*, 2015; Itziou *et al.*, 2011; Pilka *et al.*, 2009; Stadtman e Levine, 2006). Com relação à carbonilação de proteínas nos peixes testados, não houve diferenças significativas em comparação do grupo controle às diferentes concentrações do CBZ. Uma vez que trabalhos já demonstraram que o peixe apresenta sensibilidade a este biomarcador com outros agrotóxicos (Vieira *et al.*, 2018; Andrade *et al.*, 2016), possivelmente não observamos esta resposta devido ao período de exposição utilizado neste trabalho.

O CBZ pode levar a danos em lipídios e em proteínas celulares em tempos mais prolongados de exposição e maiores concentrações, de forma que resultem em apoptose ou a danos ao DNA. Nos *P. lineatus* expostos, não foi observado aumento nos danos ao DNA promovidos pelo CBZ, em relação ao controle, o que pode ser em decorrência do curto tempo de exposição utilizado neste trabalho e da resposta à peroxidação lipídica, uma vez que estudos de exposição contínua ao CBZ já demonstraram aumentos significativos de danos ao DNA. Pesquisas com efeitos do CBZ em *Daphnia magna*, em exposições multigeracionais, demonstraram que o CBZ foi capaz de induzir a danos ao DNA (Silva *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2015).

Palanikumar *et al.* (2014) observaram que o CBZ promove alterações nas atividades enzimáticas antioxidantes, o que pode favorecer ao surgimento de danos ao DNA. Pesquisas que evidenciam os efeitos apoptóticos do CBZ também relacionam que, em maiores tempos de exposição, os mecanismos regulatórios de apoptose podem ser afetados, o que poderia envolver danos ao DNA (Jiang *et al.*, 2014). Estudos desenvolvidos por Huan *et al.* (2016), a partir da exposição de minhocas *Eisenia foetida* ao CBZ por 21 dias, demonstraram que o composto

---

provocou danos ao DNA. Ainda, o CBZ quando associado a outros contaminantes, como o triclosan, demonstrou aumento mais significativo de danos ao DNA, conforme demonstrado por Silva *et al.* (2015).

De acordo com Nikinmma (2014), em peixes a formação de MN geralmente não ocorre em exposições agudas, uma vez que estas células podem ser encontradas na circulação a partir de 7 dias após a exposição. Nossos resultados demonstram que o CBZ nas concentrações testadas não foi capaz de induzir a formação de MN, nem de aumentar a frequência de AEN, o que pode ocorrer em períodos mais longos de exposição. O ensaio de MN é importante para avaliar os danos ao DNA em diversos tecidos, de forma que Al-Sabti e Metcalfe (1995) sugerem que a presença de MN tende a aumentar entre 1 a 5 dias de exposição. Estudos feitos com a exposição de eritrócitos de *C. chanos*, por 96h ao CBZ e de CBZ associado ao clorpirifós demonstraram o aumento da frequência de MN, o que sugere que os compostos associados são capazes de induzir a danos genotóxicos (Palanikumar *et al.*, 2014).

Desta forma, os resultados demonstram que o peixe *P. lineatus* pode ser sensível à exposição ao carbendazim, uma vez que demonstrou efeitos de toxicidade, mesmo em baixas concentrações, apesar de curto período de exposição. É importante ressaltar que apesar de poucas variações significativas com relação à toxicidade, resultados como estes podem sugerir que a espécie pode sim sofrer efeitos biológicos importantes com relação a sua capacidade de alimentação, comportamento, imunidade e reprodução em exposições com maior duração. Assim, nossos resultados demonstram a importância que demais efeitos da exposição ao CBZ em peixes sejam monitorados, uma vez que é um composto que tem se destacado como contaminante comum de águas superficiais.

## 5. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi demonstrado que a exposição aguda ao CBZ promoveu efeitos em *P. lineatus*, os quais foram evidentes na concentração máxima testada. As análises mostraram aumento da GSH, o que levou à proteção contra a peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e danos ao DNA. Estudos realizados por diversos autores demonstraram que os danos oxidativos podem ser percebidos em exposições mais longas ao CBZ. No entanto, as alterações observadas com relação ao aumento da AChE no cérebro reforçam a importância da avaliação da presença deste composto ao ambiente. Desta forma, é importante que mais estudos sejam realizados para avaliar a toxicidade do carbendazim e esclarecimento dos mecanismos que possam ser prejudiciais para organismos aquáticos.

## 6. REFERÊNCIAS

- Albuquerque, A. F.; Ribeiro, J. S.; Kummrow, F.; Nogueira, A. J. A; Montagner, C. C.; Umbuzeiro, G. A. 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v.7 (1).
- Almeida, M. B.; Madeira, T. B.; Watanabe, L. S.; Meletti, P. C.; Nixdorf, S. L. 2018. Pesticide determination in water samples from a rural área by multi-target method applying Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30 (8), 1657-1666.
- Alves-Costa, J. R. M.; Mela, M.; Assis, H. C. D. S.; Pelletier, E.; Randi, M. A.; Oliveira Ribeiro, C. A. 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67 (1), 82-88.

- Alvim, T. T.; Martinez, C. B. R. 2019. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 85-93.
- Al-Sabti, K.; Metcalfe, C. D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/ Genetic Toxicology*, 343 (2-3), 121-135.
- Andrade, T. S.; Henriques, J. F.; Almeida, A. R.; Machado, A. L.; Koba, O.; Giang, P. T.; Soares, A. M. V. M.; Domingues, I. 2016. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 170, 390-399.
- Balkan, S.; Aktaç, T. 2005. Study on the liver functions in rats exposed to benomyl. *Journal of Biological Sciences*, 5 (5), 666-669.
- Brasil. 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ato nº49, de 19 de julho de 2019. Autoriza o uso de produtos agrotóxicos à base de Thiram. *Diário Oficial da União, Brasília*.
- Brasil. 2017. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação n.5, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas para as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial da União, Brasília*.
- Brasil. 2011. Ministério da Saúde, Portaria n.2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos para controle e de vigilância da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*.
- Brasil. 2005. Ministério da Saúde. Resolução CONAMA n.357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de

lançamento de efluentes e outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 18 mar.

Beutler, E.; Duron, O.; Kelly, B. M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-888.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.

Camejo, G.; Wallin, B. Enojarvi, M. 1998. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. *Free radical and antioxidant protocols*. Humana Press, 377-387.

Colin, N.; Porte, C.; Fernandes, D.; Barata, c.; Padrós, F.; Carrassón, M.; Monroy, M.; Cano-Rocabayera, O.; Sostoa, A.; Pina, B.; Maceda-Veiga, A. 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of Total Environmental*, 540, 307-323.

Costa, M. B. B.; Souza, M.; Muller Junior, V.; Comin, J. J.; Lovato, P. E. 2016. Agroecology development in Brazil between 1970 and 2015. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 41 (3), 276-295.

Coutinho, C. B.; Galli, A.; Mazo, L. H.; Machado, S. A. S. 2006. Carbendazim e o meio ambiente: Degradação e Toxidez. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 16, 63-70, jan.dez.

Cuppen, J. G. M.; Van den Brink, P.; Camps, E.; Uil, K. F.; Brock, T. C. M. 2000. Impact of the pesticide carbendazim in freshwater microcosms. I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. *Aquatic Toxicology*, 48, 233-250.

- Davidse, L. C. 1986. Benzimidazole Fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annual Review of Phytopathology*, 24, 43-65.
- Da Costa, E. P.; Bottrel, S. E. C.; Starling, M. C. V. M.; Leão, M. M. D.; Amorim, C. C. 2018. Degradation of carbendazim in water via photo-Fenton in Raceway Pond Reactor: assessment of acute toxicity and transformation products. *Environmental Science and Pollution Research*, 26 (5) 4324-4336.
- Depledge, M. H. 2009. Novel approaches and Technologies in pollution assessment and monitoring: a UK perspective. *Ocean & Coastal Management*, 52, 336-341.
- Dores, E. F. G.; De-Lamonica Freire, E. M. 2001. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de Caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. *Revista Química nova*, São Paulo, 24 (1), 27-36.
- Evans, D. H.; Piermarini, P. M.; Choe, K. P. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85 (1), 97-177.
- Forbes, V. E.; Palmqvist, A.; Bach, L. 2006. The use and misuse of biomarkers in toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 272-280.
- Gupta, P. K. 2018. Toxicity of fungicides. In: Gupta, R. C. *Veterinary Toxicology*. 3 ed. Science Direct, 569-580.
- Gwilt, C. R.; Donnelly, L. E.; Rogers, D. F. 2007. The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacology & Therapeutics*, 115 (2), 208-222.
- Hollomon, D. W.; Butter, J. A.; Kendall, S. J. 1997. Mechanism of resistance to

Fungicidas. In: Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals. Chemistry of Plant Protection, 13, Springer, Berlin, Heidelberg.

Huan, Z.; Luo, J.; Xie, D. 2016. Acute toxicity and genotoxicity of carbendazim, main impurities and metabolite to Earthworms (*Eisenia foetida*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 96 (1), 62-69.

IBAMA. 2009. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Disponível em: [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade\\_Ambiental/produtos\\_agrototoxicos\\_comercializados\\_brasil\\_2009.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrototoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf)>. Acesso em 27 mai 2019.

Itziou, A.; Kaloyianni, M.; Dimiatriadis, V. K. 2011. Effects of organic contaminants in reactive oxygen species, protein carbonylation and DNA damage on digestive gland and haemolymph of land snails. Chemosphere, 85, 1101-1007.

IUPAC. 2016. Carbendazim. Disponível em <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/116.htm>>. Acesso em 14 set. 2019.

Kaptaner, B.; Kankaya, E.; Dogan, A.; Çelik, I. 2014. Histopathology and oxidative stress in the liver of *Chalcalburnus tarichi* living in lake Van, Turkey. Life Science Journal, 11 (8).

Karlsson, I.; Friberg, H.; Steinberg, C.; Persson, P. 2014. Fungicide effects of fungal community composition in the wheat phyllosphere. Plos One, 9 (11), 01-12.

Janz, D. M. 2013. Biomarkers in Fish Ecotoxicology, Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. Berlin: Féraud, J & C. Claise (Eds), 2013.

Jiang, J.; Wu, S.; Wang, Y.; An, X.; Cai, L.; Zhao, X.; Wu, C. 2015. Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine

- disruption during zebrafish larvae development. *Toxicology in Vitro*, 29, 1473-1481.
- Jiang, J.; Wu, S.; Wu, C.; An, X.; Cai, L. 2014. Embryonic exposure to carbendazim induces the transcription of genes related to apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 41, 493-500.
- Jiang, H.; Zhang, X. J. 2008. Acetylcholinesterase and apoptosis – A novel perspective for an old enzyme. *FEBS Journal*, 275, 612-617.
- Langiano, V. C.; Martinez, C. B. R. 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147 (2), 222-231.
- Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Aamici, A.; Climent, I.; Lenz, A. G.; ... & Stadtman, E. R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: *Methods in enzymology*, 186, 464-478.
- Ludwikowska, A.; Bojarski, B.; Socha, M.; Lutnika, H.; Trzeciak, K. B. 2013. The effect of carbendazim on embryonic Prussian carp (*Carassius gibelio*) development and hatching. *Archives of Polish Fisheries*, 21 (4), 367-371.
- Min, E. Y.; Kang, J. C. 2008. Effect of waterborne benomyl on the hematological and antioxidant parameters of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92, 138-143.
- Modesto, K. A.; Martinez, C. B. R. 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81 (6), 781-787.

- Montagner, C. C.; Sodr , F. F.; Acayaba, R. D.; Vidal, C.; Campestrini, I.; Locatelli, M. A.; Pescara, I. C.; Albuquerque, A. F.; Umbuzeiro, G. A.; Jardim, W. F. 2019. Ten years-snapshot of the occurrence of emerging contaminants in drinking, surface and ground waters and wastewaters from São Paulo State, Brazil. *Journal Brazilian Chemistry Society*, v.30, n.3, 614-632.
- Montagner, C. C.; Vidal, C. Acayaba, R. D.; Jardim, W. C.; Umbuzeiro, G. A. 2014. Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking water from the State of São Paulo (Brazil). *Royal Society of Chemistry*.
- Nwani, C. D.; Omah, M. C.; Ivoke, N.; Nwamba, H. O.; Ani, C.; Ogbonna, S. U. 2015. Biochemical, haematological and morphological variations in juvenile *Clarias gariepinus* exposed to Carbendazim fungicide. *African Journal of Aquatic Science*. 40 (1), 63-71.
- Nizri, E.; Hamra-Amitay, Y.; Sicsic, C.; Lavon, I.; Brenner, T. 2006. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation? A new role for acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacology*, 50 (5), 540-547.
- Selmanoglu, G.; Barlas, N.; Songur, S.; Kochaya, E. A. 2001. Carbendazim induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. *Human & Experimental Toxicology*, 20, 625-630.
- Shekh, A. Y.; Krishnamurthi, K.; Mudliar, S. N.; Yadav, R. R.; Fulkr, A. B.; Devi, S. S.; Chakrabarti, T. 2012. Recent advancements in carbonic anhydrase – Driven processes for CO<sub>2</sub> sequestration: Minireview. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42 (14), 1419-1440.
- Oliveira, F. A.; Reis, L. P. G.; Soto-Blanco, B.; Melo, M. M. 2015. Pesticides residues

- in the *Prochilodus costatus* (Valenciennes, 1850) fish caught in the São Francisco River, Brazil. *Journal of Environmental Science and Health*, 50, 398-405.
- Oost, R. V. D.; Beyer, J; Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.
- O'Malley, M. 2010. The Regulatory Evaluation of the Skin Effects of Pesticides. In: Krieger, R. Hayes' *Handbook of Pesticide Toxicology*. 3 ed. Science Direct, 701-787, 2010.
- Palanikumar, L.; Kumaraguru, A. K.; Ramakritinam, C. M.; Anand, M. 2012. Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75 (1), 187-197.
- PAN. Pesticide Action Network Europe. Carbendazim. Disponível em: <<https://www.pan-europe.info/old/Resources/Factsheets/PANE%20-%202014%20-%20Factsheet%20carbendazim%202014.pdf>>. Acesso em 13 jun. 2019.
- Patil, N. V.; Lonare, M. K.; Sharma, M.; Lalhriatpuia, P. C.; Saini, S. P. S.; Rampal, S. 2018. Hemato-Biochemical Alterations Mediated by Carbendazim Exposure and Protective Effects of Quercetin in Male Rats. *Toxicology International*, 25 (1), 7-18.
- Pilka, E. S.; Niesen, F. H.; Lee, W. H.; El-Hawari, Y.; Dunford, J. E.; Kochan, G.; Wsol, V.; Martin, H. J.; Maser, E.; Oppermann, U. 2009. Structural basis for substrate specificity in Human Monomeric Carbonyl Reductases. *Plos One*, 4 (10), 1-10.
- Puymirat, A.; Etongue-Mayer, P.; Dussalt, J. H. 1995. Thyroid hormones stabilize

acetylcholinesterase mRNA in Neuro-2A cells that overexpress the 1 thyroid receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 30651-30656.

Rama, E. M.; Bortolan, S.; Vieira, M. L.; Gerardin, D. C. C.; Moreira, E. G. 2014. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69, 476-486.

Rajeswary, S.; Kumaran, B.; Ilangovan, R.; Yuvaraj, S.; Sridhar, M.; Venkataraman, P.; Srinivasan, N.; Aruldas, M. M. 2007. Modulation of antioxidante defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats. *Reproductive Toxicology*, 24, 371-380.

Rebelo, R. M.; Caldas, E. D. 2014. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. *Revista Química Nova*, 37 (7), 1199-1208.

Regueiro, J.; Olguin, N.; Silam-Gándara, J.; Suñol, C. 2015. Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultured cortical neurons. *Environmental Research*, 140, 37-44.

Sakr, S. A.; Shalaby, S. 2012. Carbendazim-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats: ameliorative effect of licorine aqueous extract. *Toxicology and Industrial Health*, 30 (3).

Santos, T. G.; Martinez, C. B. 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, 89 (9), 1118-1125.

Santos, C.; Oliveira, M. T.; Cólus, I. M. S.; Sofia, S. H.; Martinez, C. B. R. 2018. Expression of cyp1a induced by benzo(A)pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 61, 30-37.

- Scharbacherová, V.; Wnuk, M.; Lewinska, A.; Potocki, L.; Zebrowski, J.; Kozirowski, M.; Holecková, B.; Siviková, K.; Dianovský, J. 2016. Evaluation of cytotoxic and genotoxic activity of fungicide formulation Tango Super® in bovine lymphocytes.
- Selmanoglu, G.; Barlas, N.; Songur, S.; Koçkaya, E. A. 2001. Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. *Human & Experimental Toxicology*, 20, 625-630.
- Silva, A. R. R.; Santos, C.; Ferreira, N. G. C.; Morgado, R.; Cardoso, D. N.; Cruz, A.; Mendo, S.; Soares, A. M. V. M.; Loureiro, S. 2019. Multigenerational effects of carbendazim in *Daphnia magna*: From a subcellular to a population level. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38, 412-422.
- Silva, A. R.; Cardoso, D. N.; Cruz, A.; Pestana, A. C.; Mendo, S.; Soares, A. M. V. M.; Loureiro, S. 2017. Multigenerational effects of Carbendazim in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36 (2), 383-394.
- Silva, A. R.; Cardoso, D. N.; Cruz, A.; Lourenço, J.; Mendo, S.; Soares, A. M. V. M.; Loureiro, S. 2015. Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 279-290.
- Singh, S.; Singh, N.; Kumar, V.; Datta, S.; Wani, A. B.; Singh, D.; Singh, K.; Singh, J. 2016. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. *Environmental Chemistry Letters*, v.14, 317-329.
- Souza, L. F. C. B.; Montagner, C. C.; Almeida, M. B. Kuroda, E. K.; Vidal, C.; Freire, R. L. 2019. Determination of pesticides in the source and drinking Waters in Londrina, Paraná, Brazil. *Semina Ciências Agrárias*, 40 (3), 1153-1164.
- Sposito, J. C. V.; Montagner, C. C.; Casado, M.; Navarro-Martín, M.; Solórzano, J. C.

- J.; Grisolia, A. B. 2019. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression. In zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*, 209, p.696-704.
- Starling, M. C., V. M.; Amorin, C. A.; Leão, M. M. D. 2019. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *Journal of Hazardous Materials*, 372, 17-36.
- Stadtman, E. R.; Levine, R. L. 2000. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899 (1), 191-208.
- Vieira, C. E. D.; Perez, M. R.; Acayaba, R. D. A.; Raimundo, C. C. M.; Dos Reis Martinez, C. B. 2018. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 195, 125-134.
- Vieira, C. E. D.; Costa, P. G.; Lunardelli, B.; Oliveira, L. F.; Cabrera, L. C.; Risso, W. E.; Primel, E. G.; Meletti, P. C.; Fillman, G.; Martinez, C. B. R. 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of Total Environment*, 542, 44-56.
- Vieira, C. E. D.; Almeida, M. S.; Galindo, B. A.; Pereira, L.; Martinez, C. B. R. 2014. *Neotropical Ichthyology*, 12 (1), 153-164.
- Vitale, A. M.; Montserrat, J. M.; Castilho, P.; Rodriguez, E. M. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapdidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122(1), 121-129.

- Wendelaar Bonga, S. E. 2011. Hormonal responses to stress. Encyclopedia of fish: fish physiology from genome to environment, 2, 1515-1523.
- Yekeen, T. A.; Fawole, O. O.; Bakare, A. A. 2013. Evaluation of toxic effects of lambda-cyhalothrin on the haematology and selected biochemical parameters of African catfish *Clarias gariepinus*. Zoology and Ecology, 23 (1), 45-52.
- Zari, T. A.; Al-Attar, A. M. 2011. Therapeutic effects of olive leaves extract on rats treated with a sublethal concentrations of carbendazim. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 15, 413-426.
- Zhang, X. J.; Yang, L.; Zhao, Q.; Caen, J. P.; He, H. Y.; Jin, Q. H.; Guo, L. H.; Alemany, M.; Zhang, L. Y.; Shi, Y. F. 2002. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. Cell Death & Differentiation, 9 (8),790-800.

## CAPÍTULO 3

---

**Avaliação dos efeitos da exposição aguda do teleósteo *Prochilodus lineatus* ao fungicida tebuconazol**

**Laura Fernanda Condota Borba de Souza; Cláudia Bueno dos Reis Martinez**

Manuscrito a ser submetido ao periódico para avaliação no Environmental  
Toxicology and Chemistry  
Normas disponíveis em:

<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal/15528618/author-guidelines>

## **Avaliação dos efeitos da exposição aguda do teleósteo *Prochilodus lineatus* ao fungicida tebuconazol**

Laura Fernanda Condota Borba de Souza<sup>1</sup>; Claudia Bueno dos Reis Martinez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

\* Autor correspondente:

Claudia Bueno dos Reis Martinez – Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, km380, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brasil, CEP 86057-970. Tel: +55 (43)3371-5146. Email: claudiabrmartinez@gmail.com; cbueno@uel.br.

Agradecimento: Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES – Código de Financiamento 001.)

Acessibilidade de dados: Dados e ferramentas de cálculos estão disponíveis através do autor correspondente (cbueno@uel.br)

### **RESUMO**

O fungicida tebuconazol (TBZ) tem ampla utilização global e tem sido detectado em diferentes corpos de água. No entanto, os efeitos que o TBZ pode promover em organismos aquáticos ainda são escassos. Neste contexto, avaliamos os efeitos agudos do TBZ em três concentrações diferentes (5, 50 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em exposição do peixe teleósteo *Prochilodus lineatus* durante 24h. Foram avaliados biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e genotóxicos em diferentes órgãos do peixe. A exposição

ao TBZ induziu o aumento de hematócrito e RBC, da glicemia e de íons plasmáticos, com diminuição da concentração de GSH e aumento da enzima GST hepática. A peroxidação lipídica foi observada em fígado dos peixes. Foi observado também o aumento da anidrase carbônica branquial. Além disso, foram observados aumentos aos danos de DNA de eritrócitos de peixes expostos em todas as concentrações do TBZ. Desta forma, nossos resultados demonstram que o fungicida provocou distúrbios hematológicos, osmorregulatórios, estresse oxidativo e danos ao DNA em *P. lineatus*, o que demonstra que a espécie é sensível aos efeitos adversos provocados pelo TBZ.

**Palavras-chave:** azóis, biomarcadores, estresse oxidativo

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de agrotóxicos para o controle de diversos tipos de pragas tem aumentado intensamente. Uma vez que o uso incorreto destes produtos pode provocar contaminação ambiental e, conseqüentemente, efeitos adversos a organismos, principalmente em exposições contínuas, o que representa uma ameaça para diferentes tipos de ecossistemas (Altenhofen *et al.*, 2017). Dentre os agrotóxicos com ampla utilização, destaca-se o tebuconazol (TBZ), fungicida da classe dos conazóis ou azóis, utilizado para controle de doenças fúngicas na agricultura que podem atacar diversos tipos de plantações, como arroz, soja, trigo e cana de açúcar, e em doenças humanas e animais (Kumar *et al.*, 2019).

Estudos têm demonstrado a presença do TBZ em corpos de água e no solo, bem como seus efeitos nocivos para organismos não alvo, sendo que foi demonstrado que o TBZ é altamente persistente no solo e que sua meia vida pode chegar até 600 dias (Cui *et al.*, 2018). Diversos trabalhos apontam a presença do TBZ como

---

contaminante de águas superficiais em áreas agrícolas e urbanas, em vários países, como na Índia (Ablilash e Singh, 2009), Alemanha (Berenzen *et al.*, 2005), Chile (Climent *et al.*, 2008), Argentina (DE Geronimo *et al.*, 2014) e Estados Unidos (Bradley *et al.*, 2017; Battaglin *et al.*, 2011). Apesar de ser considerado seguro pela OMS, atualmente, o TBZ é classificado como agente possível de risco aos fetos pela Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos, uma vez que alguns estudos *in vitro* e *in vivo* destacaram a possibilidade de o TBZ causar malformações quando há exposições a altas doses (UE, 2014).

Sabe-se que o TBZ tem seu efeito pela inibição da biossíntese do ergosterol através do bloqueio da lanosterol 14  $\alpha$ -desmetilase, pertencente a CYP51, o que ocasiona menor estabilidade da membrana, estresse oxidativo e peroxidação lipídica (Kumar *et al.*, 2019). O TBZ se liga ao grupo heme da proteína CYP51, promovendo alteração da função enzimática, o que pode afetar outras espécies, além dos fungos (Skollness *et al.*, 2013; Henry e Sisler, 1984). O ergosterol é um dos componentes mais importantes das membranas celulares em fungos, pois promove a estabilidade da membrana. Já em vertebrados, o CYP51 está relacionado com a biossíntese de esteroides, como os hormônios esteroidais e o colesterol (Espenshade e Hughes, 2007), de forma que os conazóis podem interferir na síntese destas substâncias, atuando como disruptor endócrino (Skolness *et al.*, 2013).

Os fungicidas azólicos interferem na função da enzima aromatase (CYP19A1), durante o período transcricional, o que pode prejudicar a biossíntese de hormônios e seus precursores, como estradiol, estrona, androstenediona e testosterona (Egbuta *et al.*, 2014; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Atualmente, trabalhos têm demonstrado que a exposição a esse fungicida e seus metabólitos pode estar relacionada à diversos tipos de tumores, como em testículos, na bexiga e fígado

de ratos expostos, bem como efeitos em peixes (Perkins *et al.*, 2013) e humanos (Mercadante *et al.*, 2014;).

Pesquisas realizadas observaram que o TBZ ocasionou menor taxa de crescimento, induziu ao estresse oxidativo e provocou maior metabolismo do glicogênio, em carpa comum (*Cyprinus carpio*) expostas (Toni *et al.*, 2011). Trabalhos realizados com o paulistinha *Danio rerio* demonstraram diversos efeitos adversos, como aumento do estresse oxidativo e peroxidação lipídica, alterações reprodutivas e danos ao DNA e aumento de micronúcleos nos eritrócitos (Li *et al.*, 2019; Castro *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2013). Ainda, outros autores demonstraram que a exposição ao TBZ promoveu alterações morfológicas e estruturais em brânquias de *Danio rerio* (Macirella *et al.*, 2019).

Assim, considerando-se que o TBZ já foi descrito como um contaminante comum de águas superficiais (Souza *et al.*, 2019) e que pode produzir efeitos a diversos organismos aquáticos, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos agudos (24h) de diferentes concentrações subletais de TBZ, em biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e genotóxicos, em diferentes órgãos do teleosteo de água doce *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecido como curimba. O uso desta espécie neotropical como modelo biológico em estudos toxicológicos é frequente, principalmente por ser sensível aos efeitos de contaminantes, bem como ter sua fisiologia conhecida (Vieira *et al.*, 2019; Alvim e Martinez, 2019; Santos *et al.*, 2018).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Desenho experimental**

Juvenis de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), obtidos de piscicultura da região (n=30, 13,5 ± 0,3 g; 10,2 ± 0,0), foram aclimatados durante sete dias em

tanques de 300 L, em água desclorada e aeração constante, com fotoperíodo 12:12h (claro/escuro). Os peixes foram alimentados com ração comercial antes da renovação de água, da qual foi realizada a cada 48h. A alimentação foi suspensa 24 h antes da montagem do experimento. Houve monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água durante o período experimental ( $22,35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,04$ ;  $\text{pH } 8,71 \pm 0,01$ ; condutividade  $90\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$ ;  $7,03 \pm 0,26\text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{O}_2$  dissolvido). Após o período de aclimação, os peixes foram distribuídos em 5 grupos ( $n=6$  peixes/grupo), em 2 aquários de 50 L de água desclorada para cada grupo. Um dos grupos foi colocado em condição controle apenas contendo água desclorada e limpa (CTRL), um grupo controle para o metanol (MeOH), com  $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  por aquário (5 mL por aquário), que foi utilizado para a dissolução do fungicida, foi colocado em água desclorada e limpa, com  $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  e os demais grupos foram expostos à diferentes concentrações de TBZ (Tebuconazole, 97,6%, ADAMA Brasil.), durante 24 h, nas concentrações de 5 (TBZ5), 50 (TBZ50) e 500 (TBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a partir de uma solução mãe ( $5\text{ g L}^{-1}$ ). No dia do experimento, foi realizada a diluição dos contaminantes na água dos aquários e misturadas, antes da inserção dos peixes.

Após 24h, os peixes foram anestesiados com benzocaína 0,5% ( $0,1\text{ g.L}^{-1}$ ), foram pesados e medidos. Após, foi realizada a coleta de sangue da veia caudal, com seringas heparinizadas e então, os animais foram eutanasiados por secção medular para retirada do fígado, cérebro e músculo. Para realização do ensaio do cometa, foi utilizado uma alíquota de sangue e outra alíquota foi separada para análises hematológicas. O restante do sangue foi centrifugado e utilizado para análises plasmáticas, como íons e glicose. As amostras foram mantidas em ultrafreezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) até a realização dos ensaios. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Protocolo n.

17279.2019.28).

## 2.2. Análise de Biomarcadores

A determinação do hematócrito (Hct) foi obtida com uma alíquota de sangue total, coletados em microcapilares heparinizados. Após a centrifugação (1200 g, 7 min, centrífuga Luguimac S. R. L., Modelo L5, Argentina), foi realizada a leitura em cartão padronizado para determinação da porcentagem de eritrócitos na amostra. Uma alíquota de sangue (5  $\mu$ L) foi diluída em solução tampão de formol citrato (1:200), para a quantificação do número de eritrócitos (RBC) em  $\text{mm}^3$  de sangue, lidas em câmara de Neubauer sob microscópio óptico. A concentração de hemoglobina (Hb) foi realizada pelo cianeto de metahemoglobina, com kit comercial (labtest Diagnóstica, Brasil), em espectrofotômetro (Libra, S32, Biochrom, Reino Unido), a 540 nm.

Para as análises plasmáticas, foram realizadas as concentrações de sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ). O plasma foi diluído em água deionizada (1:100), para leitura de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  em fotômetro de chama (DM-62, Digimed, Brasil). A concentração do  $\text{Cl}^-$  foi determinada pelo método de tiocianato de mercúrio, com uso de kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil) e leitura em espectrofotômetro a 490 nm (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA). A concentração da glicose foi obtida com uso de kit comercial colorimétrico (Labtest, Brasil), com uso do método da glicose oxidase e leitura em espectrofotômetro, à 550 nm (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA).

Os biomarcadores de estresse oxidativo foram obtidos a partir de amostras de fígado, músculo e cérebro mantidas em ultrafreezer até o momento da análise. Após descongelamento, as amostras foram homogeneizadas (10x volume) em solução tampão de fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0, centrifugadas (20 min, 16000 g, 4°C, 20 min.) e com o sobrenadante, foram realizados os ensaios bioquímicos.

As proteínas foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976), pela reação de proteínas da amostra com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, com curva de calibração determinada pelo uso de soro de albumina bovina (BSA) e a absorbância obtida pela leitura em ELISA (Bio-Tek Instruments, ELX 800, USA) a 595 nm.

A determinação da concentração do tripeptídeo glutathiona hepático (GSH) foi obtida pela reação da glutathiona com o substrato, pela reação dos grupamentos –SH com 5,5 ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) e formação do tiolato (TNB), quantificado em espectrofotômetro a 412 nm (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA) (Beutler *et al.*, 1973).

A atividade da glutathiona-S-transferase (GST) do fígado foi obtida com a complexação da GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e lida em espectrofotômetro a 340 nm (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA) e expressa em nmol CDNB conjugados a min<sup>-1</sup> mg de ptn<sup>-1</sup>, de acordo com o ensaio descrito por Keen *et al.*, 1976.

A determinação da peroxidação lipídica (LPO) hepática foi obtida a partir do método TBARS, com a quantificação do malondialdeído (Camejo *et al.*, 1998), pela adição de butilhidroxitolueno (BHT 1M) solução salina fosfatada (2 mM KCl; 1,4 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 357 mM NaCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4), ácido tricloroacético (TCA 50%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 1,3%), dissolvido em 0,3% NaOH ao sobrenadante. Após, a mistura foi mantida em estufa a 60°C durante 1h e então, foi realizada a leitura em fluorescência a 530 nm (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA), sendo a concentração de TBARS obtida a partir de curva padrão de malondialdeído (MDA) e concentração expressa em nmol de MDA.mg de proteína<sup>-1</sup>.

A partir de tecido muscular e cérebro, foi determinada a atividade da

acetilcolinesterase (AChE), após homogeneização em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5; 1:10 p/v) e centrifugação (16000 g, 20 min, 4°C) (Ellman *et al.*, 1961 adaptado por Alves-Costa, 2007). A atividade da AChE é realizada a partir da reação do iodeto de acetilcolina (9nM) com o reagente de cor ditionitrobenzoato (0,5 mM) e a partir da degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE, após a reação com o DTNB, é feita a leitura em espectrofotômetro (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA), a 415 nm, a cada 3 minutos, por 6 minutos, com atividade da enzima expressa em nmol DTNB.min.prot<sup>-1</sup>.

Para avaliação de biomarcadores genotóxicos, foi realizado o ensaio do cometa com eritrócitos (SINGH *et al.*, 1988 modificado por VIEIRA *et al.*, 2016). A determinação dos danos genotóxicos foi quantificada pela extensão da migração do DNA, com leitura de 100 nucleoides por lâminas e classificação visual em quatro classes, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA: classe 0, nucleoides sem danos aparentes; classe 1, comprimento da cauda menor do que o diâmetro do nucleoides; classe 2, com comprimento da cauda duas vezes maiores do que o diâmetro do nucleoides e classe 3, com comprimento de cauda três vezes maiores que o diâmetro do nucleoides. A partir desta classificação, determinou-se o valor de escore de danos ao DNA através da multiplicação do total de células para cada classe, pelo valor da classe, o que gera valores entre 0 a 300.

A análise da frequência de micronúcleo (MN) e demais alterações eritrocíticas nucleares (AENs) foi realizada segundo o protocolo descrito por Ueda *et al* (1992). Para a leitura, as lâminas foram coradas com 20 µL de laranja de acridina (0,003%) e imediatamente analisadas em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000x, com contagem de 3000 eritrócitos para cada peixe. Durante a leitura, foram observadas células com a presença de MN e AENs, sendo estas classificadas em

núcleo lobulado, segmentado ou em formato de rim, além de células binucleadas.

### 2.3. Análises Estatísticas

Após a verificação da normalidade e homocedasticidade, os resultados dos diferentes parâmetros obtidos para cada tratamento, foram comparados entre si (CTRL x MEOH x TBZ5 x TBZ50 x TBZ500) por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguido de teste de comparação múltipla (testes de Student Newman-Keuls ou Dunns, respectivamente) quando indicado. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas com auxílio do software Sigma Plot 11.0.

## 3. RESULTADOS

Os resultados dos parâmetros fisiológicos avaliados em *P. lineatus* expostos ao TBZ estão demonstrados na Figura 3.1. Com relação aos parâmetros hematológicos, em relação ao grupo controle, houve aumento significativo do hematócrito nos grupos testados ( $p < 0,001$ ,  $H=62,318$ ), bem como na contagem de RBCs ( $p < 0,001$ ,  $H=57,974$ ), porém não houve diferenças significativas para a hemoglobina ( $p=0,24$ ;  $H=17,261$ ).

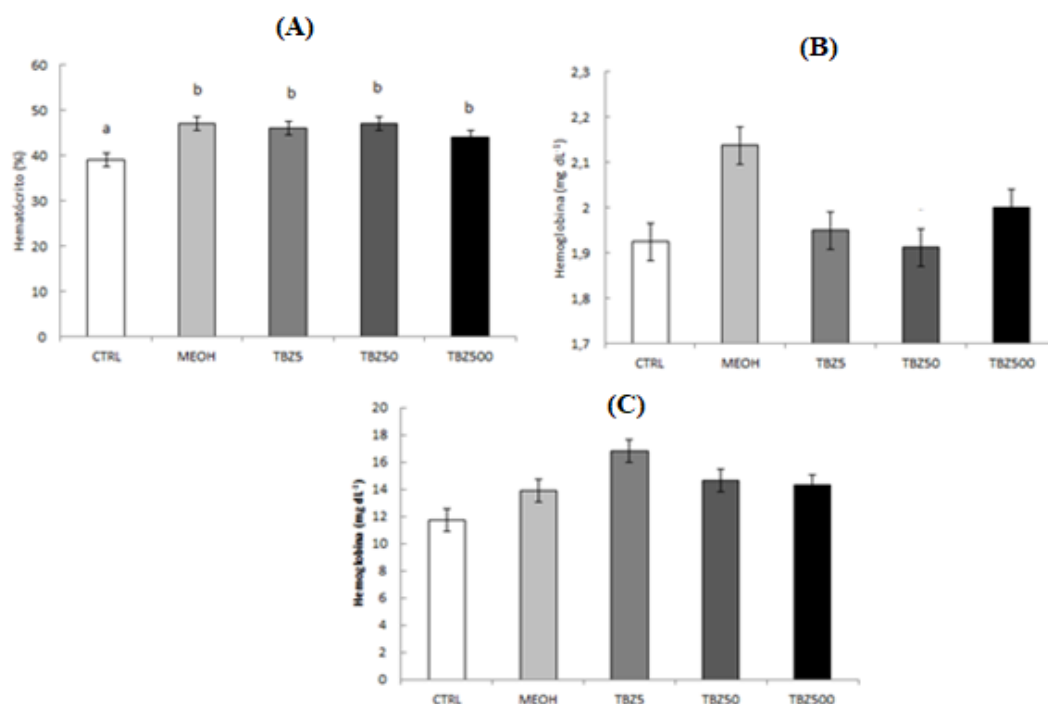


Figura 3.1. Resultados dos parâmetros hematológicos, (A) porcentagem de hematócrito, (B) concentração de hemoglobina e (C) número de eritrócitos de *P. lineatus*, expostos durante 24 h apenas à água (CTRL), ao solvente metanol (MEOH) ou ao tebuconazol nas concentrações de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ5), de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ50) e  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ500). Os dados representam a média,  $\pm\text{EP}$ ,  $n=6$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ,  $p=0,243$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

Para as concentrações iônicas, em relação ao grupo aumento na concentração de  $\text{Na}^+$  em TBZ50 ( $p=0,003$ ,  $F=7,334$ ). Pode-se observar aumento na concentração de  $\text{K}^+$  para TBZ50 e TBZ500 ( $p < 0,001$ ,  $H=19,543$ ) e redução para TBZ5. O aumento na glicemia foi observado nos grupos TBZ50 E TBZ500 ( $p < 0,001$ ,  $F=47,361$ ). Com relação ao cloreto, pode-se observar também o aumento na concentração nos grupos MEOH e todas as concentrações de TBZ ( $p < 0,001$ ,  $H=60,575$ ) (Figura 3.2).

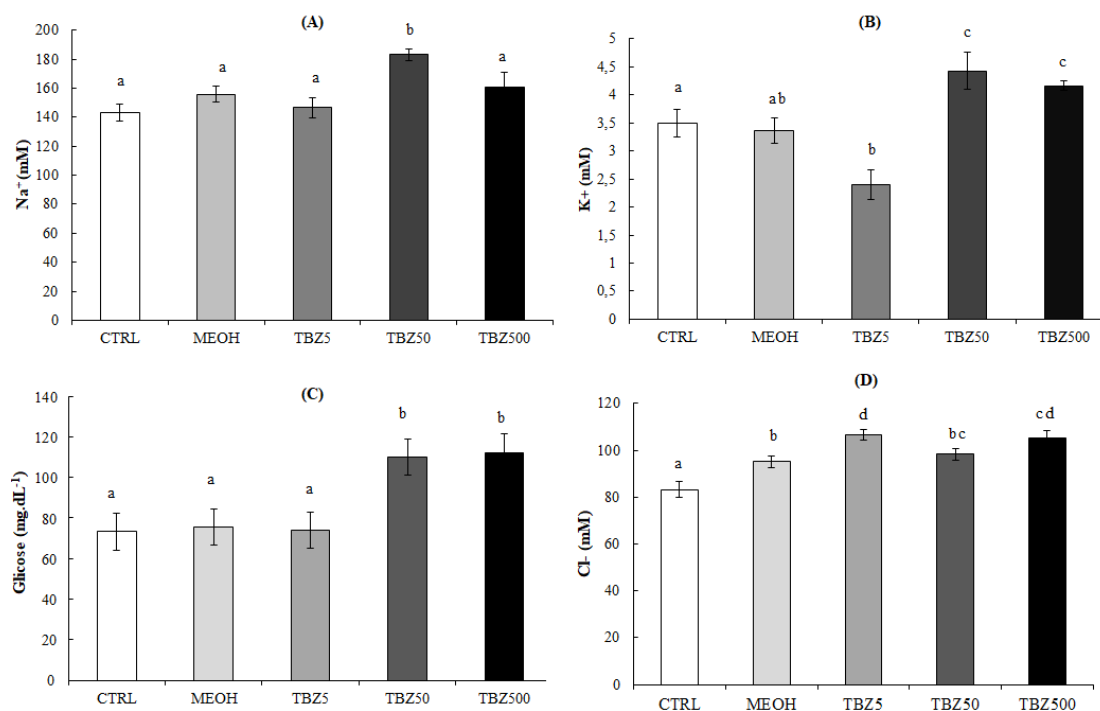


Figura 3.2. Concentrações plasmáticas de sódio (A), potássio (B), glicose (C) e cloreto (D) em *P. lineatus*, expostos durante 24 h apenas à água (CTRL), ao solvente metanol (MEOH) ou ao tebuconazol nas concentrações de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ5), de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ50), de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ500). Os dados representam a média,  $\pm$ EP,  $n=6$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,01$ )

Com relação ao CTRL, pode-se observar diminuição significativa do conteúdo de GSH hepático dos peixes expostos em todos os grupos ( $p < 0,001$ ,  $H=67,487$ ). Também pode-se observar que houve aumento significativo na atividade da GST nos animais para TBZ500 ( $p < 0,001$ ,  $H=46,291$ ), conforme demonstrado na Figura 3.3 (A) e (B), respectivamente.

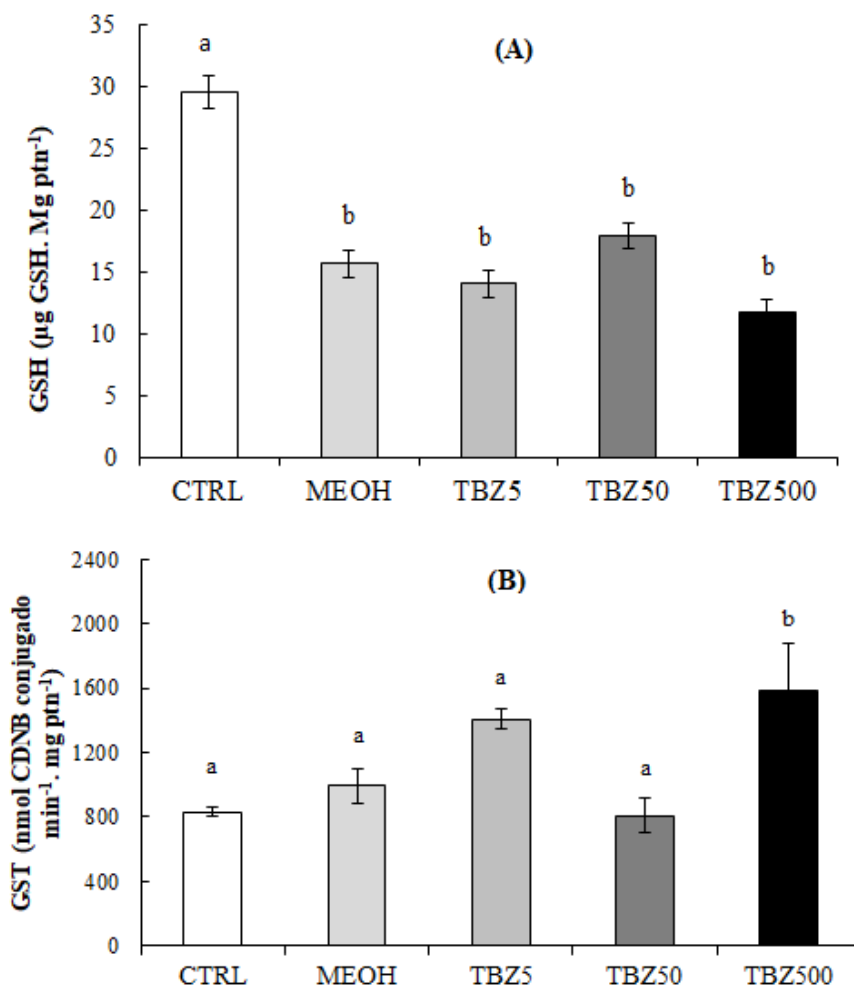


Figura 3.3. Concentração da glutatona (GSH) e glutatona-S-transferase (GST) em fígado de *P. lineatus*, expostos durante 24 h apenas à água (CTRL), ao solvente metanol (MEOH) ou ao tebuconazol nas concentrações de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ5),  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ50) e  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ500). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p=0,001$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

Em relação à ocorrência de dano oxidativo, verificou-se o aumento significativo de peroxidação lipídica nos fígados dos peixes dos grupos TBZ5 e TBZ50 ( $p=0,001$ ,  $H=35,303$ ), quando comparados ao grupo CTRL (Figura 3.4).

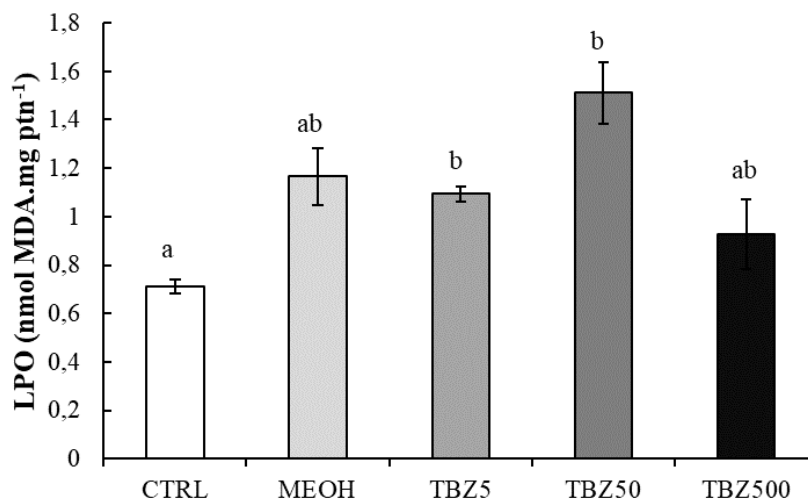


Figura 3.4. Lipoperoxidação (LPO) em fígado de *P. lineatus*, expostos durante 24 h apenas à água (CTRL), ao solvente metanol (MEOH) ou ao tebuconazol nas concentrações de 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ5), 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ50) e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ500). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p=0,001$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

A exposição ao MEOH e TBZ não promoveu alterações significativas na atividade da AChE no cérebro de peixes ( $p=0,12$ ,  $F=1,587$ ), porém, o grupo MEOH promoveu diminuição na atividade da AChE em músculo dos peixes expostos ( $p=0,009$ ,  $H=17,819$ ) (Figura 3.5 (A) e (B), respectivamente).

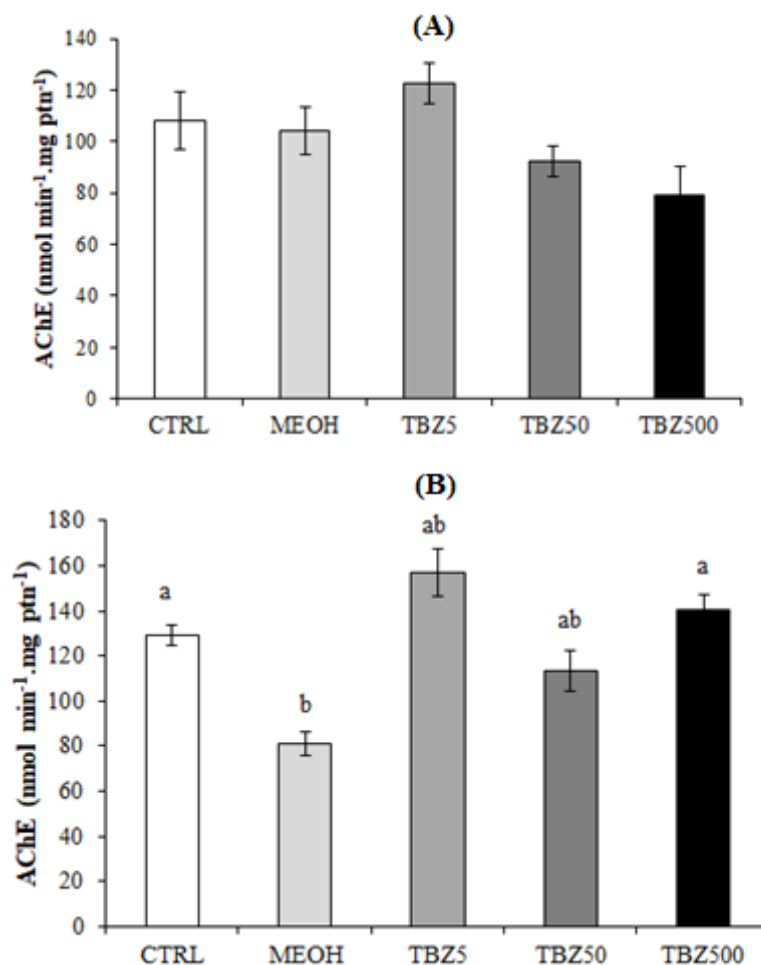


Figura 3.5. Atividade da acetilcolinesterase em cérebro (A) e músculo (B) de *P. lineatus*, expostos durante 24 h apenas à água (CTRL), ao solvente metanol (MEOH) ou ao tebuconazol nas concentrações de 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ5), de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ50) e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  (TBZ500). Os dados representam a média  $\pm$  EP, n=6.

De acordo com os resultados do teste do cometa, pode-se observar que tanto o MEOH quanto o TBZ em diferentes concentrações, foram capazes de promover o aumento de danos ao DNA de eritrócitos de *P. lineatus*, principalmente com o aumento de frequência de nucleoides classe 3 em TBZ500 ( $p < 0,001$ ,  $H = 28,881$ ), como demonstra a Figura 3.6.

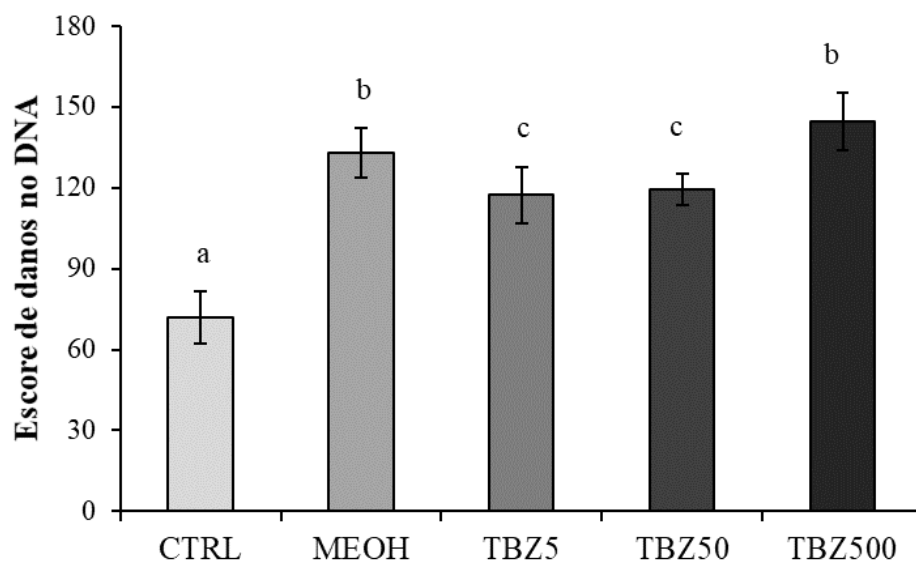


Figura 3.6. Escore de danos ao DNA de eritrócitos de *P. lineatus*, em exposição controle (CTRL) ou expostos ao MEOH ou TBZ a 5 (TBZ5), 50 (TBZ50) e 500 (TBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, durante o período de exposição ( $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

Para o período experimental, não foi observada a presença de MN para nenhum dos grupos estudados. Em relação à ocorrência de AEN, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $p=0,18$ ). Dentre as AEN observadas, a maior frequência foi de segmentados (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Frequência de AENs de eritrócitos de *P. lineatus*, em exposição controle (CTRL) ou expostos ao MEOH ou TBZ a 5 (TBZ5), 50 (TBZ50) e 500 (TBZ500)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , durante 24 h. Não houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p=0,18$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

	MN	N. SEGMENTADO	N. RIM	N. LOBULADO	BINUCLEADO
CTRL	0	2	2	0	0
MEOH		7	2	0	0
TBZ5	0	6	1	0	0
TBZ50	0	11		0	0
TBZ500	0	3	6	0	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>29</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que o peixe *P. lineatus* se mostra

sensível à exposição ao fungicida TBZ e ao solvente metanol, uma vez que foram observadas alterações em diferentes biomarcadores demonstraram que o MEOH e o TBZ são capazes de promover efeitos em *P. lineatus*, sendo que o TBZ pode promover estes efeitos, em diferentes concentrações. Apesar de ainda serem informações escassas, alguns autores já relataram diversos efeitos nocivos do TBZ provocados em diferentes espécies animais (Ferreira *et al.*, 2012; Toni *et al.*, 2011).

O metanol, utilizado como solvente neste trabalho, pode apresentar toxicidade em determinadas situações, com concentrações similares às usadas neste trabalho (Kaviraj *et al.*, 2004; Busby *et al.*, 1998) e embora alguns trabalhos sugiram que ele pode não interferir em resultados de ensaios ecotoxicológicos (Mezzelani *et al.*, 2016; Binelli, 2009), pudemos observar que houveram danos oxidativos resultantes da exposição ao metanol, e que mesmo em um curto período experimental, este solvente foi capaz de provocar resposta de estresse, danos oxidativos e ao DNA dos peixes testados. A toxicidade do solvente promoveu interferência em alguns dos nossos resultados, o que dificultou esclarecer se os efeitos adversos provocados foram em decorrência do TBZ ou se foram provocados pelo próprio solvente. A toxicidade do metanol pode ser variável entre as espécies e o período de exposição, mas que tende a aumentar quando há menor capacidade de metabolização (Kariraj *et al.*, 2004; Johlin *et al.*, 1987). Este trabalho demonstrou que o metanol pode provocar resposta de estresse, com aumento do hematócrito, aumento de Cl<sup>-</sup> e interferência no estresse oxidativo, como aumentando o consumo de GSH hepático e reduzindo a AChE em tecido muscular.

No entanto, apesar dos efeitos promovidos pelo solvente, pode-se perceber que a exposição ao TBZ foi capaz de alterar diversos biomarcadores, induzindo ao aumento da peroxidação lipídica em TBZ5 e TBZ50 e da GST em TBZ500, bem como

as alterações plasmáticas, como promoveu hipernatremia em TBZ50 e hipercalemia em TBZ50 e TBZ500.

Pode-se observar que os parâmetros fisiológicos foram alterados após a exposição ao MEOH e TBZ. Houve o aumento do hematócrito e RBCs para a exposição ao MEOH e TBZ500 e também hiperglicemia, fato que pode ser relacionado ao estresse ocasionado pelos contaminantes. Em situações estressantes, pode haver a liberação de catecolaminas, com consequente contração esplênica, o que pode resultar em aumento dos parâmetros hematológicos, como o hematócrito, hemoglobina e RBCs e maior oxigenação tecidual (Wenderlaar Bonga, 2011).

O aumento da glicose pode ser relacionado a uma estratégia fisiológica, para maior mobilização energética (Wenderlaar Bonga, 2011), fato que foi evidenciado em TBZ50 e TBZ500. Em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas ao TBZ durante 96h, demonstraram o aumento da glicemia em decorrência do aumento da necessidade energética (Toni *et al.*, 2011). O mesmo efeito foi observado em peixes zebra (*Danio rerio*) expostos ao TBZ por 96h, uma vez que o composto promoveu resposta de estresse e consequentemente, a hiperglicemia, sendo que o estresse pode estimular processos como lipólise ou proteólise, para melhorar a liberação energética obtidas a partir do metabolismo de lipídeos ou proteínas (Sancho *et al.*, 2010). Desta forma, o aumento do hematócrito e da glicose em *P. lineatus* demonstram que a exposição ao TBZ em diferentes concentrações, induziu os peixes a uma resposta de estresse.

A atividade da GST e a concentração de GSH são extremamente importantes para se mensurar os efeitos nas defesas antioxidantes que podem ocorrer em decorrência da exposição a contaminantes. Uma vez que a GSH tem papel fundamental na defesa antioxidante, este tripeptídeo endógeno auxilia na conjugação e inativação de xenobióticos tóxicos, principalmente através da remoção de radicais

---

livres formados nestes processos (Ferreira *et al.*, 2012) e a GST promove a detoxificação de produtos do estresse oxidativo (Nikinma, 2014). Nossos resultados apontaram que houve a diminuição da concentração da GSH para todas as concentrações testadas e o aumento da GST apenas em TBZ500, com consequente ativação da detoxificação promovida pelo organismo. No entanto, não podemos afirmar que o aumento no consumo da GSH nas diferentes concentrações testadas do TBZ seja pelo efeito do fungicida, uma vez que o grupo MEOH demonstrou a mesma resposta, porém os dados relacionados a esse tipo de resposta são escassos na literatura, mas sabe-se que o solvente ao ser metabolizado no fígado, é convertido em ácido formaldeído ou fórmico, o que já foi descrito como causador de intoxicação em peixes, o que poderia ocorrer em decorrência de menor defesa antioxidante (Kaviraj *et al.*, 2004).

Juntamente com as respostas relacionadas à GST e GSH, a LPO pode fornecer informações importantes no que se refere à formação de danos oxidativos, uma vez que a LPO demonstra efeitos em lipídios e conseqüentemente, a lesões na membrana celular, principalmente quando há menor eficiência na defesa antioxidante. O aumento da LPO pode sugerir que a defesa antioxidante ficou prejudicada, quando houve a exposição ao TBZ. Entretanto, o aumento na LPO ocorreu apenas em TBZ5 e TBZ50, o que poderia estar relacionado que em TBZ500 houve o aumento da GST como resposta aos danos oxidativos, o que pode ter evitado o aumento da peroxidação lipídica neste grupo, o que não ocorreu em TBZ 5 e TBZ50.

Estudos realizados a partir da exposição de *Rhamdia quelen* ao TBZ por 96h também demonstraram que o composto foi capaz de promover o aumento na lipoperoxidação em fígado, rins e cérebro (Ferreira *et al.*, 2012). Para a mesma espécie, a exposição ao TBZ também provocou o aumento da peroxidação lipídica

---

hepática, o que inclusive promoveu diversas alterações patológicas, como destruição de hepatócitos e colestase (Ferreira *et al.*, 2010). Ainda, em estudos com carpas (*Cyprinus carpio*), expostas a diferentes concentrações de TBZ, foi observado aumento da LPO em todas as concentrações testadas (Toni *et al.*, 2011) e em exposições de 100 dias ao TBZ, foi observado o aumento da LPO em fígado, brânquias e músculos (Clasen *et al.*, 2018). Sancho *et al.* (2010) avaliaram que o TBZ pode promover efeitos deletérios em lipídios e carboidratos, o que pode levar à peroxidação lipídica e a efeitos genotóxicos.

Alguns estudos sobre o desenvolvimento de ratos expostos ao TBZ demonstraram que há possível estresse oxidativo que podem resultar em danos ao DNA (Taxvig *et al.*, 2007). Os resultados obtidos em danos no DNA podem ainda estar relacionados com a peroxidação lipídica, também provocada pelos compostos. Corroborando nossos resultados, foi observado que o TBZ provocou genotoxicidade em *D. rerio* em células branquiais e sanguíneas, com o aumento da frequência de nucleoides (Castro *et al.*, 2018). A exposição ao TBZ não foi capaz de aumentar a frequência de MN em linfócitos bovinos expostos ao contaminante após 24 e 48hs de incubação (Siviková *et al.*, 2013), de maneira semelhante ao observado neste trabalho. Porém, no caso deste trabalho, não podemos afirmar que os danos ao DNA observados são em decorrência da exposição do TBZ ou do próprio solvente, uma vez que houve aumento também no grupo apenas com metanol.

Ainda são raros os trabalhos que demonstram os efeitos do TBZ para a atividade da AChE. Sabe-se que diversos contaminantes, como os organofosforados e carbamatos, têm como característica um efeito de redução da AChE e conseqüentemente, promovem estimulação exacerbada de receptores colinérgicos (Vieira *et al.*, 2014 Printes & Callaghan, 2006) e que outros fungicidas, como os da

---

classe dos benzimidazóis, podem promover o aumento da atividade da AChE (Silva *et al.*, 2019). A AChE tem papel fundamental na transmissão nervosa através da hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica, de forma que a inibição da AChE gera o acúmulo deste neurotransmissor, o que pode interferir na vida do animal, com o aparecimento de tremores musculares, convulsões, distúrbios comportamentais e morte (Chovanec, *et al.*, 2003). Kaviraj *et al.* (2004) demonstraram que o metanol pode promover toxicidade nervosa central, com alterações comportamentais, hiperatividade e convulsão, em concentrações maiores do que as utilizadas neste estudo, mas que de certa forma, pode corroborar os nossos resultados obtidos para a atividade da AChE.

Neste estudo, pode-se perceber que não houve diferença na atividade da AChE em cérebro de *P. lineatus* expostos, tanto para o TBZ quanto apenas ao MEOH. No entanto, para a atividade da AChE em músculo, foi observado que o MEOH foi capaz de provocar a redução da enzima, a qual foi revertida nos peixes expostos ao TBZ, inclusive na maior concentração testada, uma vez que a concentração do solvente foi a mesma nos grupos MEOH e TBZ500. Apesar de que os dados encontrados na literatura para os efeitos da exposição ao TBZ são contraditórios, estudos realizados por Toni *et al.* (2011) demonstraram que o TBZ foi capaz de induzir ao aumento na atividade da AChE em cérebro de carpas expostas a diferentes concentrações (0.59, 1.19, 1.78 e 2.37 mg L<sup>-1</sup>), por 7 dias, o que poderia corroborar nosso resultado, sugerindo que o TBZ também atue como indutor desta enzima ou que talvez o metanol possa ter atuado como um antagonista do TBZ. De maneira contrária, em *Cyprinus carpio* demonstraram diminuição na atividade da AChE, em exposição múltipla a fungicidas, incluindo o TBZ, em exposição por 100 dias (Clasen *et al.*, 2018). O TBZ promoveu menor atividade da AChE em exposição de larvas e

adultos de *Danio rerio* reduziu a capacidade exploratória para esta espécie, em exposições de 120 dias (Altenhofen *et al.*, 2017), de forma que estes dois trabalhos se diferem do nosso pelo período experimental.

Outro trabalho avaliou a atividade das colinesterases de eritrócitos de bovinos, em testes *in vitro*, que se mostrou menor em mistura de dois fungicidas azóis a partir de  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ , o que levou os autores a sugerir que estes compostos juntos são inibidores das colinesterases (Kolesárová *et al.*, 2013). Alterações na atividade da AChE podem ocasionar alterações comportamentais e prejudicar a sobrevivência dos peixes, fato que foi evidenciado em exposições de *D. rerio* ao TBZ, por 120 h e que demonstraram maior mortalidade e alterações comportamentais evidentes, como preferência por áreas escuras em testes comportamentais, o que pode sugerir maior ansiedade nos peixes, bem como aumento no tempo de eclosão de larvas expostas (Perez-Rodrigues *et al.*, 2019).

Diversos contaminantes têm sido relacionados com os danos ao DNA de eritrócitos de peixes (Alvim e Martinez, 2019; Vieira e Martinez, 2018; Vieira *et al.*, 2014), bem como ao aumento de MN e de AENS. Foi observado que o TBZ e o MEOH promoveram aumento nos dados ao DNA de *P. lineatus*, fato que fica mais evidente em TBZ500, mesmo em 24h de exposição, mas não foi capaz de ocasionar a formação de MN, nem de aumentar a frequência de AENS.

Apesar da interferência de efeitos do metanol aos efeitos do TBZ, nossos resultados demonstram que o fungicida pode sim promover uma resposta de estresse em peixes, bem como aumento em danos oxidativos.

## 5. CONCLUSÃO

Sendo o TBZ um contaminante encontrado com frequência no ambiente

aquático, percebeu-se que ele afeta a defesa antioxidante dos peixes, como o aumento da peroxidação lipídica e aumento de GST. Com relação aos efeitos em AChE, nossos resultados sugerem que o TBZ pode atuar como indutor desta enzima, o que pode interferir no comportamento de peixes expostos. Também deve-se ressaltar que o MEOH, um comum solvente de compostos orgânicos, quando presentes no meio aquático, podem ser nocivos aos organismos, bem como sua associação com contaminantes pode também mascarar efeitos adversos provocados.

## 6. REFERÊNCIAS

- Altenhofen, S.; Nabinger, D. D.; Wiprich, M. T.; Pereira, T. C. B.; Bogo, M. R.; Bonan, C. D. (2017). Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 180, p.483-490.
- Alvim, T. T.; Martinez, C. B. R. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 85-93.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Battaglin, W. A.; Sandstrom, M. W.; Kuivila, K. M.; Kolpin, D. W.; Meyer, M. T. (2011) Occurrence of azoxystrobin, propiconazole and selected other fungicides in US Streams, 2005-2006. *Water Air Soil Pollution*, 218, p.307-322.
- Beutler, E.; Duron, O.; Kelly, B. M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-888.

- Binelli, A.; Cogni, D.; Parolini, M.; Riva, C.; Provini, A. 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposure to Triclosan and Trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150 (1), 50-56.
- Bradley, P. M.; Journey, C. A.; Romanok, K. M.; Barber, L. B.; Buxton, H. T.; Foreman, W. T.; Furlong, E. T.; Glassmeyer, S. T.; Hladik, M. L.; Iwanowicz, L. R.; Jones, D. K.; Kolpin, D. W.; Kuivila, K. M.; Loftin, K. A.; Millis, M. A.; Meyer, M. T.; Orlando, J. L.; Reilly, T. J.; Smalling, K. L.; Villeneuve, D. L. (2017) Expanded target-chemical analysis reveals extensive mixed-organic-contaminant exposure in U.S. Streams. *Environmental Science & Technology*, 51 (9), p.4792-4802.
- Busby Jr, W. F.; Ackermann, J. M.; Crespi, C. L. 1998. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 27 (2), 246-249.
- Clasen, B.; Loro, V. L.; Murussi, C. R.; Tietcher, T. L.; Moraes, B.; Zanella, R. (2018). Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* in a rice-fish system. *Science of the Total Environment*, 626, p.737-743.
- Chovanec, A.; Hofer, Rudolf. Schiemer, F. (2003) Fish as bioindicators. In: Market, B. A.; Breure, A. M.; Zechmeister, H. G. *Bioindicators and biomonitors*. Elsevier Science. p. 1017.
- Camejo, G.; Wallin, B. Enojarvi, M. (1998). Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. *Free radical and antioxidant protocols*. Humana Press, 377-387.
- Castro, T. F. D.; Souza, J. G. S.; Carvalho, A. F. S.; Assis, I. L.; Palmieri, M. J.; Vieira, L. F. A.; Marcussi, S.; Machado, M. R. F.; Murgas, L. D. S. (2018). Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to

- tebuconazole-based comercial product. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 62, p.140-146.
- Diamanti-Kandarakis, E.; Bourguignon, J. P.; Giudice, L. C.; Hauser, R.; Prins, G. S.; Soto, A. M.; Zoeller, R. T., Gore, A. C. (2009) Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Society*, 30 (4), p.293-342.
- Egbuta, C.; Lo, J.; Ghosh, D. (2014) Mechanism of inhibition of estrogen biosynthesis by azole fungicides. *Endocrinology*, 155 (12), p.4622-4628.
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres Jr, V.; Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7 (2), p.88-95).
- Espenshade, P. J.; Hughes, A. L. (2007) Perulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 41, p.401-427.
- Ferreira, D.; Motta, A. C.; Kreutz, L. C.; Toni, C.; Loro, V. L.; Barcellos, L. J. B. (2010). Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere*, 79, p.914-921.
- Ferreira, D.; Unfer, T. C.; Rocha, H. C.; Kreutz, L. C.; Kaokaski, G.; Barcellos, J. B. (2012). Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish. *Neotropical Ichthyology*, 10 (1), p.215-220.
- Ferreira, G. F.; Baltazar, L. M.; Santos, J. R. A.; Monteiro, A. S.; Fraga, L. A. O.; Resende-Stoianoff, M. A.; Santos, D. A. (2013). The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azole and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, p.1801-1811.
- Henry, M. J.; Sisler, H. D. (1984) Effects of sterol biosynthesis-inhibiting (SBI) fungicides on cytochrome P-450 oxygenations in fungi. *Biochemistry and*

Physiology, 22 (3), p.262-275.

- Johlin, F. C.; Fortman, C. S.; Nghiem D. D.; Tephly, T. R. 1987. Studies on the role of folic acid and folate-dependent enzymes in human methanol poisoning. *Molecular Pharmacology*, 31 (5), 557-561.
- Kaviraj, A.; Bhunia, F.; Saha, N. C. 2004. Toxicity of methanol to fish, crustacean, oligochaete worm, and aquatic ecosystem. *International Journal of Toxicology*, 23 (1), 55-63.
- Keen, J. H.; Habig, W. H.; Jakoby, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *Journal of Biological Chemistry*, 251 (20), 6183-6188.
- Kolesárová, B.; Sinko, G.; Siviková, K.; Dianovsky, J. In vitro inhibition of blood cholinestase activities from cattle by triazole fungicides. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 66 (4), p.346-350.
- Kumar, N.; Awoyemi, O.; Willis, A.; Schimitt, C.; Ramalingam, L.; Moustaid-Moussa, N.; Crago, J. (2019) Comparative lipid peroxidation and apoptosis in Embryo-Larval Zebrafish exposed to three azole fungicides, tebuconazole, propiconazole, and myclobutanil, at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology Chemistry*, 38 (7), p.1455-1466.
- Li, S.; Wu, Q.; Sun, Q.; Coffin, S.; Gui, W.; Zhu, G. (2019). Parental exposure to tebuconazole causes thyroid endocrine disruption in zebrafish and developmental toxicity in offspring. *Aquatic Toxicology*, 211, p.116-123.
- Mercadante, R.; Polledri, E.; Scurati, S.; Moretto, A.; Fustinoni, S. (2014) Identification and quantification of metabolites of the fungicide tebuconazole in Human Urine. *Chemical Research in Toxicology*, 27 (11), p.1943-1949.
- Mezzelani, M.; Gorbi, S.; Da Ros, Z.; Fattorini, D.; d'Errico, G.; Milan, M.; Bargelloni, L.; Regoli, F. 2016. Ecotoxicological potential on non-steroidal anti-inflammatory

drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 121, 31-39.

Perez-Rodrigues, V.; Souders II, C. L.; Tiscuk, C.; Martyniuk, C. J. (2019).

Tebuconazole reduces basal oxidative respiration and promotes anxiolytic responses and hypoactivity in early-staged zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 217, p.87-97.

Perkins, E. J.; Ankley, G. T.; Crofton, K. M.; Garcia-Reyero, N.; LaLone, D. A.;

Johnson, M. S.; Tietge, J. E.; Villeneuve, D. L. (2013) Current perspectives on the use of alternative species in human health and ecological hazard assessments. *Environmental Health Perspectives*, 121 (9), p.1002-1010.

Printes, L. B.; Callaghan, A. (2006). Atividade de Acetilcolinesterase em *Daphnia*: Um

bom biomarcador de avaliação ambiental? *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v.1, n.1 p.89-92.

Sancho, E.; Villaroel, M. J.; Fernández, E.; Andreu, M. D.; Ferrando, M. D. (2010).

Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, p.370-376.

Santos, C.; Oliveira, M. T.; Cólus, I. M. S.; Sofia, S. H.; Martinez, C. B. R. (2018).

Expression of cyp 1<sup>a</sup> induced by benzo(A)pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 61, p.30-37.

Silva, A. R. R.; Santos, C.; Ferreira, N. G. C.; Morgado, R.; Cardoso, D. N.; Cruz, A.;

Mendo, S.; Soares, A. M. V. M.; Loureiro, S. (2019). Multigenerational effects of carbendazim in *Daphnia Magna*: From a subcellular to a population level.

- Environmental Toxicology and Chemistry, 38, 412-422.
- Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175 (1), p.184-191.
- Skollness, S. Y.; Blanksma, C. A.; Cavallin, J. E.; Churchill, J. J.; Durhan, E. J.; Jensen, K. M.; Johnson, R. D.; Kahl, M. D.; Makynen, E. A.; Villeneuve, D. L.; Ankley, G. T. (2013) Propiconazole inhibits steroidogenesis and reproduction in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 132 (2), p.284-297.
- Souza, L. F. C. B.; Montagner, C. C.; Almeida, M. B. Kuroda, E. K.; Vidal, C.; Freire, R. L.(2019). Determination of pesticides in the source and drinking Waters in Londrina, Paraná, Brazil. *Semina Ciências Agrárias*, 40 (3), 1153-1164.
- Taxvig, C.; Hass, U.; Axelstad, M.; Dalgaard, M.; Boberg, J.; Andeasen, H. R.; Vinggaard, A. M. (2007). Endocrine-Disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicological Sciences*, 100 (2), p.464-473.
- Toni, C.; Loro, V. L.; Santi, A.; Menezes, C. C.; Cattaneo, R.; Clasen, B. E.; Zanella, R. (2011) Exposure to tebuconazol in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 153, p.128-132.
- Toni, C.; Ferreira, D.; Kreutz, L. C.; Loro, V. L.; Barcellos, L. J. G. (2011) Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. *Chemosphere*, 83, p.579-584.
- Vieira, C. E. D.; Perez, M. R.; Acayaba, R. D. A.; Raimundo, C. C. M.; Dos Reis Martinez, C. B. (2018). DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in diferente tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*.

Chemosphere, 195, 125-134.

Vieira, C. E. D.; Costa, P. G.; Lunardelli, B.; Oliveira, L. F.; Cabrera, L. C.; Risso, W. E.; Primel, E. G.; Meletti, P. C.; Fillman, G.; Martinez, C. B. R. (2016). Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural áreas in Southern Brazil. *Science of Total Environmental*, 542, 44-56.

Vieira, C. E. D.; Almeida, M. S.; Galindo, B. A.; Pereira, L.; Martinez, C. B. R. (2014). Neotropical Ichthyology, 12 (1), 153-164.

## CAPÍTULO 4

---

### **Efeitos da exposição aguda à mistura de agrotóxicos para o teleósteo *Prochilodus lineatus***

Laura Fernanda Condota Borba de Souza; Cassiana Caroline Montagner; Claudia Bueno dos Reis Martinez

Manuscrito a ser submetido para avaliação do periódico Environmental Toxicology and Pharmacology

Normas disponíveis em:  
<https://www.elsevier.com/journals/environmental-toxicology-and-pharmacology/1382-6689/guide-for-authors>

## **Efeitos da exposição aguda à mistura de agrotóxicos para o teleósteo**

### ***Prochilodus lineatus***

Laura Fernanda Condota Borba de Souza<sup>1</sup>; Cassiana Caroline Montagner<sup>2</sup>; Claudia Bueno dos Reis Martinez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil.

\* Autor correspondente:

Claudia Bueno dos Reis Martinez – Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, km380, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brasil, CEP 86057-970. Tel: +55 (43)3371-5146. Email: claudiabrmartinez@gmail.com; cbueno@uel.br.

#### *Highlights:*

- A mistura de fungicidas promoveu estresse e alterações em íons plasmáticos
- A presença de agrotóxicos na água promoveu desequilíbrio de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>
- A mistura de fungicidas e a presença de agrotóxicos na água diminuíram a concentração de GSH hepático
- A mistura de fungicidas promoveu aumento de danos em DNA
- Houve aumento da atividade da AChE muscular e cerebral

---

## RESUMO

O estudo de efeitos adversos provocados pela exposição a agrotóxicos em organismos não alvos deve levar em consideração que comumente, o ambiente encontra-se contaminado por mais de desses compostos. Este trabalho avaliou os efeitos agudos de uma mistura de agrotóxicos presentes em água de manancial e de uma mistura de fungicidas (azoxistrobina, carbendazim e tebuconazol) no peixe *Prochilodus lineatus* durante 24h de exposição. Avaliou-se biomarcadores fisiológicos, bioquímicos e genotóxicos em diferentes órgãos do peixe. Na água de manancial, além do azoxistrobina, foi detectado a presença de atrazina, imidacloprido e diuron. Os peixes expostos à essa água apresentaram aumento de íons plasmáticos, redução da concentração de glutathiona (GSH) hepática e aumento na atividade da acetilcolinesterase (AChE) em cérebro e músculo. Já a mistura de fungicidas promoveu aumento de hematócrito e de glicose plasmática, alterações em íons plasmáticos, redução em GSH hepática, aumento da atividade da AChE cerebral e muscular e aumento em danos ao DNA de eritrócitos. Portanto, nossos resultados demonstram que os agrotóxicos em mistura, mesmo em concentrações abaixo da legislação disponível até o momento, demonstram efeitos nos biomarcadores analisados em *P. lineatus*, como alterações hematológicas, hiperglicemia, variações em íons plasmáticos e aumento da AChE cerebral.

**Palavras chave:** acetilcolinesterase, água de manancial, fungicidas, estresse oxidativo.

---

## 1. INTRODUÇÃO

A ampla atividade agrícola, somada ao aumento populacional e expansão de áreas de agricultura, está relacionada ao aumento do consumo de agrotóxicos para o combate de diversos tipos de pragas, mas que podem afetar negativamente o meio ambiente e organismos não alvo (Albuquerque et al., 2016; Costa et al., 2016; Singh et al., 2016). A contaminação do meio ambiente por estes compostos pode acontecer por lixiviação, escoamento superficial, deriva ou também por uso incorreto destes produtos, de forma que, ao contaminar o ecossistema aquático, estes podem ser acumulados em vários organismos, como peixes por exemplo, e ao longo da cadeia alimentar, afetar a saúde humana (Althenhofen et al., 2017; Toni et al., 2011).

A presença de agrotóxicos na água afeta a saúde dos peixes, uma vez que se sabe que diversos compostos podem interferir em organismos não alvo, mesmo quando em baixas concentrações (Montagner et al., 2014). Dentre as diferentes classes de agrotóxicos, tanto os inseticidas quanto os herbicidas podem promover estresse oxidativo e danos ao DNA em peixes, como no caso dos inseticidas imidacloprid (Vieira et al., 2018), cialotrina (Vieira e Martinez, 2018) e a associação destes (Alvim e Martinez, 2019), bem como efeitos relacionados a herbicidas que são comuns contaminantes de águas superficiais, como a atrazina (Andrade et al., 2019; Owolabi e Omotosho, 2016) e diuron (Moon et al., 2019; Velki et al., 2017). Apesar de menos frequentes, estudos que testaram efeitos adversos promovidos por fungicidas também já detectaram uma variedade de efeitos em biomarcadores (Althenhofen et al., 2017; Andrade et al., 2016; Jiang et al., 2015).

Existem diversos tipos de fungicidas, com grande variedade de mecanismos de ação ou grupos alvos de fungos (Karlsson et al., 2014; Ekinici & Senturk, 2010), sendo os benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas amplamente utilizados e já

detectados como contaminantes aquáticos (Souza et al., 2019; Rodrigues et al., 2015; Althenhofen et al., 2017). A partir da contaminação ambiental, os fungicidas, podem afetar o metabolismo de organismos não alvo, mesmo em concentrações muito baixas, o que pode interferir em diversas funções orgânicas e processos enzimáticos, uma vez que estes compostos podem ter efeitos neurotóxicos, genotóxicos, hepatotóxicas e nefrotóxicas importantes (Ekinci & Senturk, 2010).

O azoxistrobina (AZX) foi o primeiro fungicida da classe das estrobilurinas a ser patenteado e atualmente é o principal fungicida utilizado no mundo, com sua ação no complexo respiratório mitocondrial do fungo, pela inibição da respiração a partir do bloqueio da transferência de elétrons entre o citocromo b e c1, o que promove estresse oxidativo nos fungos expostos (Han et al, 2016; Rodrigues et al., 2015; Bartlet et al, 2002). Apesar de alguns autores considerarem o AZX como baixo potencial de toxicidade para mamíferos, aves e abelhas, sabe-se que é um composto extremamente tóxico para organismos aquáticos (Rodrigues; Lopes & Pardal, 2013; Bartlet et al, 2002).

O fungicida carbendazim (CBZ), da classe dos benzimidazóis, também chama a atenção pela ampla utilização mundial e é classificado como persistente no ambiente e extremamente tóxico para organismos aquáticos e abelhas (Patil et al, 2018; Pan, 2014). Diversos trabalhos mostram que possui toxicidade a outras espécies animais e inclusive, para humanos (Silva et al, 2019; Jiang et al, 2014). O CBZ possui como mecanismo de ação a ligação à tubulina  $\beta$ , componente de microtúbulos, o que leva à morte celular devido às alterações no desenvolvimento (Nwani et al, 2015).

O tebuconazol (TBZ), pertencente à classe dos triazóis ou azóis, representa cerca de 20% do comércio mundial de fungicidas, é classificado como contaminante emergente e persistente no meio ambiente, bem como tóxico para organismos

aquáticos (Althenhofen et al., 2017). O TBZ promove ação pelo bloqueio da lanosterol  $\alpha$ -desmetilase, na biossíntese do ergosterol, o que promove baixa estabilidade da membrana, peroxidação lipídica e morte fúngica (Kumar et al., 2019). Este composto já é relacionado inclusive com efeitos de desregulação endócrina, com efeitos na síntese de hormônios esteroides e colesterol (Espenshade & Hughes, 2007).

Estes fungicidas têm sido relacionados com desregulação endócrina e estão cada vez mais difundidos no ambiente aquático, de forma que sabe-se que os organismos em fase inicial de formação e desenvolvimento são considerados extremamente sensíveis à contaminação, pois muitos compostos podem afetar a sobrevivência e o sucesso de eclosão de peixes, bem como sofrer apoptose a partir da expressão gênica alterada (Santos et al., 2014; Jiang et al, 2015; Jiang et al., 2014).

O desenvolvimento de estudos que avaliem o impacto toxicológico no meio ambiente se intensificou, uma vez que há a necessidade de monitoramento de efeitos de diferentes substâncias que acabam afetando o meio ambiente e os ecossistemas envolvidos (Kaptaner et al., 2014). Desta forma, a utilização de biomarcadores e bioindicadores são ferramentas importantes para a avaliação dos efeitos adversos que podem ser provocados pelos contaminantes, que podem ocorrer em diferentes níveis de organização biológica, química e física (Colin et al., 2016; Silva et al, 2013; Salamat & Zarie, 2012; Lam et al., 2009).

Diversos trabalhos têm demonstrado que o CBZ, TBZ e AZX podem afetar negativamente diferentes espécies de animais. Além de ser considerado desregulador endócrino para peixes, o CBZ é associado com teratogenia e outros efeitos tóxicos, como apoptose, imunotoxicidade e menor sucesso na sobrevivência em peixes (Andrade et al, 2016; Jiang et al, 2014; Ludwikowska et al, 2013). O TBZ, pelo seu efeito na biossíntese do ergosterol nos fungos, é relacionado com peroxidação lipídica

e menor estabilidade da membrana, uma vez que também afeta a síntese de hormônios esteróis e colesterol em animais (Skollness et al, 2013; Espenshade & Hughes, 2007). Apesar de ainda escassos, alguns trabalhos já demonstram efeitos de toxicidade da AZX e de seus metabólitos para organismos não alvo, como peixes (Rodrigues et al., 2015; Rodrigues; Lopes & Pardal, 2013; Olsvik et al., 2010).

Os corpos de água acabam atuando como integradores de diversos processos biogeoquímicos, uma vez que os agrotóxicos utilizados podem acabar atingindo mananciais (Silva *et al.*, 2011). Mesmo presentes em concentrações traços, a exposição a esses compostos pode resultar em efeitos em diversos sistêmicos de organismos não alvo, o que reforça a importância do monitoramento de contaminantes (Souza *et al.*, 2019; Montagner *et al.*, 2019; Montagner *et al.*, 2014;)

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de exposição aguda a esses três fungicidas associados e a água de manancial potencialmente contaminada por agrotóxicos, uma vez que os organismos são expostos a mais de um composto ao mesmo tempo e monitorar os efeitos em biomarcadores fisiológicos, bioquímicos e genotóxicos, em baixa concentração, para diversos órgãos do peixe *Prochilodus lineatus*. O peixe dulcícola nativo *P. lineatus* (Valenciennes, 1836) é utilizado como modelo biológico para ensaios de toxicidade, pela sua sensibilidade à contaminantes e pela biologia conhecida (Vieira et al., 2019; Alvim e Martinez, 2019; Santos et al., 2019; Modesto e Martinez, 2009).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Aclimação**

Juvenis de *P. lineatus* (n=24, peso médio 13,5 ±0,3 g; 10,2± 0,0 cm) fornecidos

pela piscicultura Schneider (Toledo, PR, Brasil), foram aclimatados durante cinco dias, em tanques de 300 L, contendo água limpa e desclorada, aeração constante, fotoperíodo de 12h claro: 12h escuro. Durante o período de aclimação, os peixes foram alimentados com ração comercial, antes da renovação de água, a cada 48h. A alimentação foi suspensa 24h antes da montagem dos experimentos. Os parâmetros físicos e químicos foram monitorados durante todo o período experimental ( $22.35^{\circ}\text{C} \pm 0,04$ ;  $\text{pH } 8,71 \pm 0,01$ ; condutividade  $90 \mu\text{s cm}$ ;  $7,03 \pm 0,26 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{O}_2$  dissolvido) e não houve diferenças para esses parâmetros, entre os grupos experimentais.

## 2.2. Coleta de água

Amostras de água foram coletadas em uma Estação de Tratamento de Água (ETA) localizada no bairro Cafezal (Londrina, Paraná), que realiza a captação de água do manancial Rio Tibagi, com média de captação de 1446 L por segundo. Após o tratamento, há a distribuição da água tratada para a maior parte da cidade de Londrina. Foram coletados 150 L de água diretamente da torneira de captação da ETA, armazenadas em galões de 50 L, previamente lavados com água ultrapura.

## 2.3. Desenho experimental e amostragem

Após a aclimação, os peixes foram submetidos a ensaios de toxicidade aguda (24h), em aquários contendo 50 L de água e três animais, sendo dois aquários para cada grupo ( $n=6$ ), grupo contendo apenas água desclorada (CTRL), contendo água desclorada e  $300 \mu\text{L}$  de metanol (MEOH); grupo AGUA contendo água de captação da ETA Tibagi e grupo mistura (MIS), contendo carbendazim ( $100 \mu\text{L}$  de CBZ ADAMA, 99.2%), azoxistrobina ( $100 \mu\text{L}$  de AZX ADAMA, 98,8%) e tebuconazol ( $100 \mu\text{L}$  de TBZ ADAMA, 97,6%) diluídos em metanol. As concentrações dos

---

fungicidas são próximas daquelas presentes na legislação para o CBZ e TBZ. Após 24h, os animais foram anestesiados com benzocaína ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ), foram pesados e medidos e então, o sangue foi retirado pela veia caudal, com uso de seringas heparinizadas. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por secção medular para a retirada de fígado, cérebro e músculo, com armazenamento a  $-72^\circ\text{C}$  até o momento da análise dos biomarcadores. Uma alíquota de sangue total foi disponibilizada para análises hematológicas e para o ensaio do cometa. O restante do sangue foi centrifugado, para separação do plasma, que ficou armazenado a  $-72^\circ\text{C}$  até o momento da análise. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Protocolo n. 17279.2019.28).

#### 2.4. Determinação da concentração dos fungicidas na água

As amostras de água dos aquários foram armazenadas em tubos falcon de 50 mL para as análises cromatográficas. As amostras CTRL, MEOH e MIS foram injetadas após extração em fase sólida, após filtração em membrana de nylon 0,22 mm x 47 mm (FilterPro). Foram usados cartuchos C18 Strata® Sep-pak (Phenomenex®), de 500 mg de fase e após, foram acondicionados com 3 mL de metanol (MeOH) grau HPLC, seguido de 3 mL de água ultrapura. A eluição foi feita com 3 mL de MeOH e 3 mL de acetonitrila. O eluato foi seco com fluxo de gás nitrogênio e ressuspendido com 1 mL de solução H<sub>2</sub>:MeOH 70;30 v/v, para quantificação dos fungicidas AZX, CBZ e TBZ para a amostra MIS. Na amostra do manancial (ÁGUA), após a mesma extração, além de AZX, CBZ e TBZ, investigou-se a ocorrência dos agrotóxicos malation, imidacloprido, haxazinona, clomazona, diuron, tebutiuron, ametrina, carbofurano, atrazina e simazina.

## 2.5. Biomarcadores

### 2.5.1. *Fisiológicos*

Para a determinação de hematócrito (Hct) uma alíquota de sangue foi adicionada a microcapilares de vidro heparinizados, centrifugadas (1200 g, 7 min, centrífuga Luguimac S.R.L., modelo L5, Argentina) e lidas em cartão padronizado, para determinação da porcentagem de eritrócitos de cada amostra. A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método colorimétrico de cianeto de metaemoglobina (kit comercial, Labtest Diagnóstica, Brasil), com leitura em espectrofotômetro (540 nm). O valor de eritrócitos (RBC) foi realizado a partir da adição de uma alíquota de sangue (5 µL) a solução tampão de formol citrato (1:200), para contagem de eritrócitos por mm<sup>3</sup> de sangue, contabilizados em câmara de Neubauer, sob microscópio de luz.

A glicose plasmática foi determinada pelo método da glicose oxidase, com leitura em espectrofotômetro (kit comercial, Doles Reagentes Ltda, Brasil), à 550 nm. As concentrações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foram mensuradas em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer A700), com atomizador de chama.

### 2.5.2. *Bioquímicos*

Para análise dos biomarcadores relacionados aos danos oxidativos e defesas antioxidantes as amostras de fígado foram descongeladas, homogeneizadas (1:10 m:v) em solução de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), centrifugadas (20 min, 13000 g, 4°C) e foi utilizado o sobrenadante para os ensaios bioquímicos.

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) hepática foi determinada de acordo com Keen et al. (1976), a partir da complexação da glutathione reduzida (GSH)

---

com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), com leitura em espectrofotômetro a 340 nm (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA) e expressa em nmol CDNB conjugados min<sup>-1</sup>mg de proteína<sup>-1</sup>. A análise para determinação do tripeptídeo glutatona (GSH) foi realizada de acordo com o método de Beutler et al (1973), pela reação da glutatona com o substrato, através da reação dos grupamentos –SH com o reagente de cor 5,5 ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), com formação do tiolato (TNB), quantificado em espectrofotômetro (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA) a 412 nm.

A determinação da peroxidação lipídica (LPO) hepática foi realizada pelo método TBARS (Camejo et al, 1998), a partir da quantificação de um de seus produtos, como o malondialdeído, com adição ao sobrenadante o butilhidroxitolueno (BHT 1M), solução salina fosfatada (2 mM KCl; 1,4 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 357 nM NaCl; 10 nM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4), ácido tricloroacético (TCA 50%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 1,3%), dissolvido em 0,3% NaOH. A mistura foi mantida em estufa a 60°C em placa de leitura, durante 1 hora. Então, foi realizada a leitura em fluorescência em 530 nm, com a concentração de TBARS determinada através de uma curva padrão de malondialdeído (MDA) e a concentração expressa em nmol de TBARS.mg de proteína<sup>-1</sup>.

A atividade da acetilcolinesterase (ACh) foi determinada em amostras de cérebro e músculo. Para tanto, os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5; 1:10 m:v) e centrifugados (16000 g, 20 min, 4°C), de acordo com o método de Ellman et al. (1961) e adaptado por Alves-Costa et al. (2007). A partir da reação do iodeto de acetilcolina (9 nM) com ditionitrobenzoato (0,5 mM), um reagente de cor, é determinada a atividade da AChE, com com leitura em microplacas a 415 nm (Victor TM<sup>3</sup>, Perkin Elmer, USA) e resultados expressos em nmol min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>.

A concentração das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação das proteínas da amostra com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, sendo a curva de calibração determinada com uso de soro de albumina bovina (BSA) e a absorbância lida a 595 nm, em leitora de ELISA (Bio-TekInstruments, ELX 800, USA).

### 2.5.3. *Genotóxicos*

Os danos no DNA foram quantificados a partir da extensão da migração do DNA, a partir do proposto por Singh et al., 1988 (modificado por Vieira et al., 2016). Desta forma, foi realizada leitura de 100 nucleoides por lâmina e classificadas visualmente em classes distintas, de acordo com a migração do DNA: sendo nucleoides sem dano aparente (classe zero), com comprimento de cauda menor do que o diâmetro do nucleoide (classe 1), comprimento de cauda duas vezes maior que o diâmetro do nucleoide (classe 2) e cauda três vezes maior que o nucleoide (classe 3). O escore de danos então foi determinado pela multiplicação do total de células por classe pelo valor da classe, o que resulta em valores que variam entre 0 a 300.

A análise da frequência de micronúcleo (MN) e alterações eritrocíticas nucleares (AENs) foi determinada segundo a determinação proposta por Ueda *et al* (1992). As lâminas foram coradas com 20 µL de laranja de acridina (0,003%), para a leitura e imediatamente analisadas em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000x, com contagem de 3000 eritrócitos para cada peixe. Foram observadas células com a presença de MN e AENs, sendo estas classificadas em núcleo lobulado, segmentado ou em formato de rim, além de células binucleadas.

## 2.6. Análises Estatísticas

Inicialmente, os dados foram testados para determinação de normalidade e homogeneidade de variâncias. Após, foram realizadas análises de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), com comparação múltipla (testes de Newman-Keuls ou Dunns), quando sugeridas, a partir do uso do software Sigma Plot 11.0. Foram consideradas as diferenças significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Determinação de fungicidas na água

As concentrações dos fungicidas na água estão demonstradas na Tabela 4.1. Percebe-se que para AZX e CBZ os valores se mantiveram próximos das concentrações nominais, com perda de 66% dos valores nominais para o TBZ. As concentrações utilizadas foram subletais e próximas de concentrações para a legislação atual que contempla o CBZ e TBZ. Para a amostra ÁGUA, além do AZX, foram detectados atrazina ( $87 \text{ ng L}^{-1}$ ), imidacloprido ( $< 5 \text{ ng L}^{-1}$ ) e diuron ( $< 13 \text{ ng L}^{-1}$ ).

Tabela 4.1. Concentração de fungicidas para condição controle (CTRL), metanol (MEOH), água do Rio Tibagi (ÁGUA) e para a mistura dos fungicidas AZX, CBZ e TBZ.

Concentração de fungicidas (LC-MS/MS)				
	CTRL	MEOH	ÁGUA	MIS
<b>AZX</b>	< LDI	< LDI	$4 \text{ ng L}^{-1}$	$105 \pm 5 \mu\text{g L}^{-1}$
<b>CBZ</b>	< LDI	< LDI	ND	$116 \pm 14 \mu\text{g L}^{-1}$
<b>TBZ</b>	< LDI	< LDI	ND	$34 \pm 3 \mu\text{g L}^{-1}$

<LDI: menor que o limite de detecção instrumental, sendo  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  para AZX,  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  para TBZ e  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  para CBZ.

#### 3.2. Parâmetros fisiológicos

A exposição à mistura de fungicidas foi capaz de promover o aumento do hematócrito ( $p < 0,05$ ;  $F = 3,96$ ), mas sem diferenças para os grupos MEOH e ÁGUA.

Para os parâmetros de hemoglobina e RBCs, não houve diferenças, quando comparados ao grupo CTRL ( $p=0,15$ ;  $F=18$  e  $p=0,33$ ;  $1,133$ , respectivamente). Com relação à glicemia, pode-se observar que não houve diferenças para os grupos MEOH e ÁGUA, com relação ao controle. No entanto, houve o aumento da concentração da glicose para o grupo MIS ( $p=0,05$ ,  $F=44,68$ ). Para o parâmetro de  $\text{Na}^+$ , houve o aumento da concentração apenas para o grupo MEOH e houve hiponatremia para o grupo MIS ( $p=0,05$ ;  $F=2,95$ ). Para o  $\text{K}^+$ , pode-se perceber que o MEOH apresentou a diminuição da concentração. No entanto, para os grupos ÁGUA e MEOH, houve o aumento da concentração de  $\text{K}^+$  ( $p=0,001$ ;  $F=10,82$ ) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Parâmetros hematológicos e iônicos em *P. lineatus* expostos, durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), à água de manancial (ÁGUA) e à mistura de fungicidas (MIS).

Parâmetros fisiológicos	CTRL	MEOH	AGUA	MIS
Hematócrito (%)	39,1±1,7 <sup>a</sup>	39,1±1,0 <sup>a</sup>	39,8±2,9 <sup>a</sup>	47,1±1,5 <sup>b</sup>
RBCs ( $\times 10^6$ cel.mm <sup>3</sup> )	12,7±1,3	7,2±0,3	8,4±0,05	10,5±2,0
Hemoglobina (mg.dL <sup>-1</sup> )	26,3±1,9	19,7±1,8	28,9±1,6	25,4±0,2
Glicose (mg.dL <sup>-1</sup> )	71,1±2,9 <sup>a</sup>	72,5±2,8 <sup>a</sup>	78,0±2,1 <sup>a</sup>	113,3±3,1 <sup>b</sup>
$\text{Na}^+$ (mM)	138,3±6,3 <sup>a</sup>	165,7±7,5 <sup>b</sup>	145,3±2,1 <sup>a</sup>	116,1±4,2 <sup>c</sup>
$\text{K}^+$ (mM)	5,1±0,1 <sup>a</sup>	3,5±0,3 <sup>b</sup>	6,3±0,2 <sup>c</sup>	6,1±0,2 <sup>c</sup>

Os dados representam a média  $\pm$ EP,  $n=6$ . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ( $p<0,05$ ).

### 3.3. Danos oxidativos e defesa antioxidante

Não houve alteração significativa na atividade da GST hepática nos peixes dos três grupos testados ( $p=0,11$ ;  $F=2,27$ ) (Figura 4.1). No entanto, para a concentração de GSH hepática (Figura 4.2), pode-se observar valores significativamente menores nos peixes dos grupos ÁGUA e MIS, enquanto que para o grupo MEOH, foi observado um valor significativamente maior deste parâmetro, em relação ao respectivo grupo controle ( $p=0,02$ ;  $F=3,84$ ).

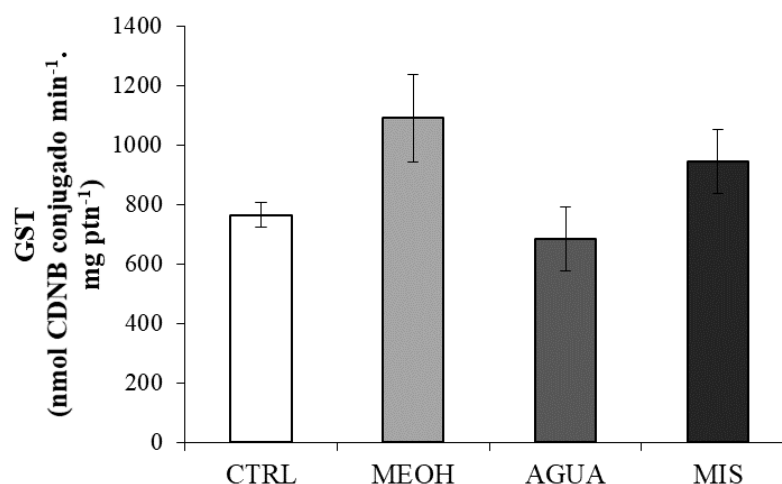


Figura 4.1. Atividade da glutiona-S-transferase (GST) em fígado de *P. lineatus* expostos durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (AGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Não foram detectadas diferenças significativas em entre os grupos testados ( $p=0,11$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

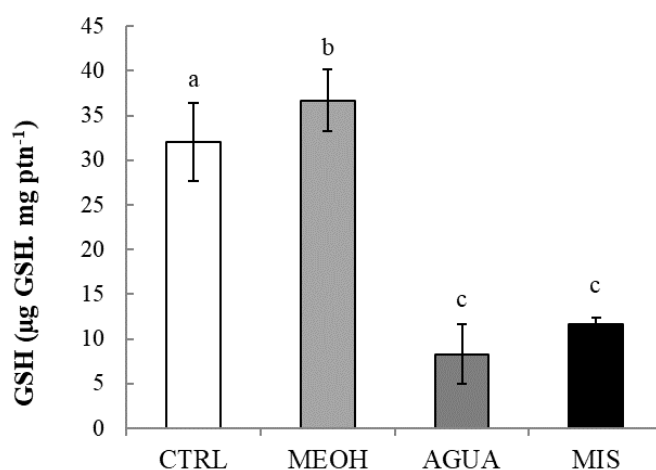


Figura 4.2. Concentração da glutiona (GSH) em fígado de *P. lineatus* expostos durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (AGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p=0,02$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

Com relação aos danos oxidativos, não foi observado diferenças na LPO ( $p=0,67$ ;  $H=1,52$ ) em fígado de *P. lineatus*, entre os grupos testados e comparados ao grupo CTRL (Figura 4.3).

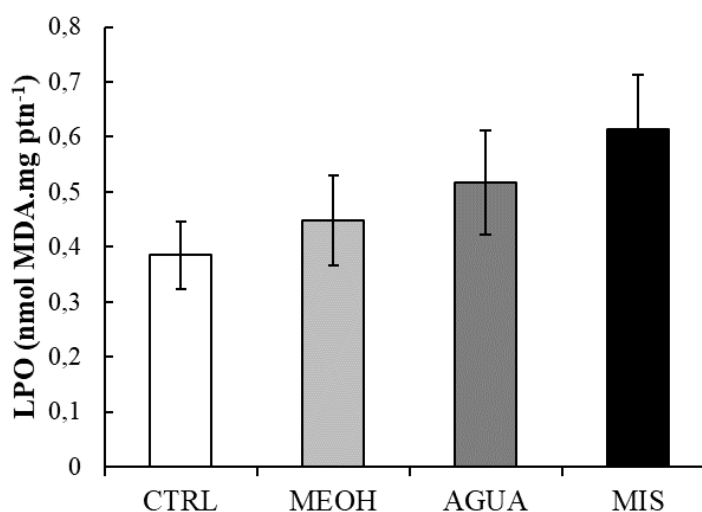


Figura 4.3. Lipoperoxidação (LPO) em fígado de *P. lineatus* expostos durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (ÁGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos testados ( $p=0,67$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

### 3.4. Atividade da AChE

Houve o aumento da atividade cerebral da AChE nos peixes dos grupos ÁGUA e MIS, em relação aos grupos CTRL e MEOH ( $p=0,001$ ;  $F=40,18$ ) (Figura 4.4A). Para a atividade de AChE em tecido muscular, pode-se observar que houve o aumento para todos os grupos experimentais em relação ao CTRL ( $p=0,005$ ;  $H=12,82$ ) (Figura 4.4B).

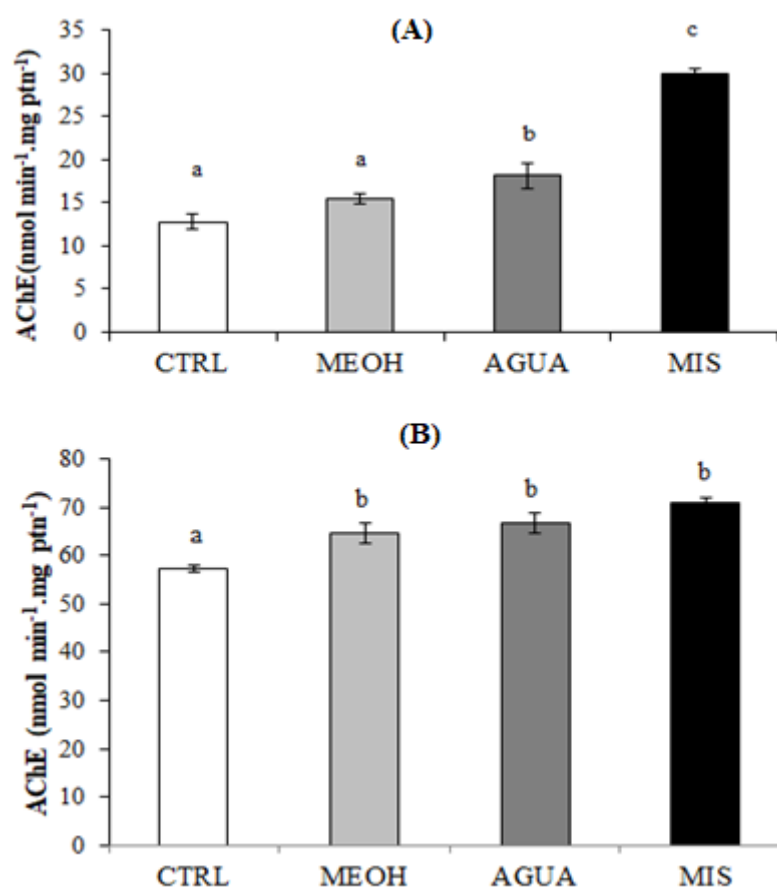


Figura 4.4. Atividade da acetilcolinesterase em cérebro (A) e musculo (B) de *P. lineatus* expostos durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (ÁGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos testados ( $p < 0,001$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

### 3.5. Danos genotóxicos

O teste do Cometa indicou o aumento de danos ao DNA para os grupos MEOH e MIS em relação ao grupo CTRL e ÁGUA ( $p < 0,001$ ,  $F=7,744$ ) (Figura 4.5).

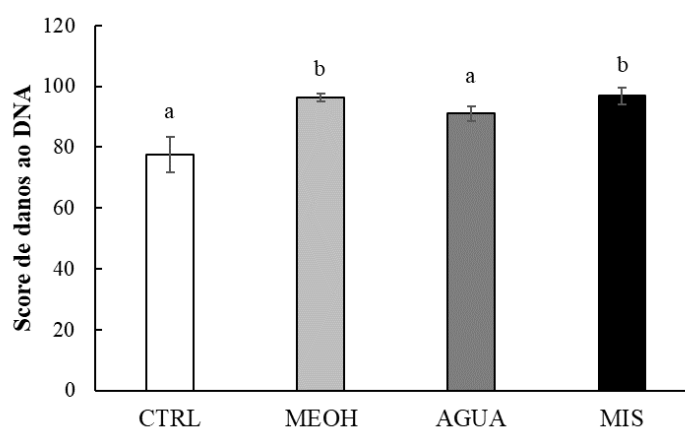


Figura 4.5. Escore de danos ao DNA de eritrócitos de *P. lineatus*, expostos durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (ÁGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p < 0,001$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

Não foi observada a ocorrência de micronúcleos nos peixes de nenhum dos grupos experimentais, bem como não houve diferenças entre os grupos na frequência de AENs ( $p=0,99$ ;  $H=0,11$ ) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Frequência de micronúcleo (MN) e outras AENs (núcleo segmentado, em forma de rim, lobulado e células binucleatas) em eritrócitos de *P. lineatus* expostos durante 24h, apenas à água desclorada (CTRL), ao metanol (MEOH), a água de manancial (ÁGUA) e à mistura de fungicidas (MIS). Não houve diferença significativa entre os grupos testados ( $p=0,99$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EP,  $n=6$ .

	MN	N. SEGMENTADO	N. RIM	N. LOBULADO	BINUCLEADO
CTRL	0	9	13	0	0
MEOH	0	1	1	3	0
AGUA	0	3	0	1	0
MIS	0	1	1	2	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>6</b>	<b>0</b>

#### 4. DISCUSSÃO

Este trabalho pode demonstrar que mesmo em baixas concentrações a presença de contaminantes na água pode provocar efeitos adversos em *P. lineatus*. Os contaminantes presentes em água de manancial também promoveram efeitos adversos, como diminuição da concentração de GSH e o aumento da atividade da

---

AChE muscular e cerebral. Já a mistura dos fungicidas AZX, CBZ e TBZ se mostrou também nociva para os peixes, pois foi capaz de promover o aumento do hematócrito e da glicemia, hiponatremia e hipercalemia, menor concentração de GSH hepática e o aumento da atividade da AChE tanto para o tecido muscular quanto cerebral.

A água de manancial coletada se mostrou contaminada com diferentes agrotóxicos, além do fungicida AZX. Já foi demonstrado que o imidacloprid pode ocasionar efeitos adversos em peixes e induzir o aumento de defesas antioxidantes, além de promover aumento de lipoperoxidação e danos ao DNA em eritrócitos de peixes (Vieira et al., 2018). A atrazina é um herbicida amplamente utilizado no Brasil, sendo que a exposição de peixes ao composto promove efeitos nocivos, como diminuição da defesa antioxidante (Owolabi e Omotosho, 2016; Santos e Martinez, 2012). O diuron, herbicida considerado perigoso para o ecossistema aquático, foi detectado no grupo AGUA e já se demonstrou que este composto pode promover alterações em proteínas celulares e mecanismos tóxicos que podem resultar em malformações e alterações de desenvolvimento em peixes (Moon et al., 2019). Inclusive, estudos com *Danio rerio* mostraram que o diuron é moderadamente tóxico para esta espécie, com percepção de alterações comportamentais (Velki et al., 2017) e estresse oxidativo na mesma espécie, com citotoxicidade evidenciada, em exposição aguda (Kao et al., 2019). Nossos resultados para o grupo ÁGUA mostraram que a associação de contaminantes pode resultar em menor defesa antioxidante, fato evidenciado pela diminuição na concentração de GSH, apesar de que não foi observado aumento em GST e de LPO.

É bem esclarecido que peixes em situação de estresse demonstram o aumento da porcentagem de eritrócitos circulantes e da glicose, como resposta à maior liberação de catecolaminas e pela contração esplênica, para promover aumento

da oxigenação tecidual e maior fornecimento energético para os tecidos, como resposta de luta e fuga (Wenderlaar Bonga, 2011). O estresse pode ser considerado como uma resposta a um estímulo nocivo, de forma que é importante que o peixe desenvolva uma resposta adaptativa, que será necessária para a manutenção do equilíbrio orgânico, sendo que estas respostas podem surgir em minutos ou horas após da ativação simpática. A partir do início da resposta de adaptação, ocorrem reações em cascata, que vão promover efeitos no Sistema Nervoso Autônomo e no eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, com liberação de catecolaminas e cortisol, que resultarão no aumento da mobilização energética (Wenderlaar Bonga, 2011; Wenderlaar Bonga, 1997).

A presença de contaminantes na água pode provocar respostas de aumento de eritrócitos e hiperglicemia, como pode-se observar nos resultados referentes ao hematócrito e glicemia, para o grupo MIS. A AZX foi capaz de promover o aumento do hematócrito e da concentração da glicose em salmões (*Salmo salar L.*) expostos ao composto por 96h (Olsvik, et al., 2010). De forma semelhante, em exposição de carpas (*Cyprinus carpio*) e de zebrafish (*Danio rerio*) ao TBZ por 96h promoveram o aumento da glicemia, como resposta ao estresse provocado pelo composto (Toni et al., 2011; Sancho et al, 2010). Estes resultados corroboram os resultados obtidos com a exposição do curimba à mistura destes compostos. Entretanto, o fungicida CBZ promove o efeito contrário com relação ao hematócrito, fato já relatado por diversos autores, que mostraram que este composto pode promover a diminuição do hematócrito, pela interferência na hematopoiese e por hemólise em peixes (Nwani et al., 2015; Min & Kang, 2008), em ratos (Patil et al., 2018; Zari & Al-Attar, 2011; Selmanoglu et al., 2001) e para a mesma espécie, como descrito no capítulo 2. Mas de forma semelhante aos resultados promovidos pelo AZX e TBZ, que induziram a

---

hiperglicemia, o CBZ também é capaz de promover resposta ao estresse, aumentando a liberação de glicose na corrente sanguínea, fato já observado em peixes bagres africanos (Nwani et al., 2015) e em ratos (Zari & Al-Attar, 2011; Selmanoglu et al., 2001). Com relação aos resultados obtidos no hematócrito dos peixes expostos à mistura, pode-se suspeitar que os efeitos de estresse foram mais evidentes pela exposição a AZX e TBZ do que ao CBZ, uma vez que o CBZ promove diminuição do hematócrito em peixes (Capítulo 2). Já com relação à hiperglicemia, diversos autores corroboram nossos resultados, uma vez que os contaminantes promoveram sim uma resposta de mobilização energética (Wenderlaar Bonga, 2011; Toni et al., 2011; Wenderlaar Bonga, 1997)

A hiponatremia pode ser extremamente nociva para peixes de água doce, uma vez que este desequilíbrio osmorregulatório pode inclusive promover a morte destes peixes (Grosell et al., 2002). O balanço iônico é importante para a manutenção da homeostase em peixes, de forma que muitos contaminantes afetam a permeabilidade do epitélio branquial à  $H_2O$  e íons, sendo o  $Na^+$  em maior concentração no fluido extracelular e o  $K^+$  no fluido intracelular. A hiponatremia foi observada neste estudo, apenas para o grupo MIS, bem como hipercalemia para os grupos ÁGUA e MIS. Em peixes de água doce, a ativação de resposta ao estresse, com mobilização energética pode favorecer a perda de  $Na^+$  pelas brânquias (Wenderlaar Bonga, 2011), o que pode ter favorecido o desequilíbrio iônico observado em MIS. No caso de exposição a contaminantes, as brânquias rapidamente sofrem efeitos, com alteração no seu tecido e conseqüentemente, na função devido à disfunção celular e circulatória (Fernandes e Moron, 2014).

O papel da GSH é bem esclarecido, uma vez que esta atua como defesa antioxidante não enzimática celular e é capaz de facilitar a conjugação de

---

xenobióticos, bem como pode ser considerada importante sistema de defesa antioxidante da célula, de maneira que defende a célula contra agentes oxidantes, podendo atuar sozinha ou como substrato para as reações da GST (Nikinmaa, 2014; Ferreira et al., 2012). Já a GST, é uma família de enzimas antioxidantes, também responsável pela proteção celular (Nikinmaa, 2014; Hermes, Lima, 2005) e nosso trabalho demonstrou que não houve diferenças com relação à GST, com diminuição de GSH biodisponível para os grupos ÁGUA E MIS , possivelmente devido ao aumento do consumo promovido pelo CBZ, uma vez que ele utiliza a glutathione durante a reação de fase 2 (FAO, 2008).

O imidacloprid, detectado no grupo ÁGUA é considerado muito tóxico para a vida aquática e pode interferir na defesa antioxidante dos peixes testados (Polat et al., 2012). No entanto, estudos com a mesma espécie utilizada neste trabalho sugerem que este inseticida promove o aumento de GST (Vieira et al., 2018).

Mesmo com a redução da concentração de GSH, os danos oxidativos em lipídeos (LPO) não foram detectados pelo ensaio TBARS nos grupos ÁGUA e MIS, apesar de uma tendência de aumento. A LPO ocorre quando a defesa antioxidante do organismo não é suficiente para proteger a célula de lesões em fosfolipídios da membrana, o que evita a morte celular (Nikinmaa, 2014). De maneira contrária, de acordo com os resultados obtidos nos capítulos anteriores (Cap. 2 e 3), pode-se supor que houve antagonismo entre CBZ e TBZ, uma vez que houve menor LPO em CBZ (CBZ50 e CBZ500) e aumento em TBZ (TBZ5 e TBZ50). Já é relatado que o CBZ pode induzir ao aumento da LPO e diminuição de GSH, em períodos mais prolongados de exposição (Palanikumar et al., 2014). O TBZ também já foi relacionado à maior taxa de LPO hepática, em carpas (*Cyprinus carpio*) (Toni et al., 2011; Ferreira et al., 2010) e com destruição de hepatócitos e colestase (Ferreira et al., 2010). De maneira

---

semelhante a estes autores, a exposição ao AZX promoveu o aumento na atividade da GST, porém em 21 dias de exposição, bem como ao aumento da LPO (Han et al., 2016).

Muitos agrotóxicos são relacionados à interferência na atividade da AChE, principalmente através da inibição enzimática, o que promove acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica e conseqüentemente, maior estimulação de receptores colinérgicos (Vieira et al., 2014; Murussi et al., 2014; Santi et al., 2011; Vieira & Martinez, 2018; Printes & Callaghan, 2006). Entretanto, alguns fungicidas parecem estar relacionados ao aumento da atividade da AChE, como o CBZ. Apesar de não ter o mecanismo ainda totalmente esclarecido, alguns autores sugerem que o CBZ atua como indutor da AChE e conseqüentemente, pode estimular a apoptose celular (Silva et al., 2019; Jiang et al., 2015; Jiang et al., 2014; Puymirat; Etongue-Mayer & Dussalt, 1995). Os efeitos promovidos pelo TBZ na atividade da AChE ainda são contraditórios, uma vez que já se percebeu que este fungicida pode promover o aumento da AChE, em diferentes concentrações, (Toni et al., 2011). Porém, o contrário foi observado por Clasen *et al.* (2018), que observaram a diminuição da atividade para esta enzima, em carpas (*Cyprinus carpio*), em associação da exposição do TBZ a diversos fungicidas, incluindo o TBZ, em exposição de 100 dias. Trabalhos com larvas e adultos de *Danio rerio* expostos ao TBZ por 120 dias também apresentaram diminuição da atividade da AChE. Desta forma, nossos resultados demonstram que os efeitos da associação destes fungicidas deve ser melhor estudados, para esclarecer o real efeito de uma mistura de contaminantes na enzima, bem como os efeitos isolados promovidos pelo TBZ e AZX. Devido à menor estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos, o aumento da AChE pode resultar em menor capacidade adaptativa e de sobrevivência, uma vez que o estímulo da ACh na fenda sináptica é importante para

a função de diversos sistemas biológicos, bem como o aumento da AChE pode ainda induzir células a apoptose e menor expressão de genes relacionados à enzima (Jiang et al., 2014; Murussi et al., 2014; Santi et al., 2011).

Os efeitos relacionados à genotoxicidade são comuns em exposições a diversos tipos de contaminantes, uma vez que xenobióticos podem promover alterações na estrutura do DNA, sendo geralmente os efeitos relacionados a mutações pontuais, com mudanças em nucleotídeos, que pode ocasionar a formação de aminoácidos codificados e conseqüentemente, em produção de proteínas alteradas ou até mesmo em alterações no próprio material genético (Nikinmaa, 2014). O aumento de danos ao DNA observado no grupo MIS condiz com resultados encontrados na literatura. Estudos desenvolvidos por Han et al (2016) demonstraram o aumento de danos ao DNA em exposição de *D. rerio* ao AZX durante 21 dias, em diferentes concentrações, o que foi relacionado ao aumento da LPO provocado pelo composto neste estudo. Também já foi demonstrado que o TBZ foi capaz de aumentar a fragmentação de moléculas de DNA, em estudos realizados nesta mesma espécie (Castro et al., 2018). Já o CBZ também pode estar relacionado ao aumento de danos ao DNA, em diversas espécies, possivelmente devido ao seu potencial apoptótico e de peroxidação lipídica, no entanto, nossos resultados não observaram o aumento da LPO, apesar de ter ocorrido o aumento de danos ao DNA (Palanikumar et al., 2014; Jiang et al., 2014). Uma vez que o metanol também promoveu aumento de danos ao DNA, não podemos afirmar que a mistura de fungicidas pode promover o aumento de danos ao DNA.

A formação de micronúcleos e o aumento da formação de AENs em eritrócitos de peixes geralmente são encontrados em exposições crônicas, uma vez que em peixes, os MN são formados durante a fase de divisão celular e podem demorar em

torno de 7 dias para entrar na circulação (Nikinmaa, 2014). Este tempo para o “turnover” celular pode explicar nossos resultados, uma vez que não foram encontrados MN em nenhum dos grupos experimentais, bem como não houve diferenças significativas com relação à formação de AENs. Entretanto, estudos realizados com a exposição de zebrafish (*D. rerio*) ao TBZ mostraram o aumento da presença de micronúcleo em diferentes concentrações e diferentes períodos experimentais, sendo a menor frequência destes na concentração de 100 µg L<sup>-1</sup> em 24h (Castro et al., 2018). De maneira contrária, Siviková et al (2013) não observaram o aumento da formação de MN em linfócitos bovinos expostos in vitro ao TBZ, em exposições de 48h. A exposição ao CBZ de forma isolada não promoveu diferenças para a formação de MN, em hepatócitos de camundongos, mas sim quando combinado a outros agrotóxicos, em exposições de 28 dias (Dikic et al., 2012). Apesar de não ter sido observada a formação de MN para os grupos experimentais, isto não exclui a possibilidade de que a presença destes contaminantes na água e para o grupo MIS, em maiores períodos experimentais, possa sim induzir a genotoxicidade, uma vez que diversos outros estudos já puderam perceber estes efeitos para os compostos em exposições isoladas ou em mistura.

## **5. CONCLUSÃO**

Este trabalho reforça a ideia de que a presença na água de fungicidas isolados ou em diferentes tipos de mistura promove efeitos tóxicos em *P. lineatus*. Mesmo com exposições em baixas concentrações e por um curto período de tempo, percebe-se que estes contaminantes podem prejudicar as defesas antioxidantes, promover alterações iônicas e efeitos na AChE, além de induzir respostas de estresse, como o aumento do hematócrito e a hiperglicemia. Ainda, devemos ressaltar que a presença

---

de contaminantes na água de manancial promoveu efeitos nos peixes expostos. Embora os resultados ainda sejam escassos na literatura, já se sabe que AZX, TBZ e CBZ são capazes de promover efeitos adversos a diferentes espécies de animais, inclusive em peixes. Ainda, reforçamos a ideia de que os efeitos destes fungicidas devem ser monitorados, em virtude de sua ampla utilização e com resposta de biomarcadores de estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS

- Alvim, T. T.; Martinez, C. B. R. 2019. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 85-93.
- Andrade, T. S.; Henriques, J. F.; Almeida, A. R.; Machado, A. L.; Koba, O.; Giang, P. T.; Soares, A. M. V. M.; Domingues, I. 2016. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 170, 390-399.
- Bartlet, D. W.; Clough, J. M.; Godwin, J. R.; Hall, A. A.; Hamer, M.; Parr-Dobrzanski, B. 2002 The Strobilurin fungicides. *Pesticides and Management Science*, 58, 649-662.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Beutler, E.; Duron, O.; Kelly, B. M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-888.
- Binelli, A.; Cogni, D.; Parolini, M.; Riva, C.; Provini, A. 2009. Cytotoxic and genotoxic

- effects of in vitro exposure to Triclosan and Trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150 (1), 50-56.
- Busby Jr, W. F.; Ackermann, J. M.; Crespi, C. L. 1998. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 27 (2), 246-249.
- Camejo, G.; Wallin, B. Enojarvi, M. 1998. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. *Free radical and antioxidant protocols*. Humana Press, 377-387.
- Castro, T. F. D.; Souza, J. G. S.; Carvalho, A. F. S.; Assis, I. L.; Palmieri, M. J.; Vieira, L. F. A.; Marcussi, S.; Machado, M. R. F.; Murgas, L. D. S. 2018. Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based comercial product. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 62, 140-146.
- Colin, N.; Porte, C.; Fernandes, D.; Barata, c.; Padrós, F.; Carrassón, M.; Monroy, M.; Cano-Rocabayera, O.; Sostoa, A.; Pina, B.; Maceda-Veiga, A. 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of Total Environmental*, 540, 307-323.
- Clasen, B.; Loro, V. L.; Murussi, C. R.; Tietcher, T. L.; Moraes, B.; Zanella, R. 2018. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* in a rice-fish system. *Science of the Total Environment*, 626, 737-743.
- Dikic, D.; Mojsovic-Cuic, A.; Cupor, I.; Benkovic, V.; Horvat-Knezevic, A.; Lisicic, D.; Orsolcic, N. 2012. Carbendazim combined with imazalil or cypermethrin potentiate DNA damage in hepatocytes of mice. *Human and Experimental Toxicology*, 31 (5), 492-505.

- Ekinci, D.; Senturk, M. 2010. Interactions of fungicides and pesticides with specific enzymes. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/5d4c/8a04523566d61581014cd86b8a2254bb6549.pdf>>. Acesso em 20 dez 2019.
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres Jr, V.; Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7 (2), 88-95).
- Espenshade, P. J.; Hughes, A. L. 2007. Perulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 41, 401-427.
- Fernandes, M. N.; Moron, S. E. Respiração e adaptações respiratórias. 2014. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C. *Biologia e Fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. FUNEP, Jaboticabal, 203-231.
- Ferreira, D.; Motta, A. C.; Kreutz, L. C.; Toni, C.; Loro, V. L. 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere*, 79, 914-921.
- Gilmour, K. M.; Perry, S. F. 2009. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. *The Journal of Experimental Biology*, 212, 1647-1661.
- Grosell, M.; McGeer, J. C.; Wood, C. M. (2001). Plasma copper clearance and biliary copper excretion are stimulated in copper acclimated trout. *American Journal of Physiology*, 280, 796-806.
- Han, Y.; Liu, T.; Wang, J.; Zhang, C.; Zhu, L. 2016. Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133, 13-19.
- Jiang, J.; Wu, S.; Wu, C.; An, X.; Cai, L. 2014. Embryonic exposure to carbendazim induces the transcription of genes related to apoptosis, immunotoxicity and

- 
- endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 41, 493-500.
- Jiang, J.; Wu, S.; Wang, Y.; An, X.; Cai, L.; Zhao, X.; Wu, C. 2015. Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae development. *Toxicology in Vitro*, 29, 1473-1481.
- Johlin, F. C.; Fortman, C. S.; Nghiem D. D.; Tephly, T. R. 1987. Studies on the role of folic acid and folate-dependent enzymes in human methanol poisoning. *Molecular Pharmacology*, 31 (5), 557-561.
- Kao, C. M.; Ou, W.J.; Lin, h. D.; Eva, A. W.; Wang, T. L.; Chen, S. C. 2019. Toxicity of diuron in HepG2 cells and zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 432-438.
- Kaviraj, A.; Bhunia, F.; Saha, N. C. 2004. Toxicity of methanol to fish, crustacean, oligochaete worm, and aquatic ecosystem. *International Journal of Toxicology*, 23 (1), 55-63.
- Kaptaner, B.; Kankaya, E.; Dogan, A.; Çelik, I. 2014. Histopathology and oxidative stress in the liver of *Chalcalburnus tarichi* living in lake Van, Turkey. *Life Science Journal*, 11 (8).
- Karlsson, I.; Friberg, H.; Steinberg, C.; Persson, P. 2014. Fungicide effects of fungal community composition in the wheat phyllosphere. *Plos One*, 9 (11), 01-12.
- Keen, J. H.; Habig, W. H.; Jakoby, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *Journal of Biological Chemistry*, 251 (20), 6183-6188.
- Kumar, N.; Awoyemi, O.; Willis, A.; Schimitt, C.; Ramalingam, L.; Moustaid-Moussa, N.; Crago, J. 2019. Comparative lipid peroxidation and apoptosis in Embryo-Larval Zebrafish exposed to three azole fungicides, tebuconazole, propiconazole,

- and myclobutanil, at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology Chemistry*, 38 (7), 1455-1466.
- Lam, P. K. S. 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean & Coastal Management*, 52, 348-354.
- Ludwikowska, A.; Bojarski, B.; Socha, M.; Lutnika, H.; Trzeciak, K. B. 2013. The effect of carbendazim on embryonic Prussian carp (*Carassius gibelio*) development and hatching. *Archives of Polish Fisheries*, 21 (4), 367-371.
- Mezzelani, M.; Gorbi, S.; Da Ros, Z.; Fattorini, D.; d'Errico, G.; Milan, M.; Bargelloni, L.; Regoli, F. 2016. Ecotoxicological potential on non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 121, 31-39.
- Min, E. Y.; Kang, J. C. 2008. Effect of waterborne benomyl on the hematological and antioxidant parameters of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92, 138-143.
- Modesto, K. A.; Martinez, C. B. R. 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81 (6), 781-787.
- Moon, Y. S.; Kim, M.; Hong, C. P.; Kang, J. H.; Jung, J. H. 2019. Overlapping and unique toxic effects of three alternative antifouling biocides (Diuron, Irgarol 1051®, Sea-Nine 211®) on non-target marine fish. *Ecotoxicology and environmental safety*, 180, 23-32.
- Murussi, C.; Horn, R. C.; Santi, A.; Clasen, B. E.; Reis, G.; Souza, D.; Bortolotto, J. W.; Manfio, C. E.; Loro, V. L. 2014. Changes in oxidative markers, endogenous antioxidants and activity of the enzyme acetylcholinesterase in farmed exposed

- to agricultural pesticides – a pilot study. *Ciência Rural*, 44 (7), 1186-1193.
- Nikinmaa, M. 2014. *An Introduction to Aquatic Toxicology*. Elsevier, 87-98.
- Nwani, C. D.; Omah, M. C.; Ivoke, N.; Nwamba, H. O.; Ani, C.; Ogbonna, S. U. 2015. Biochemical, haematological and morphological variations in juvenile *Clarias gariepinus* exposed to Carbendazim fungicide. *African Journal of Aquatic Science*. 40 (1), 63-71.
- Owolabi, O. D.; Omotosho, J. S. 2017. Atrazine-mediated oxidative stress responses and lipid peroxidation in the tissues of *Clarias gariepinus*. *Iranian Journal of Toxicology*, 11 (2), 1-10.
- Olsvik, P. A.; Kroglund, F.; Finstad, B.; Kristensen, T. 2010. Effects of the fungicide azoxystrobin on Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolt. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1852-1861.
- Palanikumar, L.; Kumaraguru, A. K.; Ramakritnam, C. M.; Anand, M. 2012. Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75 (1), 187-197.
- PAN. Pesticide Action Network Europe. Carbendazim. Disponível em: <<https://www.pan-europe.info/old/Resources/Factsheets/PANE%20-%202014%20-%20Factsheet%20carbendazim%202014.pdf>>. Acesso em 13 jun. 2019.
- Patil, N. V.; Lonare, M. K.; Sharma, M.; Lalhriatpuia, P. C.; Saini, S. P. S.; Rampal, S. 2018. Hemato-Biochemical Alterations Mediated by Carbendazim Exposure and Protective Effects of Quercetin in Male Rats. *Toxicology International*, 25 (1), 7-18.
- Printes, L. B.; Callaghan, A. (2006). Atividade de Acetilcolinesterase em *Daphnia*: Um bom biomarcador de avaliação ambiental? *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v.1, n.1 89-92.

- Puymirat, A.; Etongue-Mayer, P.; Dussalt, J. H. 1995. Thyroid hormones stabilize acetylcholinesterase mRNA in Neuro-2A cells that overexpress the  $\alpha 1$  thyroid receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 30651-30656.
- Rodrigues, E. T.; Pardal, M. A.; Laizé, V.; Leonor Cancela, M.; Oliveira, P. J.; Serafim, T. L. 2015. Cardiomyocyte H9c2 cells present a valuable alternative to fish lethal testing for azoxystrobin. *Environmental Pollution*, 206, 619-626.
- Rodrigues, E. T.; Lopes, I.; Pardal, M. A. 2013. Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: A review. *Environmental International*, 53, p.18-28.
- Salamat, N.; Zarie, M. 2012. Using of fish pathological alterations to assess aquatic pollution: A review. *World Journal of fish and marine Sciences*, 4 (3), 223-231.
- Santos, C.; Oliveira, M. T.; Cólus, I. M. S.; Sofia, S. H.; Martinez, C. B. R. 2018. Expression of cyp 1<sup>a</sup> induced by benzo(A)pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 61, 30-37.
- Sancho, E.; Villaroel, M. J.; Fernández, E.; Andreu, M. D.; Ferrando, M. D. 2010. Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 370-376.
- Santi, A.; Menezes, C.; Duarte, M. M.; Leitemperger, J.; Lopes, T.; Loro, V. 2011. Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (in vitro). *Interdisciplinary Toxicology*, 4 (3), 149-153.
- Santos, D.; Matos, M.; Coimbra, A. M. 2014. Developmental toxicity of endocrine disruptors in early life stages of zebrafish, a genetic and embryogenesis study. *Neurotoxicology and Teratology*, 46, 18-25.

- Salamat, N.; Zarie, M. 2012. Using of fish pathological alterations to assess aquatic pollution: A review. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4 (3), 223-231.
- Selmanoglu, G.; Barlas, N.; Songur, S.; Koçkaya, E. A. 2001. Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. *Human & Experimental Toxicology*, 20, 625-630.
- Silva, A. R. R.; Santos, C.; Ferreira, N. G. C.; Morgado, R.; Cardoso, D. N.; Cruz, A.; Mendo, S.; Soares, A. M. V. M.; Loureiro, S. 2019. Multigenerational effects of carbendazim in *Daphnia magna*: From a subcellular to a population level. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38, 412-422.
- Silva, M. R.; Campos, A. C. E.; Bohm, F. Z. 2013 Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. *Revista Saúde e Biologia*, 8 (2), 46-58.
- Silva, A. R.; Cardoso, D. N.; Cruz, A.; Pestana, A. C.; Mendo, S.; Soares, A. M. V. M.; Loureiro, S. 2017. Multigenerational effects of Carbendazim in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36 (2), 383-394.
- Siviková, K.; Dianovsky, J.; Holecková, B.; Galdiková, M.; Kolesárová, V. 2013. Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to in vitro tebuconazole-based fungicide. *Chemosphere*, 92, 555-562.
- Skollness, S. Y.; Blanksma, C. A.; Cavallin, J. E.; Churchill, J. J.; Durhan, E. J.; Jensen, K. M.; Johnson, R. D.; Kahl, M. D.; Makynen, E. A.; Villeneuve, D. L.; Ankley, G. T. 2013 Propiconazole inhibits steroidogenesis and reproduction in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 132 (2), 284-297.
- Souza, L. F. C. B.; Montagner, C. C.; Almeida, M. B. Kuroda, E. K.; Vidal, C.; Freire, R. L. 2019. Determination of pesticides in the source and drinking Waters in Londrina, Paraná, Brazil. *Semina Ciências Agrárias*, 40 (3), 1153-1164.
- Toni, C.; Loro, V. L.; Santi, A.; Menezes, C. C.; Cattaneo, R.; Clasen, B. E.; Zanella,

- R. 2011. Exposure to tebuconazol in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 153, 128-132.
- Toni, C.; Ferreira, D.; Kreutz, L. C.; Loro, V. L.; Barcellos, L. J. G. 2011. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. *Chemosphere*, 83, 579-584.
- Velki, M.; di Paolo, C.; Nelles, J.; Seiler, T. B.; Hollert, H. 2017. Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. *Chemosphere*, 180, 65-76.
- Vieira, C. E. D.; Perez, M. R.; Acayaba, R. D. A.; Raimundo, C. C. M.; Dos Reis Martinez, C. B. 2018. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in diferente tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 195, 125-134.
- Vieira, C. E. D.; Costa, P. G.; Lunardelli, B.; Oliveira, L. F.; Cabrera, L. C.; Risso, W. E.; Primel, E. G.; Meletti, P. C.; Fillman, G.; Martinez, C. B. R. 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of Total Environmental*, 542, 44-56.
- Vieira, C. E. D.; Almeida, M. S.; Galindo, B. A.; Pereira, L.; Martinez, C. B. R. 2014. *Neotropical Ichthology*, 12 (1), 153-164.
- Vitale, A. M.; Montserrat, J. M.; Castilho, P.; Rodriguez, E. M. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapdidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and*

Endocrinology, 122(1), 121-129.

Zari, T. A.; Al-Attar, A. M. 2011. Therapeutic effects of olive leaves extract on rats treated with a sublethal concentrations of carbendazim. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 413-426.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de diferentes biomarcadores em um peixe neotropical exposto à fungicidas amplamente utilizados no Brasil e já descritos como contaminantes comumente presentes em ambientes aquáticos em diversas regiões do país. Este trabalho gerou três manuscritos (Capítulo 2, 3 e 4) a serem submetidos para avaliação e possível publicação em revistas científicas, de forma que a discussão referente aos trabalhos citados foi realizada individualmente. Este capítulo abordará as conclusões finais obtidas a partir das hipóteses levantadas no início deste estudo.

Com base nos resultados obtidos, a espécie *Prochilodus lineatus* se mostrou sensível aos fungicidas testados, o que resultou em estresse oxidativo, mesmo em exposições isoladas. Apesar de sua ampla utilização, estudos sobre os efeitos nocivos provocados pelos fungicidas a partir de contaminação ambiental ainda são escassos, principalmente com relação a sua presença em compartimentos aquáticos. Mesmo que estes fungicidas tenham sido encontrados em concentrações mais altas em diversas regiões do planeta, concentrações menores também foram capazes de promover alterações em biomarcadores de *P. lineatus*, fato que já é relatado em outras espécies de peixes.

As concentrações utilizadas nos experimentos com os fungicidas isolados (5, 50 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foram escolhidas com base em levantamento de concentrações já detectadas em corpos d'água, uma vez que a legislação CONAMA 357/2005 ainda não estabelece concentrações máximas permitidas para estes fungicidas. A concentração utilizada para o experimento da mistura dos fungicidas (100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de AZX, CBZ e TBZ foi escolhida como uma concentração intermediária entre as duas maiores concentrações e mais próxima das concentrações estabelecidas pela Portaria da Consolidação nº5/2017, que trata de potabilidade.

A escolha dos biomarcadores e dos órgãos analisados foi importante para a investigação dos efeitos adversos induzidos no peixe, uma vez que o fígado é o principal responsável pela biotransformação de xenobióticos, o cérebro e o músculo estão relacionadas à locomoção do peixe e sua interação com o ambiente e as brânquias têm papel fundamental na respiração e estão em contato direto com os

contaminantes.

Um dos nossos objetivos era verificar se a exposição aguda ao carbendazim (obtido a partir do produto *Derosal 500®*), em diferentes concentrações, seria capaz de induzir ao estresse oxidativo para a espécie estudada. Nosso trabalho demonstrou que o *P. lineatus* se mostrou sensível a este fungicida, uma vez que foi observada a diminuição do hematócrito, aumento na mobilização energética da glicose e maior concentração de GSH hepática e da atividade de AChE cerebral. O aumento da atividade da AChE como efeito ao composto, mesmo em um curto período de exposição (24 h) reforça que este é um biomarcador para avaliação da presença do fungicida. No entanto, não podemos afirmar que houve estresse oxidativo, uma vez que parece ter havido uma resposta compensatória com o aumento da GSH e controle de peroxidação lipídica.

Já com relação à exposição aguda ao TBZ, o trabalho demonstrou que o *P. lineatus* é sensível a este fungicida, uma vez que houve aumento da atividade de GST. A resposta de estresse também pode ser observada devido ao aumento da glicemia. Alterações na osmorregulação também foram observadas, com alteração em íons. Entretanto, pode-se observar que o solvente utilizado para a diluição do composto também foi capaz de promover efeitos nocivos aos peixes expostos.

A hipótese de que *P. lineatus* se mostraria sensível à mistura de agrotóxicos presentes na água de manancial do Rio Tibagi foi confirmada. Apesar de poucos efeitos terem sido observados, a diminuição na concentração da GSH hepática e o aumento na atividade da AChE cerebral e muscular reforçam a ideia de que o peixe pode ter sua saúde prejudicada mesmo quando os contaminantes estão em baixas concentrações.

A mistura de fungicidas promoveu alteração em diversos biomarcadores, o que corrobora a hipótese de que estes compostos precisam ser melhor estudados e seus efeitos monitorados. Uma resposta ao estresse provocada por contaminantes foi observada e condizente com o descrito na literatura para a espécie, com aumento do hematócrito e da glicemia. Apesar de escassas, as análises de alterações osmorregulatórias relacionadas a estes fungicidas, indicaram que a mistura foi capaz de afetar o equilíbrio iônico de *P. lineatus*. Ainda, a mistura afetou a defesa antioxidante, uma vez que foi observada a diminuição de GSH hepática. Os efeitos do TBZ e do AZX para a atividade da AChE ainda são controversos, no entanto, a mistura


de fungicidas foi capaz de afetar a AChE, com aumento da sua atividade, o que pode resultar em efeitos neurotóxicos importantes e que podem interferir na sobrevivência do animal.

Portanto, este trabalho indicou biomarcadores mais sensíveis para a exposição aos fungicidas testados, como o sódio plasmático e a atividade da AChE em situação de contaminação ambiental real, e mostrou os efeitos que podem causar em uma espécie de peixe neotropical. Estudos que monitorem e avaliem efeitos dos fungicidas em peixes neotropicais ainda são escassos, o que novamente reforça a importância deste trabalho para o entendimento das alterações que possam interferir na homeostase de *P. lineatus* e que possam afetar a sobrevivência da espécie.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### Aprovação dos procedimentos com animais pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina

 UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 154/2019

Londrina, 04 de Novembro de 2019

Prezado (a) professor (a),

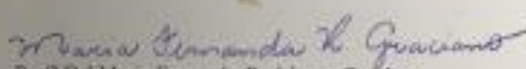
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "Análise integrada de biomarcadores para avaliação dos efeitos de fungicidas amplamente utilizados no Brasil, para um peixe neotropical" protocolo CEUA nº 17279.2019.28 sob a responsabilidade de Cláudia Bueno dos Reis Martinez, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL) em **04/11/2019**.

Este projeto tem por objetivo avaliar os efeitos dos fungicidas azoxistrobina, o carbendazim e o tebuconazol, isolados e em mistura, bem como os possíveis efeitos da água coletada na Estação de Tratamento de Água Tibagi (SANEPAR), por meio da análise de biomarcadores, integrando diferentes níveis de organização biológica, do molecular ao comportamental, utilizando-se como modelo biológico o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Grau de invisibilidade: 2.

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/12/2019 a 01/12/2020
Espécie/ linhagem/ raça	Peixe/ <i>Prochilodus lineatus</i>
Nº de animais	150
Peso/ Idade	Juvenis/10-15g
Sexo	Machos/Fêmeas
Origem	Psicultura Schneider, localizada em Toledo (PR)
Amostras a serem coletadas	Sangue, brânquias, fígado, cérebro, rim posterior e músculo

Cumpre orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UUEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais por o momento, subscrevo-me, cordalmente.

  
Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
Coordenadora da CEUA/UUEL

Profª Drª Maria Fernanda  
Rodrigues Graciano  
Coordenadora da Comissão de  
Ética no Uso de Animais  
Universidade Estadual de Londrina  
Instituição nº 71430-3371-0404

Ilmo(a) Sr.(a)  
Prof. (a) Dr. (a). Cláudia Bueno dos Reis Martinez  
Responsável pelo projeto  
Departamento de Ciências Fisiológicas /CCB  
C/C para a Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas CCB  
C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas