



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TIAGO TOMIAMA ALVIM

**“RESPOSTAS DE BIOMARCADORES GENOTÓXICOS E  
BIOQUÍMICOS EM DIFERENTES TECIDOS DO TELEÓSTEO  
*PROCHILODUS LINEATUS* APÓS EXPOSIÇÃO AOS  
INSETICIDAS LAMBDA-CIALOTRINA E IMIDACLOPRID,  
ISOLADOS E EM MISTURA”**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL



Programa de  
Pós-graduação em  
Genética e Biologia Molecular

TIAGO TOMIAMA ALVIM

**“RESPOSTAS DE BIOMARCADORES GENOTÓXICOS E  
BIOQUÍMICOS EM DIFERENTES TECIDOS DO TELEÓSTEO  
*PROCHILODUS LINEATUS* APÓS EXPOSIÇÃO AOS  
INSETICIDAS LAMBDA-CIALOTRINA E IMIDACLOPRID,  
ISOLADOS E EM MISTURA”**

TIAGO TOMIAMA ALVIM

**“RESPOSTAS DE BIOMARCADORES GENOTÓXICOS E  
BIOQUÍMICOS EM DIFERENTES TECIDOS DO TELEÓSTEO  
*PROCHILODUS LINEATUS* APÓS EXPOSIÇÃO AOS  
INSETICIDAS LAMBDA-CIALOTRINA E IMIDACLOPRID,  
ISOLADOS E EM MISTURA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina  
2018

TIAGO TOMIAMA ALVIM

**“RESPOSTAS DE BIOMARCADORES GENOTÓXICOS E  
BIOQUÍMICOS EM DIFERENTES TECIDOS DO TELEÓSTEO  
*PROCHILODUS LINEATUS* APÓS EXPOSIÇÃO AOS INSETICIDAS  
LAMBDA-CIALOTRINA E IMIDACLOPRID, ISOLADOS E EM  
MISTURA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Delfino Vieira  
Universidade Estadual do Norte do Paraná -  
UNOPAR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Margarete Cestari  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 10 de julho de 2018.

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

Alvim, Tiago Tomiama.

Respostas de biomarcadores genotóxicos e bioquímicos em diferentes tecidos do teleosteo *Prochilodus lineatus* após exposição aos inseticidas lambda-cialotrina e imidacloprid, isolados e em mistura / Tiago Tomiama Alvim. - Londrina, 2018.  
71 f. : il.

Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Biomarcadores Genotóxicos e Bioquímicos - Tese. 2. Inseticidas isolados e em mistura - Tese. 3. Ecotoxicologia aquática - Tese. I. Martinez, Claudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelas bênçãos que já recebi e se hoje cheguei aonde estou foi porque eu tive fé para superar qualquer dificuldade imposta a mim.

Agradeço aos meus pais, Satsuki e Israel, por sempre me apoiarem em minhas decisões e acreditarem que eu sou capaz de alcançar os meus objetivos e superá-los. Sou e serei eternamente grato por tudo que vocês fizeram e fazem por mim. Eu tenho orgulho de ser filho de vocês. Amo vocês.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e à Universidade Estadual de Londrina (UEL). Ao órgão financiador CAPES pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

Agradeço profundamente a minha orientadora profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez, por me receber como aluno de mestrado no seu laboratório, pela excelente orientação, pelos vários ensinamentos e sábios conselhos, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis, pelas palavras de conforto quando tudo parecia desabar, pelas correções e incentivos. Obrigado por sua dedicação, que a fez, por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e me orientar. Sem a sua orientação, apoio, confiança e amizade, este trabalho jamais teria saído. Você é a pessoa que me inspira a ser um profissional melhor. Obrigado por tudo prof.

Agradeço aos membros da banca examinadora da defesa do meu mestrado, profa. Dra. Marta Margarete Cestari e prof. Dr. Carlos Eduardo Delfino Vieira, pela disponibilidade em colaborar com o nosso trabalho.

A profa. Dra. Juliana Mara Serpeloni e prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani pelas contribuições que fizeram ao meu trabalho no meu exame de qualificação.

Ao prof. Dr. Dhiego Gomes Ferreira, que além de amigo, é um excelente professor. Se hoje estou finalizando o mestrado foi porque você acreditou do que eu era capaz e me ajudou a chegar até aqui.

A profa. Dra. Silvia Helena Sofia, pelos ensinamentos, pela disponibilidade em sempre tirar minhas dúvidas e pelas oportunidades oferecidas a mim para sempre estar melhorando como profissional.

Agradeço ao Carlão, que desde o começo dessa jornada no mestrado, sempre me ajudou, me ensinando praticamente tudo o que sei dentro de um

laboratório, sempre me tirando todas as dúvidas que surgiam ao longo dessa trajetória, ensinando 2-3x até eu sanar todas as minhas dúvidas. Obrigado pelas dicas, pelos ensinamentos, pela parceria. Você, assim como a Claudia, é a minha inspiração para sempre estar melhorando profissionalmente. Obrigado por tudo meu amigo.

Agradeço a Jess, Mari, Mozinha e J, meus amigos-irmãos. Obrigado por sempre estarem ao meu lado, sempre me apoiando, me dando forças para seguir adiante em todos os meus desafios, além de, sempre me ajudarem sem eu nem mesmo pedir. Obrigado por me proporcionarem momentos de descontração incríveis. Adoro vocês.

Agradeço a Carol e a Angélik, pelos bons conselhos e puxões de orelha quando eu precisava, por sempre tirarem minhas dúvidas cabulosas, até mesmo no meio da madrugada, por tentarem me ajudar a manter a calma sempre quando eu estava desesperado com alguma coisa, por sempre estarem dispostas a me ajudar quando eu mais precisava. Obrigado pelos ensinamentos e claro, pelas ótimas gargalhadas todos os dias por causa de alguma zuera. Vocês se tornaram minha família em Londrina. Adoro vocês.

Agradeço a todos do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA): Ana Flávia, Angélik, Carlão, Carol, Cássia, Duda, Gabi, Hellen, Jess, Jheimison, Ju, Kathya, Laís, Laura Fernanda, Laurinha Lui, Lu, Mari, Millena, Paulo, Thais e Vanessa, que contribuíram em peso com esse trabalho, além de, me proporcionar muitas risadas e momentos incríveis nesses 2 anos de convivência. Obrigado por me acolherem de braços abertos e me ensinarem muito do que sei hoje.

Agradeço ao técnico do laboratório Dr. Wagner Ezequiel Risso que contribuiu massivamente em minhas amostragens e me socorreu diversas vezes quando eu precisava de algum tipo de ajuda relacionado ao laboratório.

As alunas de Iniciação Científica Júnior: Lana, Gabizinha e Laurinha, que me deram uma super ajuda em diversas análises realizadas no laboratório, demonstrando um enorme cuidado e responsabilidade em tudo que faziam no LEFA.

Ao pessoal de outros laboratórios: Lennara, Lucas Johnen, Mari Terra, Moema e Same que me ajudaram em algumas amostragens e perderam algumas tardes me ajudando a dissociar órgãos para o ensaio do cometa.

Agradeço a todos que me ajudaram direta e indiretamente neste trabalho.

ALVIM, Tiago Tomiama. **Respostas de biomarcadores genotóxicos e bioquímicos em diferentes tecidos do teleósteo *prochilodus lineatus* após exposição aos inseticidas lambda-cialotrina e imidacloprid, isolados e em mistura.** 2018. 71f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Atualmente, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, dentre eles destacam-se o inseticida piretroide Lambda-cialotrina (LC) e o neonicotinoide Imidacloprid (IMI). Resíduos de inseticidas podem atingir os ecossistemas aquáticos e promover riscos para organismos não-alvo, ameaçando o equilíbrio ecológico e a biodiversidade. Como resultado, esses organismos são expostos a uma mistura de agrotóxicos que podem causar efeitos subletais, como danos genéticos e oxidativos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos inseticidas LC (150 ng L<sup>-1</sup>) e IMI (100 µg L<sup>-1</sup>), isolados e em mistura, para juvenis do teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus*, após exposições de 48, 96, 144 e 192 h. Para tanto, foi avaliada a ocorrência de danos no DNA em células branquiais, sanguíneas, hepáticas e cerebrais, de alterações eritrocíticas nucleares (AENs) em eritrócitos e de danos oxidativos (carbonilação de proteínas e lipoperoxidação) em brânquias, fígado e cérebro. Os inseticidas isolados induziram danos no DNA em eritrócitos, células branquiais, cerebrais e hepatócitos, em diferentes tempos, além de promover aumento na frequência de AENs nos maiores tempos, revelando-se potencialmente genotóxicos. Os peixes expostos à LC+IMI apresentaram aumento na ocorrência de danos no DNA em eritrócitos, células branquiais, cerebrais e hepatócitos, apresentando indícios de interação sinérgica em tempos mais curtos, no sangue e no fígado. Além disso, a LC+IMI promoveu aumento na frequência de AENs em todos os tempos de exposição. No caso de danos oxidativos, a mistura promoveu aumento da carbonilação de proteínas e da lipoperoxidação em brânquias e fígado nos menores tempos, reforçando a ideia de uma interação sinérgica. Dado o aumento constante no uso e venda desses produtos, é provável que suas concentrações nas águas superficiais e nos sedimentos também aumentem, tornando-se particularmente prejudiciais aos peixes, vulneráveis aos efeitos da exposição ao LC e ao IMI, tanto isolados quanto em mistura.

**Palavras-chave:** Danos no DNA. Estresse oxidativo. Piretroides. Neonicotinoides.

ALVIM, Thiago Tomiama. **Genotoxic and biochemical biomarker responses in different tissues of the linear filament process after exposure to lambda-cyhalothrin and imidacloprid insecticides, samples and mixture.** 2018. 71p. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Currently, Brazil is the largest consumer of pesticides in the world, among them the pyrethroid insecticide Lambda-cyhalothrin (LC) and the neonicotinoid Imidacloprid (IMI). Insecticide residues can reach aquatic ecosystems and affect non-target organisms, threatening ecological balance and biodiversity. As a result, these organisms are exposed to a mixture of pesticides that can cause sublethal effects, such as genetic and oxidative damages. The aim of this study was to evaluate the effects of LC ( $150 \text{ ng L}^{-1}$ ) and IMI ( $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolated and mixed, for juveniles of the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*, after 48, 96, 144 and 192 h. For this purpose, DNA damage in gills, blood, hepatic and brain cells, erythrocytic nuclear abnormalities (ENA) in erythrocytes and oxidative damage (carbonyl content and lipid peroxidation) in gills, liver and brain were evaluated. Isolated insecticides induced DNA damage in erythrocytes, gill cells, brain cells and hepatocytes at different times, in addition lead to an increase in the frequency of ENA after longer exposure periods (144 and 192h), which were potentially genotoxic. Fish exposed to LC + IMI showed increased DNA damage in erythrocytes, gill cells, brain and hepatocytes, indicating synergistic interaction in shorter times (48 and 96h) in the blood and liver. In addition, LC + IMI promoted an increase in the frequency of ENA at all exposure times. In the case of oxidative damage, the mixture promoted an increase of carbonyl content and lipid peroxidation in gills and liver after the shortest exposure (48h), reinforcing the idea of a synergistic interaction. Given the increase in the use of these insecticides, their concentrations in surface waters and sediments are also likely to increase, making them particularly harmful to fish, which are vulnerable to the effects of LC and IMI, both in alone as in mixture.

**Keywords:** DNA damage. Oxidative stress. Pyrethroids. Neonicotinoids.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Taxa de crescimento do mercado de agrotóxicos, mundo x Brasil ..... 17
- Figura 2** – Consumo de agrotóxicos e afins no Brasil (2000 – 2016). ..... 17
- Figura 3** – Representação das fontes, vias de dissipação e degradação de agrotóxicos em águas superficiais. .... 18
- Figura 4** – Estrutura química dos dois isômeros do Lambda-cialotrina ..... 19
- Figura 5** – Estrutura química do inseticida neonicotinoide Imidacloprid ..... 22
- Figura 6** – Ordem sequencial dos efeitos dos contaminantes para os organismos aquáticos ..... 25
- Figura 7** – Exemplar de juvenil de *Prochilodus lineatus* ..... 29

### MANUSCRITO

- Figura 8** – Escore de danos no DNA nas brânquias (A), sangue (B), fígado (C) e cérebro (D) de *Prochilodus lineatus* expostos aos inseticidas LC (150 ng L<sup>-1</sup>) e IMI (100 µg L<sup>-1</sup>) isolados e em mistura (LC+IMI) por 48, 96, 144 e 192 h. .... 53
- Figura 9** – Frequência das classes de nucleóides danificados de brânquias (A), sangue (B), fígado (C) e cérebro (D) de *Prochilodus lineatus* expostos aos inseticidas LC (150 ng L<sup>-1</sup>) e IMI (100 µg L<sup>-1</sup>) isolados e em mistura (LC+IMI) por 48, 96, 144 e 192 h ..... 54
- Figura 10** – Frequência total de AENs (A) e de micronúcleos (MN) (B), núcleos em forma de rim (NR) (C), núcleos lobulados (NL) (D), núcleos segmentados (NS) (E) e células binucleadas (BN) (F) em eritrócitos de *P. lineatus* expostos aos inseticidas LC (150 ng L<sup>-1</sup>) e IMI (100 µg L<sup>-1</sup>) isolados e em mistura (LC+IMI) por 48, 96, 144 e 192 h. .... 55
- Figura 11** – Carbonilação de proteínas (PCO) em brânquias (A), fígado (B) e cérebro (C) de *Prochilodus lineatus* expostos aos inseticidas LC (150 ng L<sup>-1</sup>) e IMI (100 µg L<sup>-1</sup>) isolados e em mistura (LC+IMI) por 48, 96, 144 e 192 h ..... 57

**Figura 12** – Lipoperoxidação (LPO) em brânquias (A), fígado (B) e cérebro (C) de *Prochilodus lineatus* expostos aos inseticidas LC (150 ng L<sup>-1</sup>) e IMI (100 µg L<sup>-1</sup>) isolados e em mistura (LC+IMI) por 48, 96, 144 e 192 h .....58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adição de Concentração
AENS	Alterações eritrocíticas nucleares
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHE	Barreira hematoencefálica
BHT	Butilhidroxitolueno
BSA	Albumina de soro bovino
CB	Células binucleadas
CCME	Canadian Council of Ministers of the Environment
CL 50	Concentração letal média
CTR	Controle
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EP	Erro padrão
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EXTONET	Extension Toxicology Network
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IA	Ação independente
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IMI	Imidacloprid
LC	Lambda-cialotrina
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
MN	Micronúcleo
nAChR	Receptores nicotínicos de acetilcolina
NL	Núcleo lobulado
NR	Núcleo com constrição ou em “forma de rim”
NS	Núcleo segmentado
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxil
PCO	Carbonilação de proteínas
SBF	Soro bovino fetal
TBARS	Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UFPR	Universidade Federal do Paraná

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1	O uso de agrotóxicos – Contaminação aquática por inseticidas .....	16
2.2	Inseticidas piretroides – Lambda-cialotrina (LC) .....	18
2.3	Inseticidas neonicotinoides – Imidacloprid (IMI) .....	20
2.4	Interação entre os inseticidas .....	23
2.5	Biomarcadores de contaminação aquática.....	24
2.5.1	Biomarcadores Genotóxicos .....	25
2.5.2	Biomarcadores Bioquímicos.....	27
2.6	<i>Prochilodus lineatus</i> : Um Modelo Biológico Para Estudos De Ecotoxicologia Aquática No Brasil.....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
3.1	Objetivo geral .....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>4</b>	<b>MANUSCRITO</b> .....	42
	<b>RESUMO</b> .....	43
4.1	INTRODUÇÃO .....	44
4.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	46
4.2.1	<i>Desenho experimental</i> .....	46
4.2.2	<b>Análises genotóxicas</b> .....	47
4.2.2.1	<i>Análises de danos no DNA – Ensaio do cometa</i> .....	47
4.2.2.2	<i>Alterações eritrocíticas nucleares totais (AENs totais)</i> .....	46
4.2.3	<i>Análises bioquímicas</i> .....	49
4.2.3.1	<i>Carbonilação de proteínas (PCO)</i> .....	49
4.2.3.2	<i>Lipoperoxidação (LPO) – Ensaio TBARS</i> .....	49
4.2.3.3	<i>Proteínas totais</i> .....	50
4.2.4	<i>Análises estatísticas</i> .....	50

4.3	RESULTADOS .....	51
4.3.1	<i>Ensaio do cometa</i> .....	51
4.3.2	<i>Alterações eritrocíticas nucleares totais (AENs totais)</i> .....	52
4.3.3	<i>Carbonilação de proteínas (PCO)</i> .....	56
4.3.4	<i>Lipoperoxidação (LPO)</i> .....	56
4.4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	59
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	71

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os sistemas de produção agrícola baseados no uso intensivo da terra e na aplicação contínua de agrotóxicos, acabam ocasionando uma ameaça direta aos organismos aquáticos, já que esses compostos serão inevitavelmente levados para corpos de água onde eles podem se acumular (AMARAL et al., 2018).

O Brasil, a partir de 2008, ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior consumidor de agrotóxicos do mundo, consumindo mais de 500 mil toneladas de agrotóxicos em 2016 (IBAMA, 2017). Neste cenário, destacam-se os inseticidas, que correspondem a 12% do mercado brasileiro (ANVISA; UFPR, 2012). Dentre eles, estão os inseticidas piretroides, que estão entre as classes de agrotóxicos mais utilizados na agricultura, devido ao seu uso contra uma gama de insetos-alvo (BACCHETTA et al., 2014) e os neonicotinoides, que têm sido a classe de inseticidas que mais cresce, devido à sua alta eficácia contra um amplo espectro de insetos, além de, suas propriedades sistêmicas, que permitem o revestimento de sementes, sua baixa toxicidade para vertebrados e por não se acumularem nos tecidos adiposos, devido a sua natureza hidrofílica (EXTOXNET, 1996; TOMLIN, 2000; JESCHKE et al., 2010; SANCHÉZ-BAYO, 2018).

Nas áreas agrícolas, misturas de inseticidas são constantemente usadas para melhorar a eficácia e reduzir o custo do tratamento de pragas de culturas, podendo resultar em toxicidade combinada para diversos organismos, visto que, os inseticidas podem interferir na desintoxicação um do outro, podendo ocasionar diminuições em suas metabolizações, aumentando assim, suas toxicidades (LOUREIRO et al., 2009; BACCHETTA et al., 2014; FAI; KINFACK; TOWA, 2017). O uso de piretroides em combinação com inseticidas neonicotinoides são comuns na agricultura (XIA et al., 2016; REGAN, et al., 2017). Dentre essas combinações que têm sido utilizadas contra uma variedade de insetos-praga em todo o mundo, estão os inseticidas Lambda-cialotrina (LC) e o Imidacloprid (IMI) (WANG et al., 2015).

Como resultado do uso extensivo, esses inseticidas são encontrados em diversos compartimentos ambientais e levam à contaminação de recursos de água doce, de modo que muitos organismos que habitam esses locais estão expostos a esses produtos (VAN DER SLUIJS et al., 2015). O inseticida LC já foi encontrado no sedimento de regiões de produção de soja na América do Sul (Argentina e Paraguai) em concentrações que variaram de 0,42 a 16,57 ng g<sup>-1</sup>. No Brasil já foram

detectadas concentrações de 1,32 ng g<sup>-1</sup> (HUNT et al., 2016) até 60 ng g<sup>-1</sup> de LC (POSSAVATS et al., 2014) no sedimento da bacia hidrográfica do rio Cuiabá. Em águas superficiais a LC já foi encontrada em uma concentração de 0,02 µg L<sup>-1</sup> em uma bacia hidrográfica de Gana, próxima a um cultivo de cacau (AFFUM et al., 2018). Por sua vez, o IMI já foi observado em águas superficiais em uma concentração de até 320 µg L<sup>-1</sup> na Holanda (VAN DIJK et al., 2013). Em um rio da Espanha já foram detectadas concentrações de IMI variando de 1,64 ng L<sup>-1</sup> a 14,96 ng L<sup>-1</sup> (SHUKLA et al., 2017). No Brasil, esse inseticida foi identificado em ambientes aquáticos influenciados por atividades agrícolas nas concentrações de 2,18 µg L<sup>-1</sup> (BORTOLUZZI et al., 2006) e 3,65 µg L<sup>-1</sup> (BECKER et al., 2009). Além disso, o IMI já foi encontrado no reservatório de Passo Real, na bacia hidrográfica do Alto Jacuí no Rio Grande do Sul em concentrações que variam de 0,02 a 0,04 µg L<sup>-1</sup> (AMARAL et al., 2018).

Diante disso, para melhor elucidar os efeitos nos peixes, podemos utilizar os biomarcadores, que são de extrema importância em estudos ecotoxicológicos para a avaliação da toxicidade resultante da exposição a inseticidas (JANZ, 2013). Dentre esses, podemos citar os biomarcadores de genotoxicidade, como os danos ao DNA, a frequência de micronúcleo (MN) e alterações eritrocíticas nucleares (AENs) e os biomarcadores de danos oxidativos, como a carbonilação de proteínas (PCO) e a lipoperoxidação (LPO).

Alguns estudos já demonstraram que o inseticida LC é altamente tóxico para diferentes espécies de peixes, como observado pelos valores de concentração letal média (CL50) demonstrado por He et al. (2008), que variam de 0,8 ng L<sup>-1</sup> para *Cyprinodon variegatus* até 240 ng L<sup>-1</sup> para a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. O inseticida IMI mostrou-se menos tóxico para peixes que a LC, como observado pelos altos valores de concentração letal média (CL50) demonstrado por Gibbons et al. (2015), que variam de 83 mg L<sup>-1</sup> para a truta arco-íris *O. mykiss* até 241 mg L<sup>-1</sup> para *Danio rerio*.

Apesar desses inseticidas terem sido relatados no sedimento e em águas superficiais em concentrações inferiores às que causam a mortalidade de diferentes espécies de peixes (HE et al., 2008; GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015), em testes de laboratório, concentrações subletais de LC e IMI já causaram danos oxidativos e danos no DNA em peixes (PINER; ÜNER, 2012; ITURBURU et al., 2016, VIEIRA et al., 2018). Entretanto, faltam estudos sobre os efeitos subletais

desses inseticidas em combinação em peixes neotropicais, visto que, um composto pode afetar na desintoxicação metabólica de outro, podendo assim, interferir em sua toxicidade (KHAN et al., 2013; FAI; KINFACK; TOWA, 2017).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e oxidativos dos inseticidas Lambda-cialotrina e Imidacloprid, isolados e em mistura, para o teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus* em 4 períodos distintos de tempo (48, 96, 144 e 192 h). Este peixe é uma espécie de água doce, migratória e amplamente distribuída nos rios da América do Sul, é ecologicamente e economicamente importante, compreendendo uma grande parte da ictiomassa (TAYLOR; FLECKER; HALL, 2006; BARROCA et al., 2015). Caracteriza-se como uma espécie de hábito detritívoro, que está exposta às substâncias químicas tanto presentes na água como aquelas retidas no sedimento (MARTINEZ; CÓLUS, 2002). Além disso, esta espécie é comumente utilizada em testes de toxicidade devido à sua sensibilidade a diferentes classes de contaminantes, como os agrotóxicos (PEREIRA et al., 2013; VIEIRA et al., 2018).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O USO DE AGROTÓXICOS – CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR INSETICIDAS

A modernização agrícola baseia-se no conceito de produtividade máxima, com intensa exploração de recursos naturais, dependendo cada vez mais de agrotóxicos, fornecendo desta maneira, novos riscos ambientais devido a contaminação ocasionada por esses produtos (CARNEIRO et al., 2012; MILHOME et al., 2015). A lei dos agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002), define os agrotóxicos como produtos de processos físicos, químicos ou biológicos, designados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, cuja função seja modificar a composição da flora ou da fauna, com o propósito de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989, 2002).

Em relação ao Brasil, o país ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior consumidor de agrotóxicos do mundo em 2008. Entre os anos de 2000 a 2010, enquanto o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%, movimentando cerca de US\$ 7,3 bilhões e representando 19% do mercado mundial de agrotóxicos em 2010. (ANVISA; UFPR, 2012; CARNEIRO et al., 2012) (Fig. 1). Em 2016, o consumo de agrotóxicos e afins no Brasil ultrapassou mais de 500 mil toneladas no país (IBAMA, 2017) (Fig. 2).

No mercado brasileiro de agrotóxicos, existe uma centralização de consumo em determinadas categorias de produtos. Os herbicidas, correspondem a 45% do total de agrotóxicos comercializados, os fungicidas a 14%, os inseticidas a 12% e as demais categorias de agrotóxicos abrangem 29% do mercado nacional (ANVISA; UFPR, 2012).

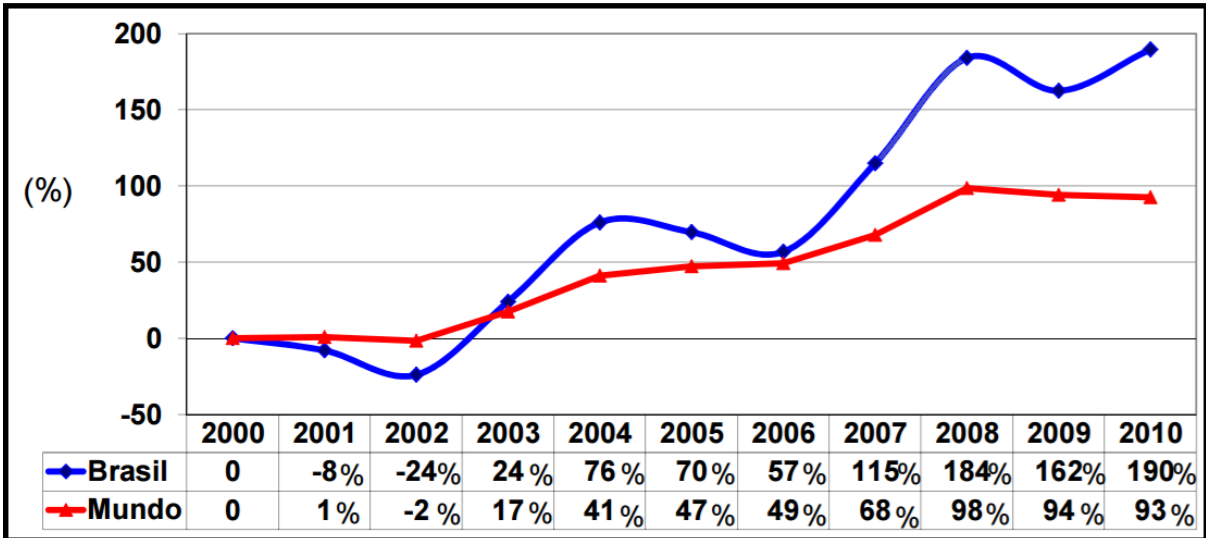


Figura 1 - Taxa de crescimento do mercado de agrotóxicos, mundo x Brasil. Fonte: Relatório do Mercado de Agrotóxicos ANVISA; UFPR, 2012.

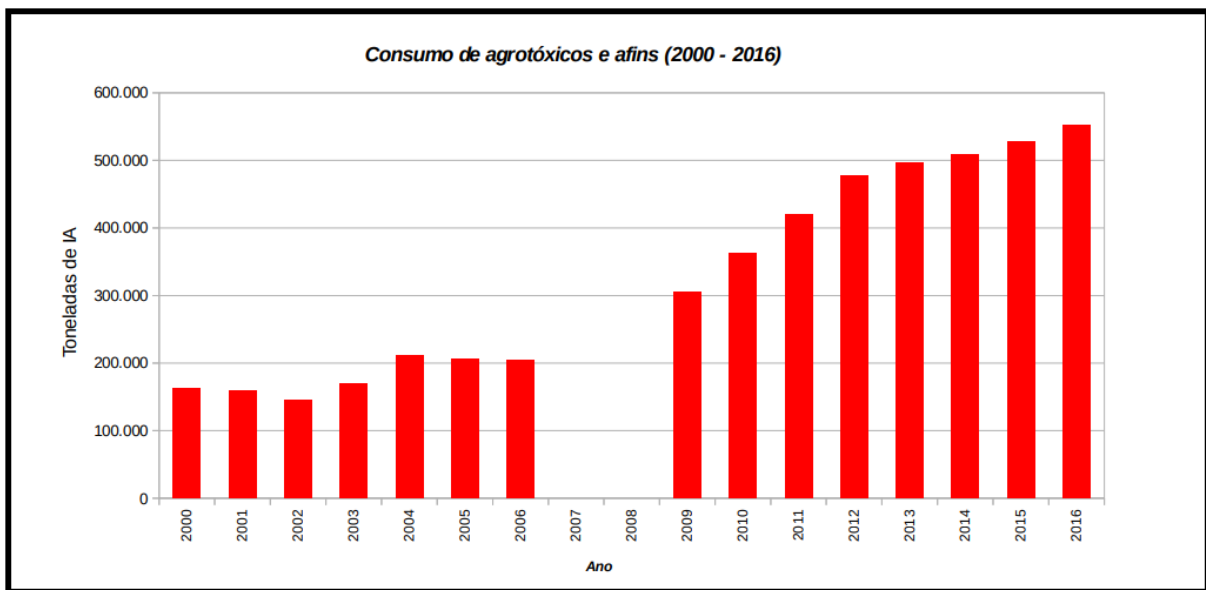
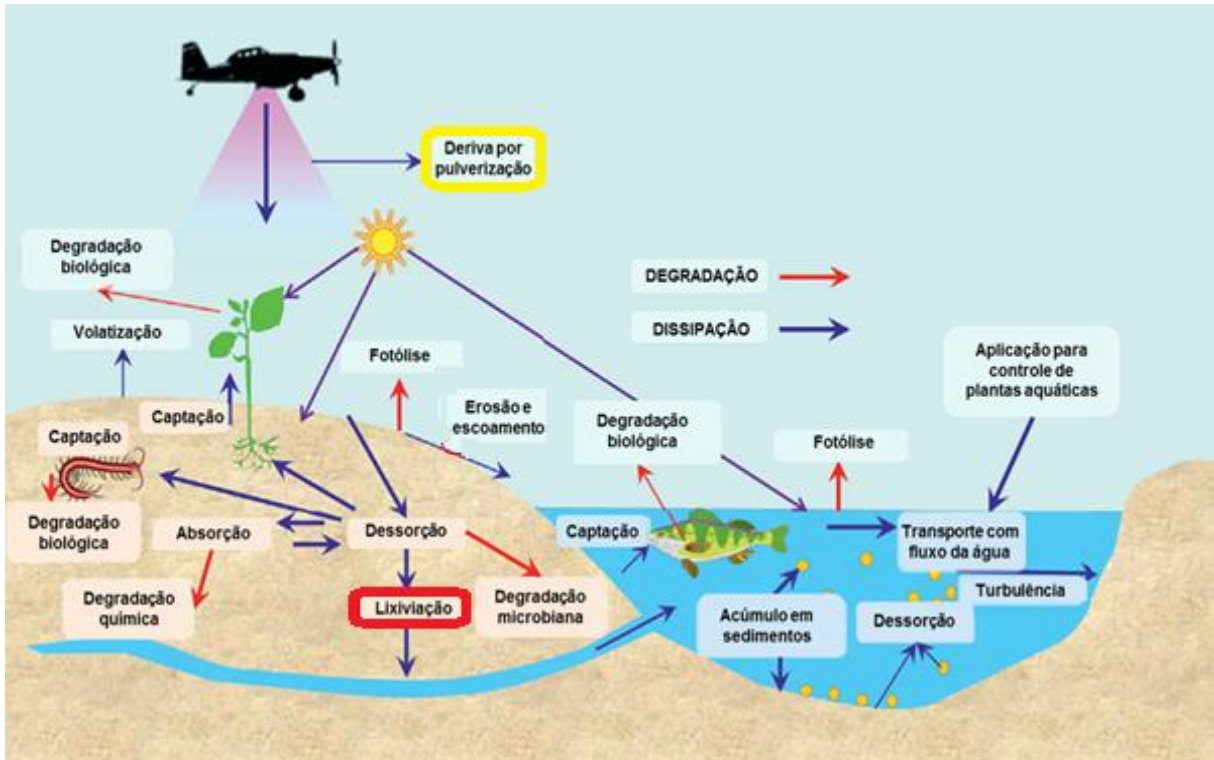


Figura 2 - Consumo de agrotóxicos e afins no Brasil (2000 – 2016). Fonte: IBAMA, 2017.

A crescente dependência global do uso de inseticidas, tem originado preocupações sobre seus impactos na biodiversidade e no funcionamento do ecossistema (VAN DER SLUIJS et al., 2015). Como resultado do uso extensivo, estas substâncias são encontradas em todos os compartimentos ambientais, ocasionando uma contaminação generalizada de recursos de água doce e zonas úmidas, significando que muitos organismos que habitam esses locais, como por exemplo, os peixes, estão sendo expostos a concentrações subletais relativamente baixas desses produtos (VAN DER SLUIJS et al., 2015).

Os inseticidas podem ser transportados para águas superficiais principalmente, pela deriva por pulverização transportada por correntes aéreas, pela erosão e escoamento ou lixiviação do solo, que são rotas iminentes de contaminação dos ecossistemas aquáticos, dessa maneira, uma vez aplicado, esses compostos podem ser degradados ou dissipados (SOLOMON et al., 2013) (Fig 3).



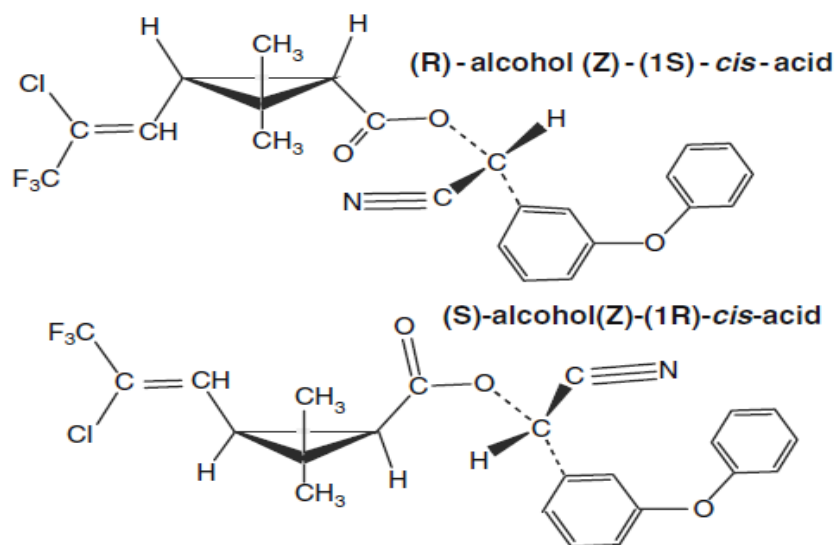
**Figura 3** - Representação das fontes, vias de dissipação e degradação de agrotóxicos em águas superficiais. Retângulo vermelho representa a principal via de entrada de inseticidas neonicotinoides e o retângulo amarelo representa a principal via de entrada de inseticidas piretroides nos ambientes aquáticos. Fonte: adaptado de SOLOMON et al., 2013.

## 1 2.2 Inseticidas piretroides – Lambda-cialotrina (LC)

O uso de inseticidas piretroides é extenso em todo o mundo e estão entre as classes de agrotóxicos mais utilizadas (BACCHETTA et al., 2014). São empregados principalmente na agricultura, na cultura de soja, algodão, cereais, batatas, arroz, entre outros (HE et al., 2008; CORCELLAS; ELJARRAT; BARCELÓ, 2015). Os piretroides são produtos químicos que são muito semelhantes em estrutura às piretrinas (inseticidas naturais derivados da planta de crisântemo), estruturalmente possuem de 2 a 3 centros quirais, significando que dispõem de 2 ou 4 diastereoisômeros e 4 ou 8 enantiômeros (JUREWICZ et al., 2014; CORCELLAS; ELJARRAT; BARCELÓ, 2015).

Existem dois grupos de piretroides, denominados Tipo I e Tipo II. Quimicamente os piretroides do Tipo II distinguem-se do Tipo I pela presença de um grupo  $\alpha$ -ciano na sua estrutura (HE et al., 2008). Em comparação com os piretróides do Tipo I, que exercem a sua neurotoxicidade principalmente por meio da interferência com a função dos canais de sódio no sistema nervoso central, os piretróides do Tipo II, também podem afetar os canais de cloreto e cálcio (BURR; RAY, 2004). Eles se ligam a estes canais e impedem que eles se fechem normalmente, o que resulta em uma estimulação nervosa contínua pelo influxo contínuo de íons, assim, os organismos intoxicados perdem o controle de seu sistema nervoso e são incapazes de produzir um movimento coordenado (HE et al., 2008; PALMQUIST; FAIRBROTHER; SALATAS, 2012). Em organismos não-alvo, como peixes, os inseticidas piretroides podem causar efeitos genotóxicos, danos oxidativos, redução da competência sexual, reprodutiva e de fertilidade (AHMAD; KHAN; KHAN, 2012; FETOUI et al., 2013; KAVIRAJ; GUPTA, 2014).

Um dos inseticidas piretroides do tipo II mais amplamente utilizados é a Lambda-cialotrina (LC): (R)- $\alpha$ -ciano-3-phenoxybenzyl (1S,3S)-3-[(Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoropropenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (S)- $\alpha$ -ciano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-[(Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoropropenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (Fig. 4), que geralmente é usada em uma diversa gama de culturas (HE et al., 2008; BACCHETTA et al., 2014).



**Figura 4** - Estrutura química dos dois isómeros do Lambda-cialotrina. Fonte: HE et al., 2008.

Devido à natureza lipofílica dos piretroides, as membranas biológicas e tecidos dos organismos alvos podem facilmente absorvê-los. Diante disso, o inseticida LC penetra na cutícula do inseto, interrompendo a condução nervosa em minutos, o que leva à cessação da alimentação, perda de controle muscular, paralisia e morte eventualmente (HE et al., 2008).

Como a LC é comumente aplicado em campos de arroz para controlar insetos, a possível contaminação de água e sedimentos pode levar à toxicidade em organismos aquáticos. Esse inseticida já foi encontrado no sedimento de regiões de produção de soja na América do Sul (Argentina e Paraguai) em concentrações que variam de 0,42 – 16,57 ng g<sup>-1</sup>, no Brasil, a concentração encontrada foi de 1,32 ng g<sup>-1</sup> (HUNT et al., 2016). Já Possavatz et al. (2014) encontrou a concentração de 60 ng g<sup>-1</sup> de LC no sedimento da bacia hidrográfica do rio Cuiabá. Em águas superficiais a LC já foi encontrada em uma concentração de 0,02 µg L<sup>-1</sup> em uma bacia hidrográfica de Gana, próxima a um cultivo de cacau (AFFUM et al., 2018).

Estudos já mostraram que este inseticida é altamente tóxico para diferentes organismos aquáticos, como demonstrado pelos valores de concentração letal média CL50 – 96 h: 360 ng L<sup>-1</sup> para a *Daphnia magna*; 0,8 ng L<sup>-1</sup> para a carpa *Cyprionodum variegatus*; 210 ng L<sup>-1</sup> para o “bluegill” *Lepomis macrochirus* e 240 ng L<sup>-1</sup> para a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (HE, et al., 2008). Além disso, alguns estudos já observaram efeitos genotóxicos em *Gambusia affinis* e danos oxidativos em *Oreochromis niloticus* e *Piaractus mesopotamicus*. (MURANLI; GÜNER, 2011; PINER; ÜNER, 2012; BACCHETTA et al, 2014).

### 2.3 INSETICIDAS NEONICOTINOIDES – IMIDACLOPRID (IMI)

Nos últimos anos, os neonicotinoides têm sido a classe de inseticidas que mais cresce na proteção das culturas contra insetos-praga, devido à sua alta eficácia contra um amplo espectro de insetos e a versatilidade de seu uso, juntamente com o fato de serem potentes em baixas doses, não voláteis e altamente solúveis em água (EXTOXNET, 1996; TOMLIN, 2000; JESCHKE et al., 2010).

Eles atuam sistematicamente, protegendo todas as partes da cultura e são amplamente aplicados no tratamento de sementes (GOULSON, 2013). O potencial de lixiviação em águas superficiais é uma das principais preocupações em torno do uso extensivo de neonicotinoides em campos agrícolas, especialmente aqueles

próximos a corpos d'água (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015). Vários estudos caracterizaram a probabilidade dos neonicotinoides serem encontrados no escoamento de solos ou nas águas subterrâneas como resultado da deriva de pulverização, lixiviação ou escoamento (TIŠLER et al., 2009; ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015).

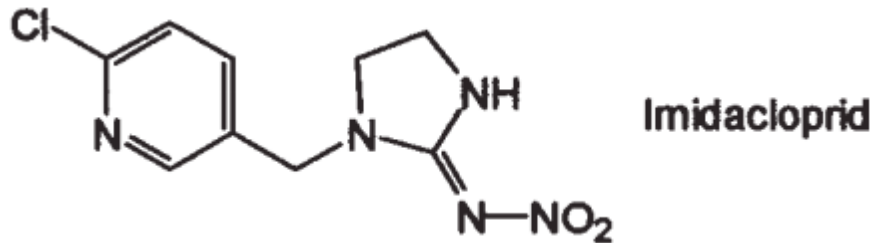
Esta classe corresponde pelo menos sete compostos principais com uma participação de mercado de mais de 25% do consumo global de inseticidas que são utilizados nas culturas (BASS et al., 2015). Além disso, são considerados potenciais produtos de substituição para os inseticidas organofosforados e carbamatos, e espera-se que seu uso aumente globalmente (JESCHKE et al., 2010).

Os neonicotinoides são agonistas nicotínicos que agem interferindo na transmissão neural no sistema nervoso central dos organismos alvos, se ligam aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) no neurônio pós-sináptico, atuando como "falsos neurotransmissores" (VAN DER SLUIJS et al., 2015). Esta interferência com a sinalização de neurotransmissores de acetilcolina provoca a ativação contínua do receptor, levando a sintomas de neurotoxicidade, podendo causar estimulações nervosas em baixas concentrações, bloqueio do receptor, paralisia e morte em concentrações mais elevadas (GOULSON, 2013; GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015; VAN DER SLUIJS et al., 2015).

Organismos não-alvo, particularmente os que habitam solos ou habitats aquáticos, sendo invertebrados ou vertebrados, podem sofrer efeitos letais e uma grande variedade de impactos adversos (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015; GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015; SIMON-DELISO et al., 2015). Os neonicotinoides também podem exercer efeitos subletais, variando de efeitos genotóxicos e citotóxicos a função imune prejudicada, crescimento ou sucesso reprodutivo reduzido (VAN DER SLUIJS et al., 2015).

Um dos inseticidas neonicotinoides mais amplamente utilizado e eficaz é o Imidacloprid (IMI) 1- (6-chloro-3-pyridylmethyl) -N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine (SHEETS, 2002) (Fig. 5). O IMI foi o primeiro neonicotinoide lançado em 1991 e tornou-se um dos principais produtos utilizados para o controle de pragas (JESCHKE et al., 2010; GOULSON, 2013). No Brasil, o IMI foi o décimo ingrediente ativo mais vendido durante o ano de 2013, com aproximadamente 8 mil toneladas de compostos vendidos (IBAMA, 2013). O uso desse inseticida para o controle de pragas terrestres poderia potencialmente resultar em transporte não intencional para

habitats aquáticos por meio de contaminação por derramamento, pulverização atmosférica, deposição, erosão do solo ou escoamento (CCME, 2007).



**Figura 5** - Estrutura química do inseticida neonicotinoide Imidacloprid. Fonte: adaptado de SHEETS, 2002.

O IMI possui uma elevada solubilidade em água e já foi detectado em águas superficiais em uma concentração de até  $320 \mu\text{g L}^{-1}$  na Holanda (VAN DIJK; VAN STAALDUINEN; VAN DER SLUIJS, 2013). Na Espanha, a concentração mínima detectada de IMI no rio Ebro foi de  $1,64 \text{ ng L}^{-1}$  e a concentração máxima foi de  $14,96 \text{ ng L}^{-1}$  (SHUKLA et al., 2017). No Brasil, o IMI já foi detectado em ambientes aquáticos influenciados por atividades agrícolas nas concentrações de  $2,18 \mu\text{g L}^{-1}$  (BORTOLUZZI et al., 2006) e  $3,65 \mu\text{g L}^{-1}$  (BECKER et al., 2009). Além disso, o IMI já foi encontrado no reservatório de Passo Real, na bacia hidrográfica do Alto Jacuí no Rio Grande do Sul em concentrações que variam de  $0,02$  a  $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$  (AMARAL et al., 2018).

Estudos já mostraram que este inseticida é tóxico para diferentes espécies de peixes, como observado pelos valores de concentração letal média CL50 demonstrado por Gibbons; Morrissey; Mineau (2015), que variam de  $83 \text{ mg L}^{-1}$  para *Oncorhynchus mykiss* até  $241 \text{ mg L}^{-1}$  para *Danio rerio*. Além disso, estudos *in vitro* já observaram efeitos citotóxicos desse inseticida em células branquiais de *Paralichthys olivaceus* (SU et al., 2007). Em estudos *in vivo* já foram observados efeitos neurotóxicos em células cerebrais de *Oncorhynchus mykiss*, efeitos genotóxicos e de danos oxidativos em *Australoheros facetus* e *Danio rerio* (GE, et al., 2015; ITURBURU et al., 2016; TOPAL, et al., 2017). Em Vieira et al. (2018), trabalhando com o peixe *Prochilodus lineatus*, notou-se que diferentes concentrações de IMI ( $1,25 - 1250 \mu\text{g L}^{-1}$ ) são capazes de promover alterações nas enzimas antioxidantes, além de, aumento de danos no DNA e danos oxidativos em proteínas e lipídios desses animais.

Embora a autorização de comercialização desses inseticidas sistêmicos tenha sido submetida a avaliações de risco ecológico de rotina, a regulamentação que administra esses produtos não avaliou os riscos ecológicos individuais e conjuntos resultantes de sua utilização generalizada (VAN DER SLUIJS et al., 2015). Poucos estudos focam o destino e os efeitos destes produtos no ambiente aquático. Portanto, há uma necessidade de melhor compreensão sobre os efeitos potenciais dos inseticidas neonicotinoides em organismos aquáticos (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015). É crucial definir as concentrações passíveis de causar danos aos organismos mais sensíveis e assegurar a proteção dessas espécies (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015).

#### 2.4 INTERAÇÃO ENTRE OS INSETICIDAS

Os agrotóxicos são amplamente utilizados em áreas agrícolas e suas misturas são constantemente usadas para melhorar a eficácia e reduzir o custo do tratamento de pragas de culturas, podendo resultar em toxicidades combinadas a diversos organismos (LOUREIRO et al., 2009; BACCHETTA et al., 2014). Compostos químicos que muitas vezes possuem diferentes modos de ação, podem interferir na metabolização um do outro, fazendo com que suas combinações promovam um aumento na toxicidade para os organismos (KHAN et al., 2013; FAI; KINFACK; TOWA, 2017).

Essas combinações podem ocasionar efeitos aditivos, que são caracterizados pela soma dos efeitos de cada agente de forma isolada ( $2+3 = 5$ ); efeitos sinérgicos que ocorrem quando os efeitos combinados de dois produtos químicos são muito maiores do que a soma dos efeitos de cada contaminante isolado ( $2+2 = 20$ ); efeitos antagônicos que são definidos quando duas substâncias administradas em conjunto interferem uma com a outra, diminuindo, desta forma, a toxicidade de uma ou ambas as substâncias ( $4+10 = 8$ ;  $4+1 = 1$ ;  $3+2 = 1$ ) (KLAASSEN; WATKINS, 2012; NIKINMAA, 2014).

Essas combinações podem ser mensuradas por meio da adição de concentração (CA) e a ação independente (IA), que são modelos clássicos utilizados para calcular a toxicidade esperada da mistura de compostos químicos, com base nas toxicidades isoladas e suas concentrações combinadas (FAI; KINFACK; TOWA, 2017). O modelo CA assume que os tóxicos na mistura têm o mesmo modo de ação,

enquanto o modelo IA assume que cada tóxico atua de forma completamente independente dentro do organismo (ACA; GONZALEZ; CARRIQUIRIBORDE, 2018).

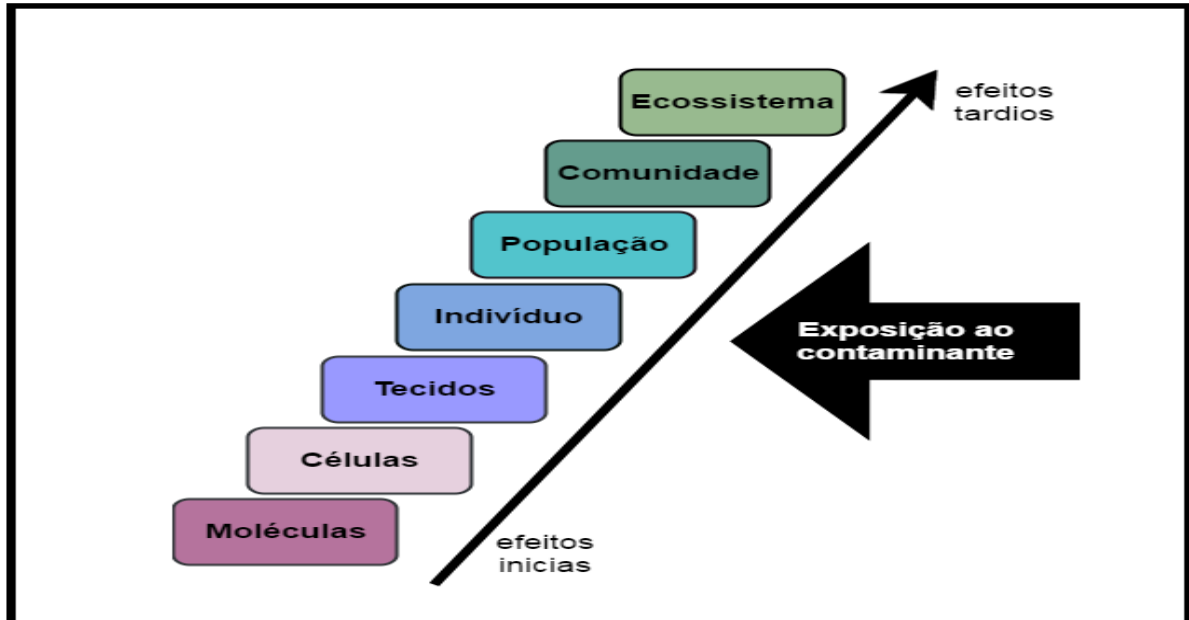
A aplicação conjunta de neonicotinoides e piretroides são comuns na agricultura e reprimem os insetos-alvo efetivamente (XIA et al., 2016; REGAN, et al., 2017). Alguns agrotóxicos comercializados no Brasil possuem ambos os inseticidas no mesmo produto, como por exemplo, Engeo Pleno (Tiametoxam + Lambda-cialotrina), Connect (Imidacloprid + Beta-ciflutrina) e Galil SC (Imidacloprid + Bifentrina). Além disso, uma pesquisa envolvendo agricultores do norte do Paraná relatou a utilização desses inseticidas em combinação na agricultura local (VIEIRA et al.; 2014). Dentre as misturas que têm sido comumente utilizadas na prática contra uma variedade de pragas em todo o mundo devido a sua eficácia, estão os inseticidas LC e IMI (WANG et al., 2015). Porém, a investigação sobre os efeitos de misturas envolvendo esses inseticidas e seus efeitos em peixes são ainda bastante escassos. Neste cenário, seria necessário desenvolver ferramentas e implementar regulamentações que caracterizem os riscos proporcionados por produtos e seus metabólitos, além de, suas misturas (FURLEY et al., 2018). Além disso, não há profissionais suficientes e laboratórios capazes de analisar baixas concentrações de contaminantes na água, solos e sedimentos (FURLEY et al., 2018).

## 2.5 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

A utilização de biomarcadores desempenha um papel importante em estudos ecotoxicológicos e a avaliação destas ferramentas em diferentes níveis de organização biológica deve ser cada vez mais incorporada em estudos de monitoramento aquático, principalmente em peixes, com um grande foco no desenvolvimento de biomarcadores nos níveis molecular e celular de organização biológica (JANZ, 2013). Os biomarcadores são definidos como variações induzidas por agentes tóxicos em componentes moleculares ou celulares, processos, estruturas e funções, determináveis em um sistema biológico ou em amostras (DEPLEDGE; AAGAARD; GYÖRKÖS, 1995).

Eles podem ser utilizados para avaliar a exposição química e os efeitos adversos de poluentes na biota, podendo ser medidos a nível individual, ou até mesmo, destinar-se a prever os efeitos a nível de população (COSSU-LEGUILLE; VASSEUR, 2013; JANZ, 2013). Os efeitos dos contaminantes para os organismos

aquáticos podem ser avaliados em diversos níveis de organização biológica, como evidenciado na Figura 6. Uma variedade de biomarcadores relacionados à exposição a contaminantes tem sido proposta para avaliar a saúde dos peixes (VAN



DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) como, por exemplo, biomarcadores bioquímicos, genotóxicos, metabólicos, hematológicos, histopatológicos, entre outros.

**Figura 6** - Ordem sequencial dos efeitos dos contaminantes para os organismos aquáticos. Fonte: adaptado de NIKINMAA, 2014.

Os biomarcadores são sinais sensíveis de biodisponibilidade de contaminantes e respostas biológicas precoces, fornecendo assim, informações sobre os efeitos biológicos de contaminantes ao contrário de uma simples quantificação de seus níveis ambientais, desta maneira, eles podem fornecer uma visão sobre os potenciais mecanismos de efeito dos contaminantes (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Entre os biomarcadores mais utilizados estão aqueles envolvidos no estresse oxidativo e em danos genéticos. Estes serão tratados um pouco mais detalhadamente a seguir.

### 2.5.1 Biomarcadores Genotóxicos

Como a integridade do DNA é essencial para a conservação da biodiversidade e uma vez que os danos ao DNA podem ser transmitidos para a próxima geração de células do indivíduo, os biomarcadores de efeitos genotóxicos

são relevantes do ponto de vista ecológico (COSSU-LEGUILLE; VASSEUR, 2013). Além disso, são importantes para a avaliação dos riscos ambientais e existem muitos relatórios sobre os estudos que ligam os danos do DNA à subsequente alteração molecular, celular e tecidual dos organismos aquáticos (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004).

As quebras nas ligações da molécula de DNA são lesões pré-mutagênicas e são biomarcadores sensíveis de danos genotóxicos. A técnica mais usualmente utilizada para detecção dessas quebras é o ensaio cometa, pois, ela permite a visualização eficiente dos danos no DNA em células individuais, podendo ser aplicada tanto em ensaios *in vivo* quanto *in vitro* (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004; CEMELI; BAUMGARTNER; ANDERSON, 2009). Esta técnica tem sido amplamente utilizada para avaliação de possíveis danos causados por contaminantes ambientais.

Os peixes são animais bastante utilizados no ensaio do cometa, pois, além do sangue, diferentes tecidos como fígado, rim e brânquias já foram investigados por meio deste ensaio para avaliação de danos no DNA, observando resultados relevantes (LEE; STEINERT, 2003).

Outro biomarcador genotóxico bastante utilizado em peixes é a frequência de micronúcleos (MN). Os micronúcleos são avaliados por uma técnica que permite detectar as propriedades mutagênicas de compostos presentes no meio aquático (UDROIU, 2006). Além disso, micronúcleos são facilmente visualizados em eritrócitos e são fortes indicativos para mensuração de aberrações cromossômicas (CAMPANA et al., 2003).

A formação de micronúcleos ocorre durante o processo de divisão celular, particularmente na anáfase, quando as cromátides e os fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para os polos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômero são, diante disso, após a telófase, os cromossomos sem danos são inseridos no núcleo de cada uma das células filhas. No entanto, poucos elementos, geralmente muito pequenos, não são inseridos nos núcleos formados e continuam no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como micronúcleos (SCHMID, 1975). Em um estudo realizado por Martinez e Cólus (2002), o teste do micronúcleo foi utilizado para a avaliação do efeito de diferentes contaminantes em duas espécies de peixes neotropicais, onde

observou-se um aumento na frequência de micronúcleos para substâncias como herbicidas, inseticidas e metais como chumbo e alumínio.

Além da frequência de micronúcleos (MN), a ocorrência de outras alterações eritrocíticas nucleares (AENs) também é considerada como um indicador de danos genotóxicos. Estas outras alterações foram descritas, primeiramente, em eritrócitos de peixes por Carrasco; Tilbury; Myers (1990) e foram classificadas em: 1) núcleo segmentado (blebbed); 2) núcleo lobulado (lobed); 3) núcleo com constrição ou em "forma de rim"(notched); e posteriormente houve a identificação da presença de células binucleadas. Existem poucas explicações a respeito da origem destas AENs, sendo a mais aceita a sugerida por Shimizu et al. (1998), no qual descreve que ao ser detectada uma região com dano é iniciado um processo de reparo e eliminação da cromatina. Esta região é então movida para a periferia do núcleo e eliminada por exocitose e antes que este processo seja concluído, a membrana nuclear naturalmente apresenta algumas imperfeições as quais caracterizam as AENs. Outra explicação para a formação de AENs estaria relacionada com o estresse oxidativo, devido ao aumento da permeabilidade da membrana nuclear como resultado da LPO, tornando o núcleo mais susceptível a alterações de contaminantes (SERIANI et al., 2011).

Além disso, a ação de agrotóxicos e de seus metabólitos, podem causar quebras no material genético e induzir a apoptose (PEITSCH; MANNHERZ; TSCHOPP, 1994). Neste processo, ocorre a fragmentação da cromatina, formando pequenas massas rodeadas na membrana nuclear, além do mais, em alguns casos, a toxicidade desses contaminantes pode ser tão severa que compromete a formação de ATP ou ainda impede que os fagócitos removam todas as células mortas, não completando o processo apoptótico, originando então, essas AENs (ZAKERI; LOCKSHIN, 2002).

Essas alterações podem complementar a análise de micronúcleos em pesquisas genotóxicas de rotina (ÇAVAS; KONEN, 2007). De modo geral, os biomarcadores de danos no DNA são ferramentas valiosas para avaliar os efeitos da exposição aguda de organismos aquáticos às substâncias genotóxicas.

### 2.5.2 Biomarcadores Bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise, quando comparados às análises químicas

(SCHLENK, 2008). Diversos parâmetros bioquímicos de peixes têm sido utilizados como biomarcadores devido às suas respostas a contaminantes, e pode-se afirmar que dentre esses parâmetros, os danos oxidativos, fornecem informações importantes a respeito da capacidade de defesa antioxidante dos organismos, assim como da capacidade de metabolização de compostos tóxicos (MARTINEZ, 2006).

Um grande número de efeitos bioquímicos tem sido associado com o aumento do fluxo de espécies reativas de oxigênio (ERO), dentre eles, a lipoperoxidação (LPO), que é muito utilizada como um biomarcador. Este processo é considerado a principal causa de injúria e morte celular, e muitas condições patológicas estão diretamente associadas a ele. A LPO consiste em uma reação em cadeia, onde um excesso de ERO pode causar a quebra dos fosfolipídios de membrana, podendo inativar receptores e enzimas de membrana, além de, aumentar a permeabilidade da membrana ou até mesmo levar a célula a apoptose (LIVINGSTONE, 2001; MANDUZIO et al., 2005). Muitos estudos têm demonstrado o aumento da lipoperoxidação em vários tecidos de peixes expostos a diferentes tipos de contaminantes (PALERMO et al., 2015; SIMONATO et al., 2016; VIEIRA et al., 2016; VIEIRA et al., 2018). Diante disto, a lipoperoxidação tem grande potencial para ser utilizada como biomarcador.

Outro importante biomarcador bioquímico de dano oxidativo é o processo de carbonilação de proteínas (PCO), que pode ser reversível ou irreversível, dependendo do alvo e da forma de dano oxidativo (TRACHOOTHAM et al., 2008). Devido à alta reatividade do  $\text{OH}^\cdot$ , ele exerce mais efeitos nocivos a proteínas, enquanto que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^\cdot$  ficam mais limitados aos ataques de grupos facilmente oxidáveis, como os grupamentos tiólicos. Todos os resíduos de aminoácidos podem ser oxidados por espécies reativas de oxigênio, sendo capaz também de sofrer agregação e fragmentação, formando grupos carbonilas (VALKO et al., 2006; TRACHOOTHAM et al., 2008).

Estudos sobre a carbonilação de proteínas têm sido simplificados pela disponibilidade de um método simples e preciso para quantificar a oxidação de proteína: o ensaio da dosagem de proteínas carboniladas. O ensaio detecta os grupos carbonila, por espectrofotometria, após a sua reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (LEVINE et al., 1994). A quantificação de proteínas carboniladas em peixes pode fornecer informações úteis e ser utilizada como

biomarcador de danos oxidativos decorrentes da exposição a contaminantes aquáticos.

## 2.6 *Prochilodus lineatus*: Um Modelo Biológico Para Estudos De Ecotoxicologia Aquática No Brasil

O peixe *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Fig. 7) é uma espécie de água doce, migratória e amplamente distribuída nas bacias hidrográficas do leste, sul e sudeste do Brasil, é ecologicamente e economicamente importante, compreendendo uma grande parte da ictiomassa (TAYLOR; FLECKER; HALL, 2006; BARROCA et al., 2015). Caracteriza-se como uma espécie reofílica, com alta fecundidade, e dado seu hábito detritívoro está exposta às substâncias químicas que ocasionalmente tenham permanecido retidas no sedimento (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).



**Figura 7** – Exemplo de juvenil de *Prochilodus lineatus*.

Esta espécie tem sido utilizada em testes de toxicidade devido à sua sensibilidade a diversos poluentes. Pereira et al. (2013), trabalhando com Clomazone, observaram que este herbicida causou diversas alterações bioquímicas e sanguíneas nesse animal. Palermo et al. (2015) e Simonato et al. (2016), trabalhando com níquel e cobre respectivamente, observaram alterações em parâmetros bioquímicos e genéticos em *P. lineatus*. Caramello et al. (2017), observaram que os peixes expostos ao inseticida glifosato apresentaram aumento de aberrações cromossômicas em exposições crônicas, mesmo em doses subletais. Ale et al. (2018) avaliaram a toxicidade de nanopartículas de prata em *P. lineatus* e observaram que este composto promoveu aumento em parâmetros bioquímicos, hematológicos e plasmáticos, além de, alterações nas atividades das enzimas

antioxidantes desse animal. Santos et al. (2018), trabalhando com Benzo(a)pireno, notaram que este composto é capaz de promover alterações na expressão da atividade da cyp1a e na EROD, além de, causar aumento nos danos no DNA neste peixe. Vieira et al. (2018), trabalhando com Imidacloprid, observaram alterações em vários parâmetros bioquímicos e genotóxicos desse animal quando expostos a este inseticida neonicotinoide.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e oxidativos dos inseticidas Lambda-cialotrina e Imidacloprid, isolados e em mistura, no peixe *Prochilodus lineatus* em 4 períodos de exposição (48, 96, 144 e 192 h).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se as exposições de 48, 96, 144 e 192 h aos inseticidas Lambda-cialotrina e Imidacloprid promovem danos no DNA em células branquiais, sanguíneas, hepáticas e cerebrais, utilizando-se o teste do cometa e a análise da frequência de micronúcleo (MN) e alterações eritrocíticas nucleares (AENs) em eritrócitos.
- Verificar se as exposições aos inseticidas Lambda-cialotrina e Imidacloprid promovem danos oxidativos em brânquias, cérebro e fígado de *Prochilodus lineatus*, por meio da determinação da carbonilação de proteínas (PCO) e da lipoperoxidação (LPO);
- Averiguar se os inseticidas Lambda-cialotrina e Imidacloprid quando em mistura apresentam efeitos interativos (aditivos, sinérgicos ou antagônicos) nos parâmetros analisados;
- Comparar a sensibilidade dos diferentes órgãos de *P. lineatus* frente à exposição aos inseticidas Lambda-cialotrina e Imidacloprid, isolados e em mistura.

## REFERÊNCIAS

- ACA, V. L.; GONZALEZ, P. V.; CARRIQUIRIBORDE, P. Lethal and sublethal responses in the fish, *Odontesthes bonariensis*, exposed to chlorpyrifos alone or under mixtures with endosulfán and lambda-cyhalothrin. **Ecotoxicology**, p. 1-12, 2018.
- AFFUM, A. O.; ACQUAAH, S. O.; OSAE, S. D.; KWAANSA-ANSAH, E. E. Distribution and risk assessment of banned and other current-use pesticides in surface and groundwaters consumed in an agricultural catchment dominated by cocoa crops in the Ankobra Basin, Ghana. **Science of The Total Environment**, v. 633, p. 630-640, 2018.
- AHMAD, L.; KHAN, A.; KHAN, M. Z. Pyrethroid-induced reproductive toxicopathology in non-target species. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 32, n. 1, p. 1-9, 2012.
- ALE, A.; ROSSI, A. S.; BACCHETTA, C.; GERVASIO, S.; DE LA TORRE, F. R.; CAZENAVE, J. Integrative assessment of silver nanoparticles toxicity in *Prochilodus lineatus* fish. **Ecological Indicators**, v. 93, p. 1190-1198, 2018.
- AMARAL, A. M. B.; GOMES, J. D. L. C.; WEIMER, G. H.; MARINS, A. T.; LORO, V. L.; ZANELLA, R. Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir. **Chemosphere**, v. 191, p. 876-885, 2018.
- ANDERSON, J. C.; DUBETZ, C.; PALACE, V. P. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 409-422, 2015.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, UFPR. Universidade Federal do Paraná. **Seminário de mercado de agrotóxico e regulação**. 2012. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-2012/rap-09-de-maio-de-2012-anvisa-agenor>>. Acesso em: 20 mai. 2017.
- BACCHETTA, C.; ROSSI, A.; ALE, A.; CAMPANA, M.; PARMA, M. J.; CAZENAVE, J. I. Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. **Ecological Indicators**, v. 36, p. 532-538, 2014.
- BARROCA, T. M.; GUTIÉRREZ-ESPINOSA, M. A.; GIRALDO, A.; BEDORE, A. G.; GODINHO, A. L. Coded wire tagging of juvenile curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837)(Characiformes): mortality, tag retention, and growth. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 2, p. 383-388, 2015.

BASS, C.; DENHOLM, I.; WILLIAMSON, M. S.; NAUEN, R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 78-87, 2015.

BECKER, A. G.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C.; LORO, V. L.; SANTOS, D. R.; REICHERT, J. M.; BALDISSEROTTO, B. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 6, p. 1734-1739, 2009.

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

BRASIL. Decreto Nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União, Brasília, DF. Publicado no DOU de 08 de janeiro de 2002.** Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/d4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm)>. Acesso em: 10 jan. 2017.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União, Brasília, DF. Publicado no DOU de 12 de julho de 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: 10 jan. 2017.

BURR, S. A.; RAY, D. E. Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. **Toxicological Sciences**, v. 77, n. 2, p. 341-346, 2004.

CAMPANA, M. A.; PANZERI, A. M.; MORENO, V. J.; DULOUT, F. N. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 99-103, 2003.

CARAMELLO, C. S.; JORGE, N. L.; JORGE, L. C. Evaluation of herbicide glyphosate effects in the fish *Prochilodus lineatus* using chromosome aberration test. **Revista veterinaria**, v. 28, n. 1, p. 65-68, 2017.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M. Parte 1–Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Saúde. In: CARNEIRO, F. F.; RIGOTTO, R. M.; GIRALDO, L.; PIGNATI, W.; RIZOLLO, A.; ALEXANDRE, V. P.; FARIA, N. M. X.; FIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. (Org.). **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO: Rio de Janeiro, 2012. 88p.

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

ÇAVAŞ, T.; KÖNEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, v. 22, n. 4, p. 263-268, 2007.

CCME. **Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life**: Imidacloprid. Scientific Supporting Document. Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg. 2007.

CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, D. Antioxidants and the comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 51-67, 2009.

CORCELLAS, C.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: a case study in Iberian river basins (Spain). **Environment International**, v. 75, p. 110-116, 2015.

COSSU-LEGUILLE, C.; VASSEUR, P. Aquatic biomarkers. In: **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Springer Netherlands, 2013. p. 49-66.

DEPLEDGE, M. H.; AAGAARD, A.; GYÖRKÖS, P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1-3, p. 19-27, 1995.

EXTOXNET. Extension Toxicology Network-Pesticide Information Profiles. **Copper sulfate**, 1996.

FAI, P. B. A.; KINFACK, J. S. T.; TOWA, Y. J. T. Acute effects of binary mixtures of Type II pyrethroids and organophosphate insecticides on *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 7, p. 889-901, 2017.

FETOUI, H.; FEKI, A.; SALAH, G. B.; KAMOUN, H.; FAKHFAKHA, F.; GDOURA, R. Exposure to lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid, increases reactive oxygen species production and induces genotoxicity in rat peripheral blood. **Toxicology and Industrial Health**, v. 31, n. 5, p. 433-441, 2013.

FURLEY, T. H.; BRODEUR, J.; SILVA, A. H. C.; CARRIQUIRIBORDE, P.; CHAGAS, K. R.; CORRALES, J.; DENADAI, M.; FUCHS, J.; MASCARENHAS, R.; MIGLIORANZA, K. S. B.; CARAMÉS, D. M. M.; NAVAS, J. M. NUGEGODA, D.; PLANES, E.; RODRIGUEZ-JORQUERA, I. A.; OROZCO-MEDINA, M.; BOXALL, A. B. A.; RUDD, M. A.; BROOKS, B. W. Toward sustainable environmental quality: Identifying priority research questions for Latin America. **Integrated environmental assessment and management**, v. 14, n. 3, p. 344-357, 2018.

GE, W. YAN, S.; WANG, J.; ZHU, L.; CHEN, A.; WANG, J. Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1856-1862, 2015.

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

GOULSON, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 4, p. 977-987, 2013.

HE, L. M.; TROIANO, J.; WANG, A.; GOH, K. Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of lambda-cyhalothrin. In: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Springer New York, 2008. p. 71-91.

HUNT, L.; BONETTO, C.; RESH, V. H.; BUSS, D. F.; FANELLI, S.; MARROCHI, N.; LYDY, M. J. Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South America. **Science of the Total Environment**, v. 547, p. 114-124, 2016.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Agrotóxicos e Afins – Histórico das Vendas — 2000 a 2012**. 2013. Disponível em: <[http://ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade\\_Ambiental/boletim%20de%20comercializacao\\_2000\\_2012.pdf](http://ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf)>. Acesso em: 20 jun. 2017.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatório de comercialização de agrotóxicos**. 2017. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

ITURBURU, F. G.; ZOMISCH, M.; PANZERI, A. M.; CRUPKIN, A. C.; CONTARDO-JARA, V.; PFLUGMACHER, S.; MENONE, M. L. Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2016.

JANZ, D. M. Biomarkers in fish ecotoxicology. In: C. BLAISE, J. F. FÉRARD. **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Springer Netherlands, 2013. p. 211-220.

JESCHKE, P.; NAUEN, R.; SCHINDLER, M.; ELBERT, A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2897-2908, 2010.

JUREWICZ, J., RADWAN, M.; SOBALA, W.; RADWAN, P.; BOCHENEK, M.; HANKE, W. Effects of occupational exposure-is there a link between exposure based on an occupational questionnaire and semen quality?. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 60, n. 4, p. 227-233, 2014.

KAVIRAJ, A.; GUPTA, A. Biomarkers of type II synthetic pyrethroid pesticides in freshwater fish. **BioMed Research International**, v. 2014, 7p. 2014.

KHAN, H. A. A.; AKRAM, W.; SHAD, S. A.; LEE, J. J. Insecticide mixtures could enhance the toxicity of insecticides in a resistant dairy population of *Musca domestica* L. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60929, 2013.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. AMGH Editora. 2a. ed. 2012.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 544, n. 1, p. 43-64, 2003.

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

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine pollution bulletin**, v. 42, n. 8, p. 656-666, 2001.

LOUREIRO, S.; AMORIN, M. J. B.; CAMPOS, B.; RODRIGUES, S. M. G.; SOARES, A. M. V. M. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 2, p. 625-636, 2009.

MANDUZIO, H.; ROCHER, B.; DURAND, F.; GALAP, C.; LÉBOULENGER, F. The point about oxidative stress in mollusks. **Invertebrate Survival Journal (ISJ)**, v. 2, n. 2, p. 91-104, 2005.

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

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. **A bacia do Rio Tibagi. Editora dos Editores, Londrina, PR, Brazil**, p. 551-577, 2002.

MILHOME, M. A. L.; SOUSA, P. L. R.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, R. F. Influence the USE of pesticides in the Quality of surface and groundwater located in irrigated areas of Jaguaribe, Ceara, Brazil. **International Journal of Environmental Research**, v. 9, n. 1, p. 255-262, 2015.

MURANLI, F. D. G.; GÜNER, U. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, n. 2, p. 104-108, 2011.

NIKINMAA, M. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Elsevier, 2014.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2, p. 109-149, 2004.

PALERMO, F. F.; RISSO, W. E.; SIMONATO, J. D.; MARTINEZ, C. B. R. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 116, p. 19-28, 2015.

PALMQUIST, K.; FAIRBROTHER, A.; SALATAS, J. **Pyrethroid insecticides: use, environmental fate, and ecotoxicology**. INTECH Open Access Publisher, 2012.

PEITSCH, M. C.; MANNHERZ, H. G.; TSCHOPP, J. The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death?. **Trends in cell biology**, v. 4, n. 2, p. 37-41, 1994.

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

PINER, P.; ÜNER, N. Oxidative and apoptotic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonyl butoxide in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 414-420, 2012.

POSSAVATZ, J.; ZEILHOFER, P.; ALVES PINTO, A.; TIVES, A. L.; FREIRE GASPAR DE CARVALHO DORES, E. Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 9, n. 1, 2014.

REGAN, K.; ORDOSCH, D.; GLOVER, K. D.; TILMON, K. J.; SZCZEPANIEC, A. Effects of a pyrethroid and two neonicotinoid insecticides on population dynamics of key pests of soybean and abundance of their natural enemies. **Crop Protection**, v. 98, p. 24-32, 2017.

SÁNCHEZ-BAYO, F. Systemic Insecticides and Their Environmental Repercussions. **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**, 2017.

SANTOS, C.; OLIVEIRA, M. T.; CÓLLUS, I. M. S.; SOFIA, S. H. MARTINEZ, C. B. R. 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**, v. 61, p. 30-37, 2018.

SCHLENK, D.; HANDY, R.; STEINERT S.; DEPLEDGE, M.; BENSON, W. 2008. Biomarkers. In: DI GIULIO, R.T., HINTON D.E. (Org.). **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, New York, pp. 683-715.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, T. M. J.; SILVA-SOUZA, Â. T.; NAPOLEÃO, S. R. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 1, 2011.

SHEETS, P. The neonicotinoid insecticides. In: MASSARO, E. J. **Handbook of Neurotoxicology**. Humana Press, 2002. p. 79-87.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **The Journal of cell biology**, v. 140, n. 6, p. 1307-1320, 1998.

SHUKLA, S.; JHAMTANI, R. C.; DAHIYA, M. S.; AGARWAL, R. Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. **Toxicology reports**, v. 4, p. 240-244, 2017.

SIMONATO, J. D.; MELA, M.; DORIA, H. B.; GUILOSKI, I. C.; RANDI, M. A. F.; CARVALHO, P. S. M.; MELETTI, P. C.; ASSIS, H. C. S.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C. B. R. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 31-41, 2016.

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

SOLOMON, K. R.; DALHOFF, K.; VOLZ, D.; VAN DER KRAAK, G. Effects of herbicides on fish. **Fish Physiology**, v. 33, p. 369-409, 2013.

SU, F.; ZHANG, S.; LI, H.; GUO, H. In vitro acute cytotoxicity of neonicotinoid insecticide imidacloprid to gill cell line of flounder *Paralichthys olivaceus*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 25, n. 2, p. 209-214, 2007.

TAYLOR, B. W.; FLECKER, A. S.; HALL, R. O. Loss of a harvested fish species disrupts carbon flow in a diverse tropical river. **Science**, v. 313, n. 5788, p. 833-836, 2006.

TIŠLER, T.; JEMEC, A.; MOZETIČ, B.; TREBŠE, P. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. **Chemosphere**, v. 76, n. 7, p. 907-914, 2009.

TOMLIN, C. D. S. **The Pesticide Manual**. 12. ed. British Crop Protection Council, Surrey: United Kingdom, 2000. 1606p.

TOPAL, A.; ALAK, G.; OZKARACA, M.; YELTEKIN, A. C.; COMAKLI, S.; ACIL, G.; KOKTURK, M.; ATAMANALP, M. Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 175, p. 186-191, 2017.

TRACHOOTHAM, D.; WEIQIN, L.; OGASAWARA, M. A.; RIVERA-DEL VALLE, N.; HUANG, P. Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 2, p. 201-204, 2006.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VAN DER SLUIJS, J. P.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BIJLEVELD VAN LEXMOND, M. F. I. J.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C. A. FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A. D.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; SIMON-DELISO, N.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 22, p. 148-154, 2015.

VAN DIJK, T. C.; VAN STAALDUINEN, M. A.; VAN DER SLUIJS, J. P. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e62374, 2013.

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 areas. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 1, p. 153-164, 2014.

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; LUNARDELLI, B.; OLIVEIRA, L. F.; CABRERA, L. C.; RISSO, W. E.; PRIMEL, E. G.; MELETTI, P. C.; FILLMANN, G.; MARTINEZ, C. B. R. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 44-56, 2016.

VIEIRA, C. E. D.; PÉREZ, M. R.; ACAYABA, R. D. A.; RAIMUNDO, C. C. M.; MARTINEZ, C. B. R. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 195, p. 125-134, 2018.

WANG, Y.; CHEN, C.; QIAN, Y.; ZHAO, X.; WANG, Q.; KONG, X. Toxicity of mixtures of  $\lambda$ -cyhalothrin, imidacloprid and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 242-247, 2015.

XIA, X.; XIA, X.; HUO, W.; DONG, H.; ZHANG, L.; CHANG, Z. Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 45, p. 132-139, 2016.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. A. Cell death during development. **Journal of immunological methods**, v. 265, n. 1-2, p. 3-20, 2002.

#### **4 MANUSCRITO**

Este manuscrito foi preparado de acordo com as normas do periódico Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. [<https://www.sciencedirect.com/journal/mutation-research-genetic-toxicology-and-environmental-mutagenesis>]

**DANOS GENOTÓXICOS E OXIDATIVOS NO TELEÓSTEO DE ÁGUA DOCE  
*Prochilodus lineatus* EXPOSTOS AOS INSETICIDAS FORMULADOS  
CONTENDO LAMBDA-CIALOTRINA E IMIDACLOPRID, ISOLADOS E EM  
MISTURA**

Tiago Tomiama Alvim, Claudia Bueno dos Reis Martinez

Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas,  
Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

## RESUMO

A agricultura em países tropicais geralmente está sob uma maior pressão de pragas devido a condições ambientais favoráveis para se proliferarem, levando a uma maior dependência de agrotóxicos do que em regiões temperadas. Atualmente, o Brasil se destaca como maior consumidor de agrotóxicos do mundo, respondendo por aproximadamente 20% do total mundial. Nesse cenário, destacam-se o inseticida piretroide Lambda-cialotrina (LC) e o neonicotinoide Imidacloprid (IMI). Esses inseticidas podem atingir os ecossistemas aquáticos, contaminando-os e prejudicando os organismos que ali residem. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos inseticidas LC ( $150\text{ng L}^{-1}$ ) e IMI ( $100\mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura, para juvenis do teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus* após exposições de 48, 96, 144 e 192h. Foram avaliados a ocorrência de danos no DNA em células branquiais, sanguíneas, hepáticas e cerebrais, de alterações eritrocíticas nucleares em eritrócitos e de danos oxidativos (carbonilação de proteínas e lipoperoxidação) em brânquias, fígado e cérebro. Os inseticidas isolados e em mistura promoveram danos no DNA em diferentes tecidos e alterações na estrutura do núcleo dos eritrócitos de *P. lineatus*, variando quanto ao tempo de exposição. Nos menores tempos de exposição, houve uma provável interação sinérgica entre esses inseticidas no sangue e no fígado. A mistura ainda promoveu aumento da carbonilação de proteínas e da lipoperoxidação em brânquias e fígado nos menores tempos, reforçando essa interação sinérgica. O resultado dessa interação claramente promove aumento da toxicidade em tempos menores, o que pode ser prejudicial para peixes em seu ambiente natural. A brânquia foi o tecido mais sensível a ação desses inseticidas, provavelmente pelo fato de ser o órgão que está em contato direto com esses contaminantes na água. O cérebro foi o órgão menos sensível a ação de LC e IMI, provavelmente devido a presença da barreira hematoencefálica e sua maior capacidade de reparo comparada aos demais órgãos analisados.

Palavras-chave: danos no DNA, estresse oxidativo, neonicotinoides, piretroides.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de produção agrícola em países tropicais estão geralmente sob uma maior pressão de pragas devido a condições ambientais favoráveis para que insetos-praga e ervas “daninhas” se proliferem, levando a uma maior dependência de agrotóxicos do que em regiões temperadas [1]. Nos últimos anos, o mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190%, superando os Estados Unidos, e atualmente o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, respondendo por aproximadamente 20% do total mundial [2,3]. Nesse cenário, os inseticidas se destacam, correspondendo a 12% do mercado brasileiro [4], entre eles estão os piretroides e os neonicotinoides. Piretroides sintéticos têm sido utilizados há mais de 20 anos para controlar insetos-praga em uma variedade de culturas e estão entre os inseticidas mais potentes conhecidos [5]. Os neonicotinoides são outra classe química importante de inseticidas devido à sua alta eficácia contra um amplo espectro de insetos [6] e hoje representam um dos inseticidas mais vendidos no mundo [7].

Em áreas agrícolas, as misturas de inseticidas são frequentemente utilizadas para melhorar a eficácia e reduzir o custo do tratamento contra as pragas das culturas, resultando em toxicidade combinada para vários organismos [8]. O uso de piretroides em combinação com inseticidas neonicotinoides é comum na agricultura [9,10]. Entre as misturas que têm sido usadas contra uma variedade de pragas em todo o mundo está o piretroide Lambda-cialotrina (LC) juntamente com o neonicotinoide Imidacloprid (IMI) [11].

Como resultado de seus usos extensivos, esses inseticidas podem ser encontrados em diferentes compartimentos ambientais, levando à contaminação dos recursos de água doce, de modo que, muitos organismos que habitam esses locais estão expostos a tais produtos [12]. O inseticida LC já foi encontrado em sedimentos de regiões produtoras de soja na América do Sul (Argentina e Paraguai) em concentrações que variaram de 0,42 a 16,57 ng g<sup>-1</sup>. No Brasil, concentrações de 1,32 ng g<sup>-1</sup> [13] até 60 ng g<sup>-1</sup> de LC [14] foram detectadas no sedimento de corpos de água doce. Em águas superficiais, a LC já foi encontrada em uma concentração de 0,02 µg L<sup>-1</sup> em uma bacia hidrográfica em Gana, próxima a uma cultura de cacau [15]. Por sua vez, o IMI já foi detectado em águas superficiais em concentrações de até 320 µg L<sup>-1</sup> na Holanda [16]. Em um rio na Espanha, já foram detectadas

concentrações de IMI variando de 1.64 ng L<sup>-1</sup> a 14.96 ng L<sup>-1</sup> [17]. No Brasil, este inseticida foi identificado em ambientes aquáticos influenciados por atividades agrícolas nas concentrações de 2,18 µg L<sup>-1</sup> [18] e 3,65 µg L<sup>-1</sup> [19]. Além disso, o IMI já foi encontrado no reservatório de Passo Real, na bacia hidrográfica do Alto Jacuí no Rio Grande do Sul em concentrações que variam de 0,02 a 0,04 µg L<sup>-1</sup> [3].

Alguns estudos mostraram que o inseticida LC é altamente tóxico para diferentes espécies de peixes, conforme indicado pelos valores da concentração letal média (CL50 - 96h), variando de 0,8 ng L<sup>-1</sup> para o exemplar de *Cyprinodum variegatus* até 240 ng L<sup>-1</sup> para a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* [20]. Por sua vez, o IMI é menos tóxico para peixes em comparação com a LC, com maiores valores de CL50, variando de 83 mg L<sup>-1</sup> para *O. mykiss* até 241 mg L<sup>-1</sup> para *Danio rerio* [21].

Embora esses inseticidas tenham sido relatados em sedimentos e águas superficiais em concentrações menores do que aquelas que causam a mortalidade de diferentes espécies de peixes [20,21], concentrações subletais de ambos os inseticidas podem causar estresse oxidativo e danos ao DNA em peixes [6,22,23,24]. No entanto, faltam estudos sobre a toxicidade conjunta da LC e do IMI e as possíveis interações entre eles. Assim, é urgentemente necessário avaliar os efeitos das misturas de agrotóxicos, avaliando seus riscos ecológicos nos ecossistemas [25].

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos e oxidativos de LC e IMI, isolados e em mistura, ao longo de 192 horas de exposição, para o teleósteo neotropical de água doce *Prochilodus lineatus*. Esta espécie de peixe possui hábito bentônico e é amplamente distribuída nos rios da América do Sul, onde representa um peixe ecologicamente e economicamente importante [26]. Devido ao seu hábito alimentar detritívoro, esta espécie está sujeita a contaminantes presentes tanto na água como aqueles retidos no sedimento [27]. Além disso, *P. lineatus* é comumente utilizado em testes de toxicidade por causa de sua sensibilidade a diferentes classes de contaminantes, como agrotóxicos [6,28].

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Desenho experimental

Para os testes de toxicidade, foram utilizados exemplares juvenis de *P. lineatus* ( $15,43 \pm 0,91$  cm;  $34,29 \pm 0,47$  g; média  $\pm$  EP,  $n = 160$ ) fornecidos por estação de piscicultura (AquaNorte, Cambará-PR). Os animais foram aclimatados em laboratório, durante sete dias, em tanques de 500 L com água limpa, desclorada e aeração constante ( $25,62 \pm 0,50$  °C, pH de  $7,9 \pm 0,11$ ,  $7,0 \pm 0,17$  mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> e  $2,23 \pm 0,28$  mS cm<sup>-1</sup>) e fotoperíodo controlado de 12 h:12 h (C:E). Os animais foram alimentados a cada 48 h e a alimentação foi suspensa 48 h antes do início dos experimentos.

Foram realizadas exposições de 48, 96, 144 e 192 horas. Para cada tempo experimental foram realizados experimentos independentes, utilizando 40 animais, divididos em quatro grupos ( $n = 10$ ): i) grupo IMI 100, com peixes expostos à água contendo 100 µg L<sup>-1</sup> de Imidacloprid; ii) grupo LC 150, com peixes expostos à água contendo 150 ng L<sup>-1</sup> de Lambda-cialotrina; iii) grupo LC + IMI, com peixes expostos à água contendo 100 µg L<sup>-1</sup> de Imidacloprid e 150 ng L<sup>-1</sup> de Lambda-cialotrina; iv) grupo controle (CTR), com peixes exposto apenas água. As exposições foram realizadas em aquários de 50 L, com 5 animais por aquário e duas réplicas por grupo ( $n = 5$  por réplica;  $n = 10$  por grupo) e o meio experimental era renovado (80%) a cada 48 h.

As concentrações testadas referem-se às concentrações nominais do ingrediente ativo nas formulações comerciais Karate Zeon® CS (5% i.a. de λ-cialotrina, Syngenta S.A., Brasil) e Imidacloprid (48% i.a. – Nortox S.A. Brasil). A CL<sub>50</sub> 96 h da λ-cialotrina para diferentes espécies de peixes varia de 0,8 a 200 ng L<sup>-1</sup> [20], apresentando grande toxicidade para estes organismos. Desta forma, buscou-se utilizar uma concentração segura de LC para *Prochilodus lineatus*, que não causassem mortalidade e que fosse ambientalmente relevante.

Do mesmo modo, a CL<sub>50</sub> do Imidacloprid para diferentes espécies de peixes varia de 83 a 241 mg L<sup>-1</sup> [21], demonstrando ser tóxico para estes organismos. Diante disso, buscou-se utilizar uma concentração segura de IMI para *Prochilodus lineatus*, semelhante a observada em alguns trabalhos [6,23,24], que assim como a LC, não causassem mortalidade e que fosse ambientalmente relevante.

Durante os experimentos, medidas de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade da água foram tomadas diariamente e os peixes foram alimentados apenas após 96 h (nas exposições de 144 e 192h) antes da renovação do meio experimental. As características físicas e químicas da água permaneceram estáveis e não foram detectadas diferenças significativas entre os aquários (temperatura de  $24,55 \pm 0,91$  °C; pH de  $7,78 \pm 0,24$ ; oxigênio dissolvido de  $7,11 \pm 0,39$  mg L<sup>-1</sup>; condutividade de  $0,125 \pm 0,39$  mS cm<sup>-1</sup>). Os testes realizados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (protocolo CEUA nº 6717.2017.47).

Transcorridos os tempos de exposição, os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L<sup>-1</sup>), assim como, Gontijo et al. [29], para a realização da biometria e coleta do sangue pela veia caudal, com seringas descartáveis lavadas com anticoagulante (heparina). Parte do sangue foi armazenado em tubos plásticos contendo 1 mL de soro bovino fetal a 4° C para a realização do ensaio do cometa e a outra parte foi utilizada para fazer o esfregaço para a análise da ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares totais (AENs totais) por meio do teste do micronúcleo (MN).

Em seguida, os animais foram mortos por secção medular para a retirada das brânquias, do fígado e do cérebro. Cada órgão foi dividido em duas partes, sendo que uma parte foi armazenada em tubos plásticos contendo 700 µL de soro bovino fetal (SBF) para a realização das análises genotóxicas e a outra parte foi armazenada em tubos plásticos para a realização das análises bioquímicas.

#### *4.2.2 Análises genotóxicas*

##### *4.2.2.1 Análises de danos no DNA – Ensaio do cometa*

O ensaio alcalino do cometa foi realizado de acordo com Singh et al. [30] com modificações de Cestari et al. [31] Amostras de brânquias, fígado e cérebro foram dissociadas mecanicamente de acordo com Cavalcante et al. [32], com pequenas modificações. Em seguida foram filtradas (malha de 30 µm) e armazenadas até o momento do ensaio. Para a realização do ensaio do cometa, 10 µL de cada amostra foi homogeneizada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e dispensada em lâminas previamente cobertas com agarose normal (NMP), coberta com lamínula e colocada na geladeira por 50 min. Posteriormente, as lamínulas

foram retiradas e as lâminas submetidas às seguintes etapas: a) lise: 2h, a 4°C, protegido da luz, em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10%, Triton X-100 1%, N-lauril sarcosinato 1%, pH 10,0); b) desnaturação do DNA: 30 min, no escuro, em um tampão de eletroforese (NaOH 0,3 N, EDTA 1 mM, pH>13); c) eletroforese: 20 min, 300 mA, 25 V, 1 V cm<sup>-1</sup>; d) neutralização: três lavagens de 5 min com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5). As lâminas foram fixadas com etanol absoluto por 10 min e acondicionadas em geladeira até o momento de serem analisadas.

Para as análises, as lâminas foram coradas com GelRed (Uniscience) e cobertas com lamínula. Foram analisados 100 nucleóides por animal por meio de teste cego em microscópio de fluorescência na objetiva de 40x. Os danos no DNA foram classificados visualmente, considerando-se o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. Para o cálculo do escore de dano, o número de células em cada classe (0, 1, 2 ou 3) foi multiplicado pelo valor de cada classe e o escore foi calculado pela fórmula: (0xA) + (1xB) + (2xC) + (3xD), onde: A, B, C e D correspondem ao número de células em cada uma das classes. Assim, o valor de escore pode variar de um mínimo de 0 e um valor máximo de 300. Para cada grupo experimental, foi calculado o número médio de nucleóides de classe 0, 1, 2 e 3, pela média do número de nucleóides considerando-se todos os animais de cada grupo.

#### 4.2.2.2 Alterações eritrocíticas nucleares totais (AENs totais)

O teste do micronúcleo (MN) foi realizado com os eritrócitos dos peixes de acordo com a técnica descrita por Ueda et al. [33]. Também foi analisada a ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares (AENs) de acordo com Carrasco et al. [34]. 5 µL foi coletada de cada animal durante a amostragem e gotejada sobre duas lâminas de vidro limpas para a realização do esfregaço. Após secagem “*overnight*”, as lâminas foram fixadas em metanol P.A. (100%) e acondicionadas em geladeira até o momento de serem analisadas.

Para as análises, as lâminas foram coradas com Laranja de Acridina (Sigma-Aldrich) a 0,003% em tampão de Sorenson (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHPO<sub>4</sub> com pH 6,8) e cobertas com lamínula. Um total de 3000 eritrócitos por peixe foram examinados, em

teste cego, em microscópio de fluorescência na objetiva de 100x, anotando-se as frequências de MN e AENs. A frequência de MN e das demais AENs de cada grupo experimental foi calculada e expressa por 1000 células (em ‰). As classificações das alterações eritrocíticas nucleares foram: 1) micronúcleos (MN); 2) núcleo segmentado (NS - blebbed); 3) núcleo lobulado (NL - lobed) e 4) núcleo com constrição ou em “forma de rim” (NR - notched), além da presença de células binucleadas (BN).

#### 4.2.3 Análises bioquímicas

Amostras de brânquias, fígado e cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M pH = 7) e posteriormente centrifugadas a 10000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado em ultrafreezer (-80° C) até o momento das análises descritas a seguir.

##### 4.2.3.1 Carbonilação de proteínas (PCO)

Para a avaliação de danos oxidativos em proteínas, foi empregado o método descrito por Levine et al. [35]. Este método consiste em reagir o 2,4 dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas que podem ser detectadas a 370 nm. Primeiramente, ao sobrenadante foi misturado DNPH (10 mM, preparado em HCl 2 M) e a solução foi incubada a 30° C por 1,5 horas. Após a incubação, as proteínas foram precipitadas em TCA a 28% seguido de centrifugação a 9000 g por 10 minutos. O pellet foi lavado três vezes por ressuspensão (etanol/ acetato de etila 1:1), homogeneizado e centrifugado. As proteínas foram então solubilizadas em cloreto de guanidina (6M) e agitadas em vortex. O conteúdo de carbonilas foi determinado em espectrofotômetro de microplaca a 360 nm utilizando o coeficiente de absorção molar de  $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para hidrazonas. O branco recebeu o mesmo tratamento, contudo sem a adição do DNPH. Os resultados foram expressos em nmol carbonilas por  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

##### 4.2.3.2 Lipoperoxidação (LPO) – Ensaio TBARS

O ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi realizado de acordo com Camejo et al. [36] para medida de lipoperoxidação. Ao sobrenadante foi acrescentado butilhidroxitolueno (BHT 1 M), solução salina fosfatada (2 mM KCl; 1,4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 357 mM NaCl; 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH = 7), ácido tricloroacético (TC

50%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 1,3%) dissolvido em 0,3 % NaOH e a mistura foi mantida a 60° C por 1 hora. Posteriormente, foi realizada uma leitura de fluorescência (590 nm) e a concentração de TBARS determinada por meio de uma curva padrão de malondialdeído (MDA). A concentração de TBARS foi expressa em nmol de TBARS mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### *4.2.3.3 Proteínas totais*

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford [37], que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich, Brasil). A curva de calibração foi feita com albumina de soro bovino (BSA) e a absorbância lida em espectrofotômetro a 595 nm. A quantidade de proteínas totais na amostra foi utilizada para normalização do sobrenadante da carbonilação de proteínas e para expressar os dados da TBARS.

#### *4.2.4 Análise Estatística*

Os resultados dos biomarcadores obtidos nos diferentes tratamentos, para cada tempo experimental, foram comparados entre si (CTR x LC x IMI x LC+IMI) por meio de testes paramétricos (ANOVA) ou não-paramétricos (Kruskall-Wallis), seguidos por testes de comparações múltiplas (Student-Newman-Keuls) quando indicado, de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância), utilizando-se o software SigmaPlot 11.0. Os resultados não-paramétricos foram transformados (Log10), quando possível. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 *Ensaio do cometa*

Os peixes do grupo LC apresentaram escore de danos no DNA em células branquiais, eritrócitos e células hepáticas significativamente maiores que os respectivos CTR, em todos os tempos de exposição (Fig. 8A, 8B e 8C) e nas células cerebrais, apenas em 96 h de exposição (Fig. 8D). Além disso, os peixes do grupo LC apresentaram frequências significativamente menores de nucleóides de classe 0 em células branquiais, eritrócitos e hepatócitos em todos os tempos de exposição, quando comparados aos respectivos CTR (Fig. 9A, 9B e 9C), em células cerebrais, apenas em 144 h (9D). Notou-se frequências significativamente maiores de nucleóides de classe 1 em células branquiais, em 48 e 192 h de exposição (Fig. 9A), em eritrócitos e hepatócitos, em 48 e 144 h, quando comparados aos respectivos CTR (Fig 9B e 9C). Ainda, ocorreram frequências significativamente maiores de nucleóides de classe 2 em células branquiais, em 48 e 144 h de exposição (9A) e em eritrócitos, apenas em 48 h de exposição quando comparados aos respectivos CTR (Fig 9B).

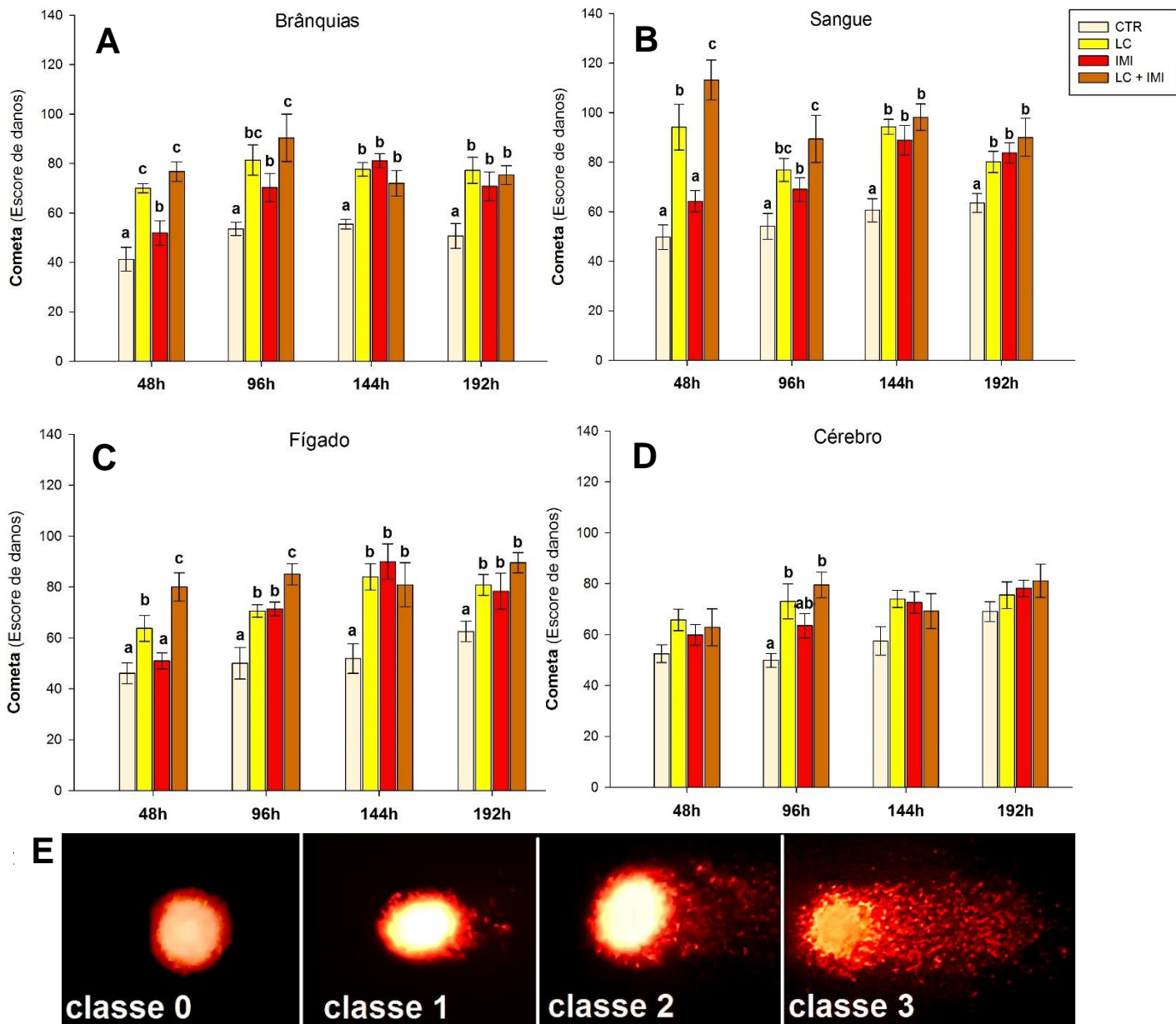
Os peixes do grupo IMI apresentaram escore de danos no DNA em células branquiais em todos os tempos de exposição (Fig. 8A), nos eritrócitos e células hepáticas, em 96, 144 e 192 h significativamente maiores quando comparados aos respectivos CTR (Fig. 8B e 8C). Além disso, os peixes do grupo IMI apresentaram frequências significativamente menores de nucleóides de classe 0 em células branquiais em todos os tempos de exposição (Fig 9A), em eritrócitos, em 48, 144 e 192 h, e em hepatócitos, em 96, 144 e 192 h, quando comparados aos respectivos CTR (9B e 9C) Notou-se frequências significativamente maiores de nucleóides de classe 1 em células branquiais e eritrócitos, em 48, 144 e 192 h de exposição quando comparados aos respectivos CTR (Fig. 9A e 9B), nos hepatócitos, apenas em 144 h (Fig. 9C). Houve ainda, uma frequência significativamente menor de nucleóides de classe 2 em células branquiais, apenas em 48 h de exposição com relação ao CTR (Fig. 9A).

Os peixes do grupo LC + IMI apresentaram escore de dano no DNA em células branquiais, eritrócitos e células hepáticas, significativamente maiores que os respectivos CTR em todos os tempos de exposição (8A, 8B e 8C), nas células cerebrais, apenas em 96 h de exposição (8D). Além disso, os peixes do grupo LC +

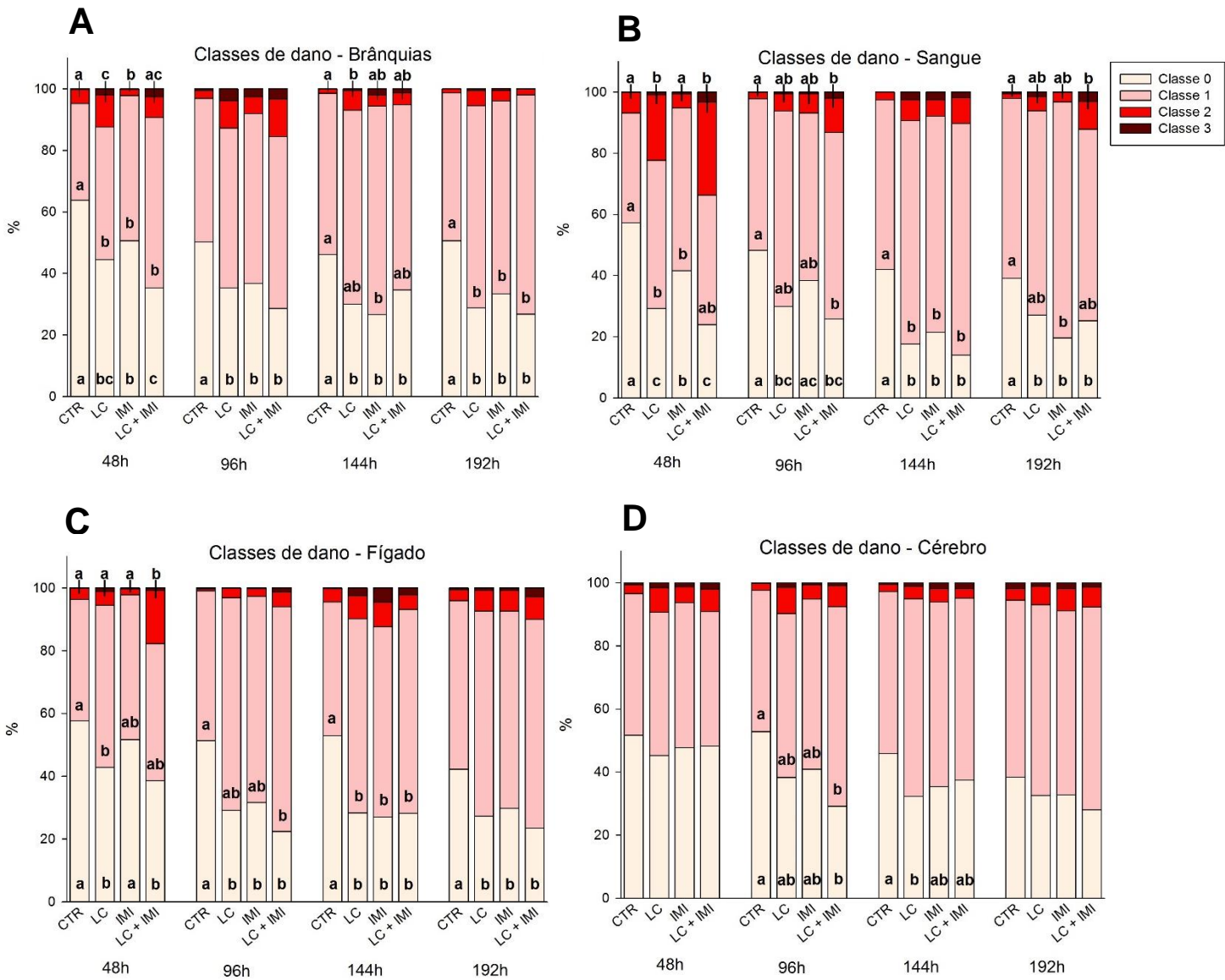
IMI apresentaram frequências significativamente menores de nucleóides de classe 0 em células branquiais, eritrócitos e hepatócitos em todos os tempos de exposição quando comparado aos respectivos CTR (Fig. 9A, 9B e 9C), em células cerebrais, apenas em 96 h. Notou-se frequências significativamente maiores de nucleóides de classe 1 em células branquiais, em 48 e 192 h de exposição (Fig. 9A), em eritrócitos e hepatócitos em 96 e 144 h (9B e 9C), em células cerebrais, apenas em 96 h (9D) quando comparados aos respectivos CTR. Houve ainda, frequências significativamente maiores de nucleóides de classe 2 em eritrócitos, em 48, 96 e 192 h de exposição, em hepatócitos, apenas em 48 h quando comparados aos respectivos CTR.

#### 4.3.2 Alterações eritrocíticas nucleares totais (AENs totais)

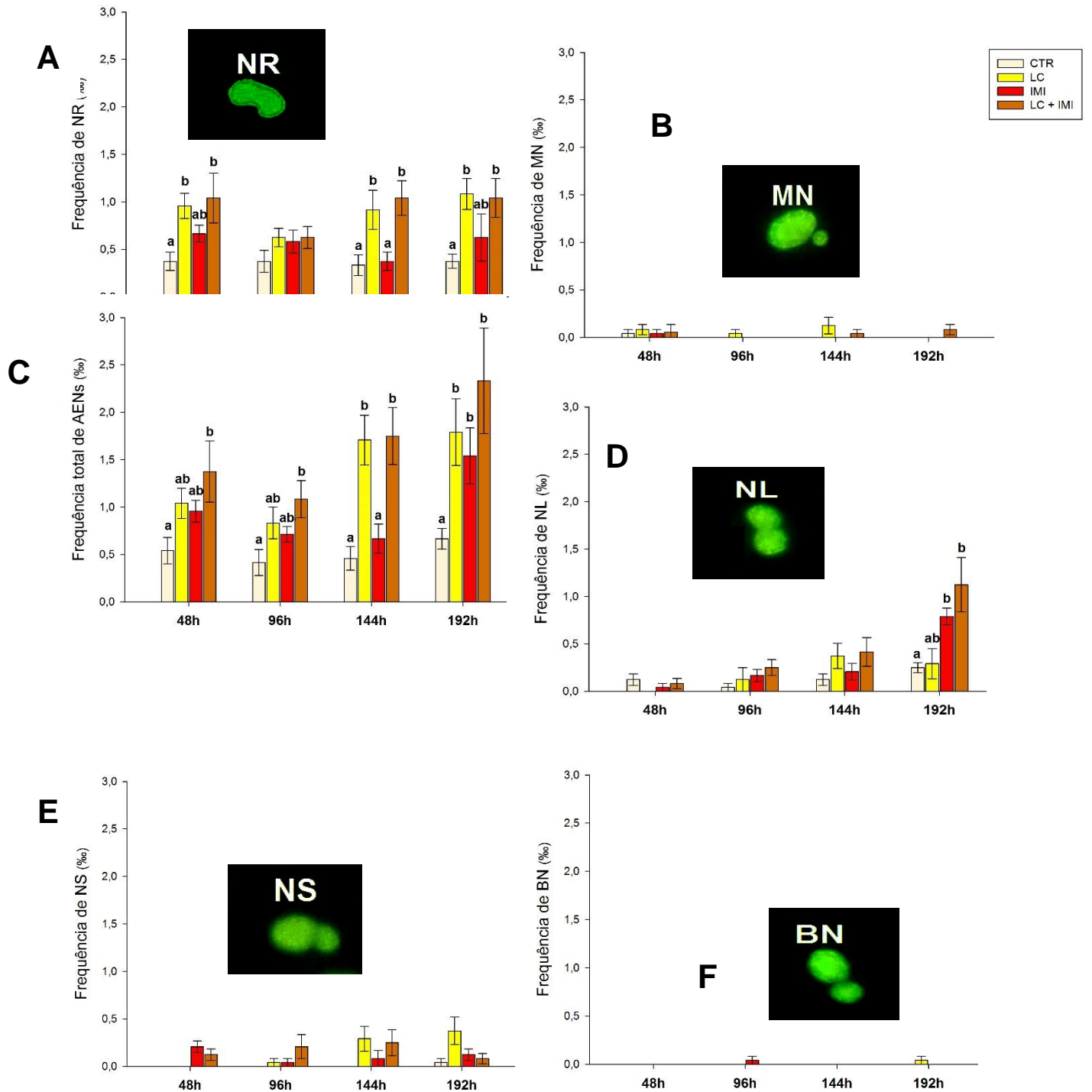
Os peixes do grupo LC apresentaram aumento significativo na frequência de AENs com relação ao CTR, em 144 e 192 h de exposição, quando analisadas em conjunto (Fig. 10A). Quando comparadas individualmente, os peixes do grupo LC apresentaram aumento significativo na frequência de NR, após todos os tempos de exposição, exceto em 96 h (Fig. 10C). Os peixes do grupo IMI, apresentaram aumento significativo na frequência de AENs, com relação ao CTR, apenas em 192 h de exposição, quando analisadas em conjunto (Fig. 10A). Quando comparadas individualmente, os peixes do grupo IMI apresentaram aumento significativo na frequência de NL, apenas em 192 h de exposição (Fig. 10D). Em relação aos peixes do grupo LC + IMI, aumentos significativos na frequência de AENs foram observados, após todos os tempos de exposição, quando analisados em conjunto. Quando comparadas individualmente, os peixes do grupo LC + IMI apresentaram aumento significativo na frequência de NR, após todos os tempos de exposição, exceto em 96 h (Fig. 10C) e NL, apenas em 192 h de exposição (Fig. 10D). As AENs mais frequentes foram NR (Fig. 10C), seguido por NL (Fig. 10D), NS (Fig. 10E) e MN (Fig. 10B). As células binucleadas (Fig. 10F) também foram constatadas em baixa frequência e apenas nos peixes dos grupos IMI (96 h) e LC (144 h).



**Figura 8** – Escore de danos no DNA nas brânquias (A), sangue (B), fígado (C) e cérebro (D) de *Prochilodus lineatus* expostos aos inseticidas LC ( $150 \text{ ng L}^{-1}$ ) e IMI ( $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) isolados e em mistura (LC+IMI) por 48, 96, 144 e 192 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP ( $n = 8$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo de exposição ( $p < 0,05$ ). Fotomicrografia mostrando as diferentes classes de cometa consideradas no cálculo do escore de danos (E).



**Figura 9** – Frequência das classes de nucleóides danificados de brânquias (A), sangue (B), fígado (C) e cérebro (D) de *Prochilodus lineatus* expostos aos inseticidas LC (150 ng L<sup>-1</sup>) e IMI (100 µg L<sup>-1</sup>) isolados e em mistura (LC+IMI) por 48, 96, 144 e 192 h. As barras representam as médias. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo de exposição (p < 0,05).



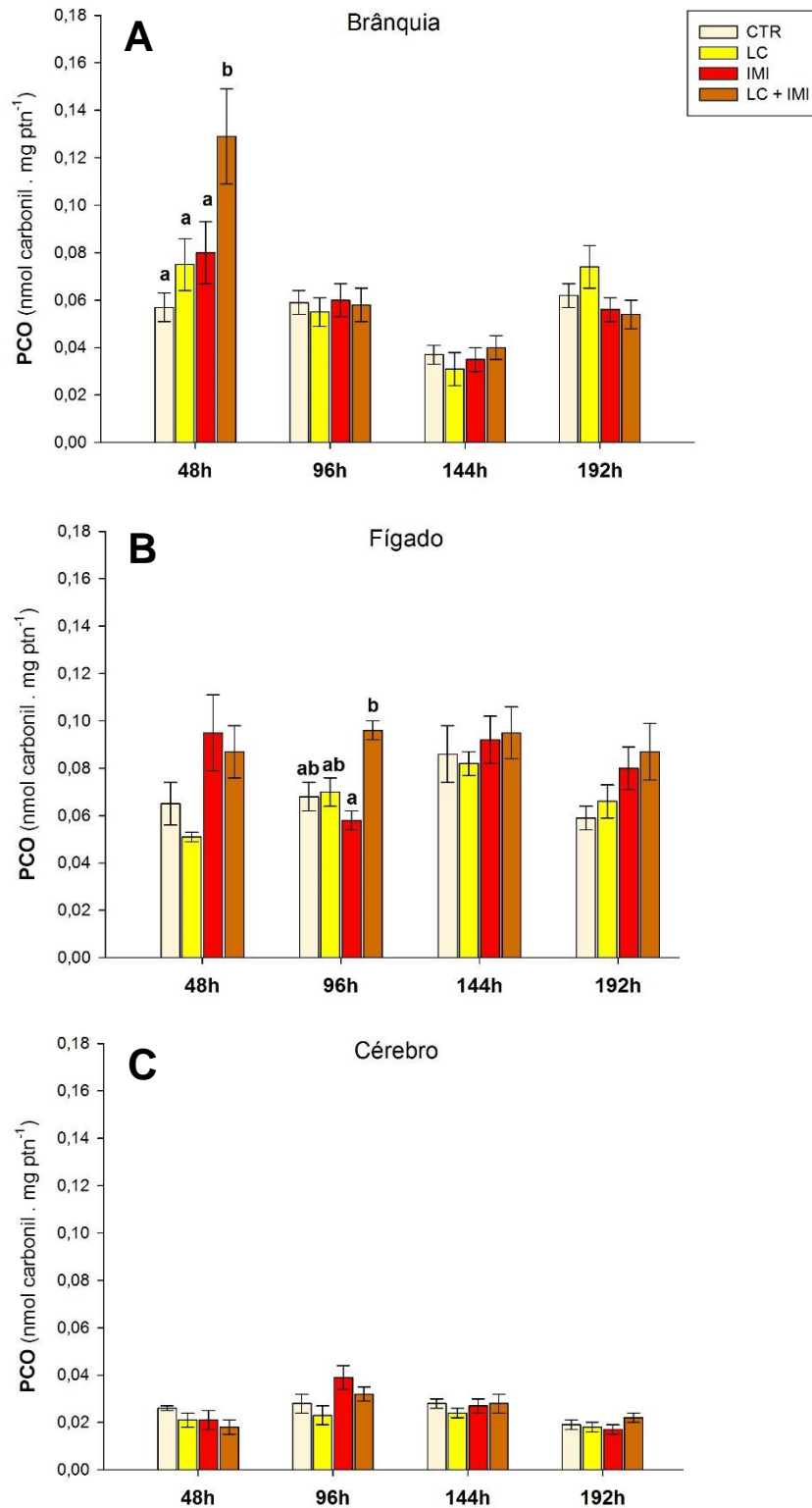
**Figura 10** - Frequência total de AENs (A) e de micronúcleos (MN) (B), núcleos em forma de rim (NR) (C), núcleos lobulados (NL) (D), núcleos segmentados (NS) (E) e células binucleadas (BN) (F) em eritrócitos de *P. lineatus* expostos aos inseticidas LC (150 ng L<sup>-1</sup>) e IMI (100 µg L<sup>-1</sup>) isolados e em mistura (LC+IMI) por 48, 96, 144 e 192 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo de exposição (p < 0,05). Inseridas nos gráficos estão apresentadas fotomicrografias das alterações representadas (coloração com laranja de acridina).

#### 4.3.3 Carbonilação de proteínas (PCO)

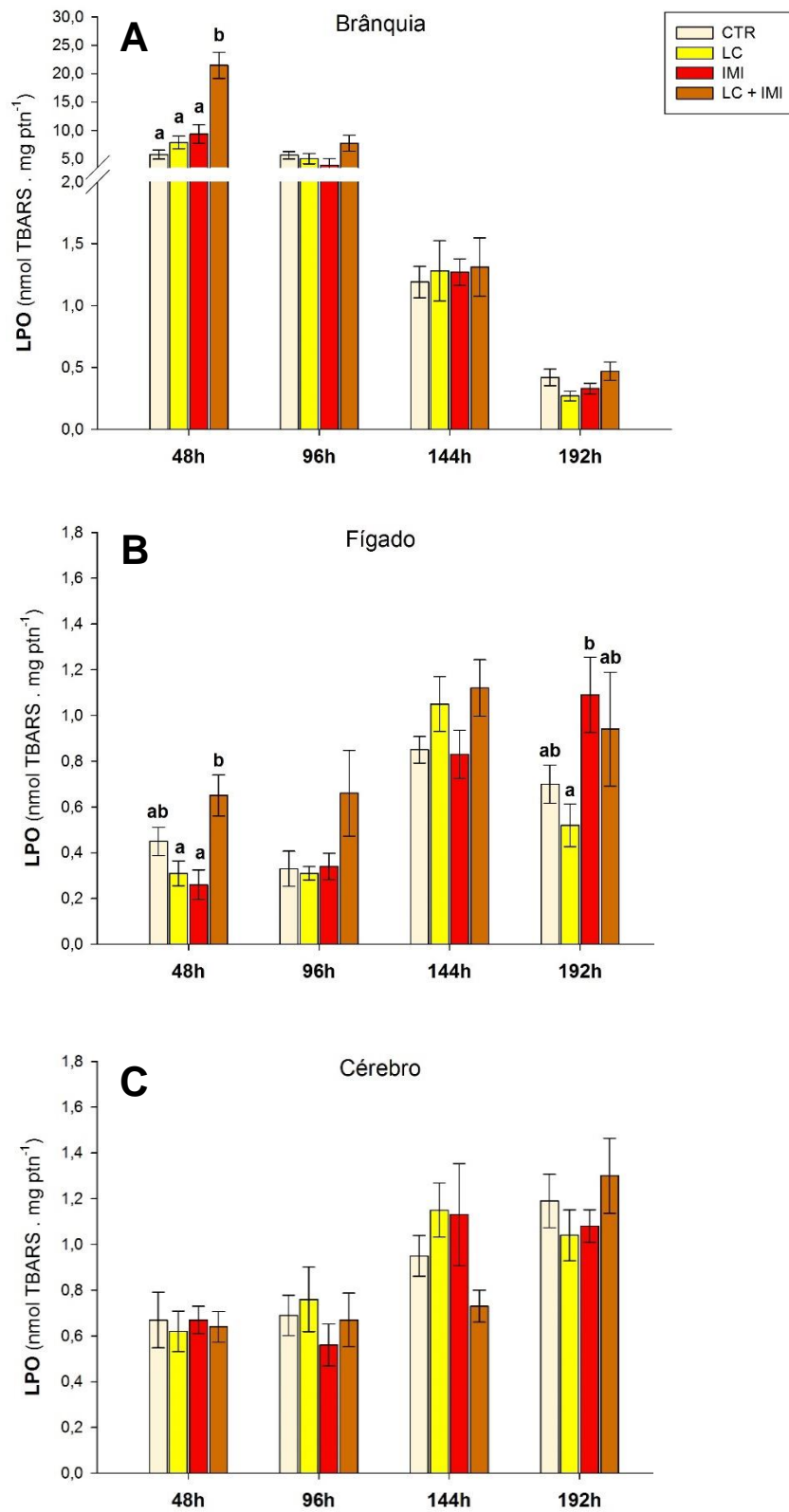
Os peixes do grupo LC + IMI apresentaram aumento significativo da PCO de brânquias com relação aos demais grupos experimentais, apenas em 48 h de exposição (Fig. 11A), no fígado, apenas em 96 h de exposição, quando comparados aos peixes do grupo IMI (Fig. 11B).

#### 4.3.4 Lipoperoxidação (LPO)

Os peixes do grupo IMI apresentaram aumento significativo da LPO do fígado, com relação aos peixes do grupo LC, apenas em 192 h de exposição (Fig. 12B). Já os peixes do grupo LC + IMI apresentaram aumento significativo da LPO de brânquias, com relação aos demais grupos experimentais, apenas em 48 h de exposição (Fig. 12A), no fígado, apenas em 48 h de exposição, com relação aos peixes dos grupos LC e IMI.



**Figura 11** – Carbonilação de proteínas (PCO) em brânquias (A), fígado (B) e cérebro (C) de *Prochilodus lineatus* expostos aos inseticidas LC ( $150 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e IMI ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) isolados e em mistura (LC+IMI) por 48, 96, 144 e 192 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP ( $n = 8-10$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo de exposição ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12** – Lipoperoxidação (LPO) em brânquias (A), fígado (B) e cérebro (C) de *Prochilodus lineatus* expostos aos inseticidas LC (150 ng L<sup>-1</sup>) e IMI (100 µg L<sup>-1</sup>) isolados e em mistura (LC+IMI) por 48, 96, 144 e 192 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 8-10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo de exposição (p < 0,05).

#### 4.4 DISCUSSÃO

A avaliação sobre os efeitos genotóxicos do inseticida Lambda-cialotrina (LC) em peixes ainda é limitada e foi realizada pela primeira vez por Campana et al. [38] por meio do teste do micronúcleo. O presente estudo, com base na literatura pesquisada, é o primeiro a relatar danos no DNA em diferentes órgãos de um peixe após a exposição ao inseticida LC, por meio do ensaio do cometa. Nossos resultados mostraram que os peixes expostos à LC apresentaram aumento nos danos no DNA em células branquiais, eritrócitos e hepatócitos em todos os tempos de exposição e em células cerebrais, apenas em 96 h de exposição. Um possível mecanismo para explicar esse efeito genotóxico dos piretroides seria que dentro do núcleo das células, os piretroides se ligam ao DNA através dos grupos reativos da sua fração ácida, levando a desestabilização e ao desenrolamento do DNA, ocasionando danos ao material genético [39]. A exposição à LC também causou aumento na frequência de AENs totais nos tempos mais longos de exposição (144 e 192 h), e a presença de núcleo em forma de rim (NR) foi a alteração mais comum encontrada para este inseticida.

Apesar da LC não ter induzido a formação de MN notamos claramente que promoveu alterações na estrutura do núcleo dos eritrócitos de *P. lineatus* nos tempos mais longos (144 e 192 h), ocasionando alterações eritrocíticas nucleares, que podem ser consideradas indicadoras de eventos genotóxicos. Entretanto, o mecanismo responsável pela formação dessas AENs ainda não está totalmente esclarecido [24]. A explicação mais aceita seria que ao ser detectada uma região com dano é iniciado um processo de reparo e eliminação da cromatina e antes que este processo seja concluído, a membrana nuclear irá apresentar algumas imperfeições, as quais se caracterizam as AENs [40]. A formação de AENs também poderia estar relacionada com o estresse oxidativo, devido ao aumento da permeabilidade da membrana nuclear como resultado da LPO, tornando o núcleo mais susceptível a alterações promovidas por contaminantes [41]. Por fim, a ação desses contaminantes e de seus metabólitos, poderiam causar quebras no material genético e induzir a apoptose [42]. Neste processo, ocorre a fragmentação da cromatina, formando pequenas massas rodeadas na membrana nuclear além do mais, em alguns casos, a toxicidade desses contaminantes poderia ser tão severa que comprometeria a formação de ATP ou ainda impediria que os fagócitos

removessem todas as células mortas, não completando o processo apoptótico, originando então, essas AENs [43].

Os peixes expostos ao IMI apresentaram aumento de danos no DNA em células branquiais, em todos os tempos de exposição e em eritrócitos e hepatócitos, em 96, 144 e 192 h de exposição. Nesses peixes não houve aumento na ocorrência de danos no DNA no cérebro. A exposição ao IMI causou aumento significativo na frequência de AENs totais apenas no maior tempo de exposição e o núcleo lobulado (NL) foi a alteração eritrocítica em destaque para este inseticida. Resultados semelhantes foram observados por Vieira et al. [6], também para *P. lineatus*, assim como para outras espécies de peixes, como *Gobiocypris rarus* [44] e *Misgurnus anguillicaudatus* [9], após exposição a diferentes concentrações de IMI. Esses resultados indicam que o IMI é capaz de promover efeitos genotóxicos, podendo atuar como um agente alquilante, formando adutos de DNA [45,46] ou ainda, podendo causar danos oxidativos no DNA, como já relatado por Iturburu et al. [24]. Sendo assim, o IMI é capaz de promover danos no DNA em diferentes tecidos, podendo variar quanto ao tempo de exposição. Além disso, o IMI pode alterar estrutura do núcleo dos eritrócitos, ocasionando a formação de alterações eritrocíticas nucleares.

Assim como os peixes expostos aos inseticidas isolados, os peixes expostos à mistura (LC + IMI) também apresentaram maiores valores de escores de danos no DNA em células branquiais em relação ao CTR; entretanto, cabe destacar que esses valores não foram diferentes daqueles dos peixes expostos apenas à LC, indicando que o efeito da mistura deve-se principalmente à presença do piretroide. Os piretroides possuem uma alta lipofilicidade, podendo se acumular nos tecidos, deste modo, a maior frequência de danos no DNA nas brânquias notada em todos os tempos de exposição poderia ser explicada pelo fato que, esse órgão está envolvido na absorção de contaminantes, pois, estão em contato direto com esses compostos [46].

Nas células de sangue e fígado dos peixes expostos à mistura notou-se um aumento de danos no DNA em todos os tempos de exposição em relação ao CTR, no tempo de 48 h esses valores também foram maiores em relação à LC e IMI no sangue e fígado e no tempo de 96 h apenas no fígado. Esses resultados indicam uma provável interação sinérgica entre LC e IMI nos tempos de exposição mais curtos (48 e 96 h). A maior frequência de AENs totais nos tempos de 48 e 96 h nos

peixes expostos a mistura corroboram a ideia de interação entre LC e IMI. Outros autores também já sugeriram que a mistura desses inseticidas é capaz de proporcionar uma interação sinérgica entre eles, promovendo uma toxicidade aumentada para peixes [9]. Apesar desses inseticidas, LC e IMI, possuírem diferentes modos de ação, ambos atuam no sistema nervoso e suas combinações podem aumentar a toxicidade para os organismos [9]. Fai et al. [5] ao expor o peixe *Oreochromis niloticus* à mistura de inseticidas piretroides com inseticidas organofosforados, constataram que os organofosforados podem interferir na desintoxicação dos piretroides, diminuindo sua metabolização, aumentando assim, a toxicidade dos piretroides. Assim, os efeitos sinérgicos em nosso estudo provavelmente se devem principalmente ao aumento da toxicidade do LC na mistura, observado nos menores tempos (48 e 96 h), no sangue e no fígado, indicando que o IMI talvez possa estar interferindo na desintoxicação da LC.

Nossos resultados indicaram a predominância de nucleoides com danos de classe 1 em todos os grupos experimentais, na maioria dos órgãos analisados e nos diferentes tempos de exposição. Uma maior frequência de nucleoides com danos de classe 2 foi observada apenas nos grupos LC e LC + IMI em células branquiais, eritrócitos e hepatócitos, principalmente nos tempos de exposição mais curtos (48 e 96h). Essa variação entre os tecidos analisados pode estar relacionada aos diferentes tipos celulares, ao número de sítios álcali-lábeis, a atividade metabólica e a concentração de antioxidantes de cada tecido. Além desses fatores, a variação da atividade do sistema de reparo através dos processos de reparo do DNA por excisão de base (BER) e/ ou reparo de excisão de nucleotídeos (NER) também pode ter interferido na presença de nucleoides danificados em cada tecido [47,48], e é provável que parte dos danos de classe 1 e 2 observada nos diferentes tecidos analisados seja reparável [49]. Assim, apesar da redução de nucleoides com danos de classe 2 em células branquiais e eritrócitos não ter sido linear ao longo do tempo, pode indicar reparo no DNA ou perda dessas células danificadas, ou ambos [50]. No caso dos eritrócitos, a variação nos danos no DNA e na frequência de AENs, ao longo do tempo, também pode estar relacionada à cinética das células sanguíneas e à reposição de eritrócitos desses animais [51].

Dentre todos os tecidos estudados, o cérebro foi o menos afetado pela ação dos inseticidas e apresentou aumento no escore de danos no DNA apenas em 96 h de exposição à LC e a mistura (LC + IMI). Os produtos químicos levam mais tempo

para chegar ao cérebro do que outros tecidos, pois, precisam atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) [52] e alguns autores já constataram que piretroides conseguem atravessar a BHE [53]. Além disso, outro motivo para justificar o fato do cérebro ter sido o órgão menos afetado seja devido a sua capacidade de reparo de DNA por excisão de base (BER), que pode ser de 2 a 3 vezes maior que no fígado e nas brânquias, que possuem atividade de reparo semelhantes [54]. Desta forma, podemos sugerir que a LC foi capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e causar danos no DNA em 96h, porém, nos tempos mais longos de exposição, os danos diminuíram devido à grande atividade de reparo de DNA por BER presente neste órgão.

Entre os biomarcadores clássicos de estresse oxidativo, destacam-se a quantificação de proteínas carboniladas (PCO) e a lipoperoxidação (LPO). As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem causar modificações em cadeias laterais de aminoácidos, provocando uma alteração na estrutura ou função das proteínas, podendo levar a sua inativação ou degradação, além disso, podem causar danos aos lipídios da membrana celular refletindo na perda da integridade da membrana, podendo levar a célula a apoptose [55,56,57,58].

No presente trabalho os peixes expostos ao LC e ao IMI isolados não apresentaram variação significativa da PCO e da LPO em brânquias, fígado e no cérebro com relação ao grupo CTR em nenhum dos tempos de exposição. Esses resultados indicam que tanto o LC quanto o IMI, quando isolados e nas concentrações testadas, não foram capazes de causar danos oxidativos em proteínas e lipídeos. Possivelmente, a ativação das defesas antioxidantes impediu o estresse oxidativo nesses órgãos, assim como já relatado em alguns trabalhos com peixes expostos ao LC [8] e ao IMI [6,45].

Entretanto, a exposição à mistura (LC + IMI) promoveu aumento da PCO e da LPO em brânquias em relação aos demais grupos, em 48 h de exposição. Além disso, a mistura promoveu aumento da LPO, em 48 h e da PCO, em 96 h no fígado, quando comparado ao grupo IMI isolado. Esses resultados reforçam uma provável interação sinérgica desses inseticidas nas brânquias e no fígado, nos tempos mais curtos de exposição (48 e 96 h), como já discutido anteriormente.

Um dos mecanismos de ação genotóxica dos piretroides parece ser seu efeito indutivo ao estresse oxidativo, sendo o dano oxidativo ao DNA uma das causas mais comuns de genotoxicidade [59,60]. Da mesma forma, o IMI é capaz de causar danos

genotóxicos de origem oxidativa, especificamente nas bases de pirimidina, como observado por Iturburu et al. [24] no peixe *Australoheros facetus* expostos ao IMI por 48 h. Isso explicaria em parte os danos observados no DNA das células branquiais e hepáticas promovidos pela mistura, nos tempos mais curtos de exposição. Além disso, é possível que nesses tempos de 48 e 96 h, as defesas antioxidantes não tenham sido suficientes para combater danos oxidativos em proteínas e lipídios nas brânquias e no fígado, porém, nos demais tempos de exposição (144 e 192), essas defesas apresentaram um estado de adaptação a mistura de LC + IMI, fazendo com que a PCO e a LPO nas brânquias e no fígado de *Prochilodus lineatus* sejam semelhantes ao grupo CTR. No cérebro, possivelmente, as defesas antioxidantes foram suficientes para prevenir danos oxidativos em proteínas e lipídeos quando expostos à mistura desses inseticidas.

Em resumo, esses resultados mostram claramente que os inseticidas isolados e em mistura são capazes de promover danos no DNA em diferentes tecidos e alterações na estrutura do núcleo dos eritrócitos de *P. lineatus*, variando quanto ao tempo de exposição. Além disso, nos menores tempos de exposição, houve uma provável interação sinérgica entre esses inseticidas no sangue, em 48 h e no fígado, em 48 e 96 h. A LC demonstrou ser o inseticida mais tóxico, mesmo em concentrações menores que o IMI, promovendo danos no DNA em todos os órgãos analisados, indicando que o efeito da mistura se deve principalmente à presença desse piretroide. A mistura desses inseticidas ainda promoveu aumento da PCO e LPO em brânquias e fígado nos menores tempos de exposição, reforçando uma provável interação sinérgica. O resultado dessa interação entre os inseticidas claramente promove aumento da toxicidade em tempos mais curtos, o que pode ser muito prejudicial para peixes em seu ambiente natural. Dentre todos os tecidos estudados, as brânquias demonstraram-se ser o tecido mais sensível a ação desses inseticidas, devido principalmente ao fato de ser o órgão que está em contato direto com a via de exposição desses compostos. Em contrapartida, o cérebro demonstrou-se ser o órgão menos sensível a ação da LC e do IMI, provavelmente devido a presença da BHE e de sua maior capacidade de reparo comparada aos demais órgãos analisados.

## 1 REFERÊNCIAS

2

- 3 [1] S.E. Lewis, D.M. Silburn, R.S. Kookana, M. Shaw, Pesticide behavior, fate, and  
4 effects in the tropics: an overview of the current state of knowledge, *J. Agr. Food*  
5 *Chem.* 64 (2016) 3917-3924. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01320>.
- 6 [2] A.F. Albuquerque, J.S. Ribeiro, F. Kummrow, A.J.A. Nogueira, C.C. Montagner,  
7 G.A. Umbuzeiro, Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environ. Sci-*  
8 *Proc. Imp.* 18 (2016) 779–787. <https://doi.org/10.1039/c6em00268d>.
- 9 [3] A.M.B. Amaral, J.D.L.C. Gomes, G.H. Weimer, A.T. Marins, V.L. Loro, R. Zanella,  
10 Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes,  
11 1835) from a subtropical reservoir, *Chemosphere.* 191 (2018) 876-885.  
12 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.114>.
- 13 [4] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, UFPR – Universidade  
14 Federal do Paraná, Seminário de mercado de agrotóxico e regulação.  
15 [http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-](http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-2012/rap-09-de-maio-de-2012-anvisa-agenor,2012)  
16 [permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-2012/rap-09-de-maio-de-2012-](http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-2012/rap-09-de-maio-de-2012-anvisa-agenor,2012)  
17 [anvisa-agenor, 2012 \(accessed 22 March 2017\).](http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-2012/rap-09-de-maio-de-2012-anvisa-agenor,2012)
- 18 [5] P.B.A. Fai, J.S.T. Kinfack, Y.J.T. Towa, Acute effects of binary mixtures of Type II  
19 pyrethroids and organophosphate insecticides on *Oreochromis niloticus*,  
20 *Ecotoxicology*, 26 (2017) 889-901. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1819-y>.
- 21 [6] C.E.D. Vieira, M.R. Pérez, R.D. Acayaba, C.C.M. Raimundo, C.B.R. Martinez,  
22 DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different  
23 tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*, *Chemosphere.* 195 (2018) 125-  
24 134. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.077>.
- 25 [7] F.G. Iturburu, L. Bertrand, J.R. Mendieta, M.V. Amé, M.L. Menone, An integrated  
26 biomarker response study explains more than the sum of the parts: Oxidative stress  
27 in the fish *Australoheros facetus* exposed to imidacloprid, *Ecol. Indic.* 93 (2018a)  
28 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.08.009>.
- 29 [8] C. Bacchetta, A. Rossi, A. Ale, M. Campana, M.J. Parma, J.I. Cazenave,  
30 Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach, *Ecol.*  
31 *Indic.* 36 (2014) 532-538. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.09.016>.

- 1 [9] X. Xia, X. Xia, H. Weiran, D. Hui, Z. Linxia, Z. Chang, Toxic effects of imidacloprid  
2 on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), Environ. Toxicol. Pharmacol. 45 (2016)  
3 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.030>.
- 4 [10] K. Regan, D. Ordosch, K.D. Glover, K.J. Tilmon, A. Szczepaniec, Effects of a  
5 pyrethroid and two neonicotinoid insecticides on population dynamics of key pests of  
6 soybean and abundance of their natural enemies, Crop Prot. 98 (2017) 24-32.  
7 <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.004>.
- 8 [11] Y. Wang, C. Chen, Y. Qian, X. Zhao, Q. Wang, X. Kong, Toxicity of mixtures of  
9  $\lambda$ -cyhalothrin, imidacloprid and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida* by  
10 combination index (CI)-isobologram method, Ecotox. Environ. Safe. 111 (2015) 242-  
11 247. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.015>.
- 12 [12] J.P. van der Sluijs, V. Amaral-Rogers, L.P. Belzunces, M.F.I.J. Bijleveld van  
13 Lexmond, J.M. Bonmatin, M. Chagnon, C.A. Downs, L. Furlan, D.W. Gibbons, C.  
14 Giorio, V. Girolami, D. Goulson, D.P. Kreutzweiser, C. Krupke, M. Liess, E. Long, M.  
15 Mcfield, P. Mineau, E.A.D. Mitchell, C.A. Morrissey, D.A. Noome, L. Pisa, J. Settele,  
16 N. Simon-Delso, J.D Stark, A. Tapparo, H. Van Dyck, J. Van Praagh, P.R. Whitehorn,  
17 M. Wiemers, Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of  
18 neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning, Environ. Sci.  
19 Pollut. R. 22 (2015) 148-154. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3229-5>.
- 20 [13] L. Hunt, C. Bonetto, V.H. Resh, D.F. Buss, S. Fanelli, N. Marrochi, M.J. Lydy,  
21 Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South  
22 America, Sci. Total Environ. 547 (2016) 114-124.  
23 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.140>.
- 24 [14] J. Possavatz, P. Zeilhofer, A.A Pinto, A.L. Tives, F.F.G.C. Dores, Resíduos de  
25 pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato  
26 Grosso, Brasil, Amb. Água – Interd. J. Appl. Sci. 9 (2014) 84-94.  
27 <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1263>.
- 28 [15] A. O. Affum, S.O. Acquah, S.D. Osaе, E.E. Kwaansa-Ansah, Distribution and  
29 risk assessment of banned and other current-use pesticides in surface and  
30 groundwaters consumed in an agricultural catchment dominated by cocoa crops in  
31 the Ankobra Basin, Ghana, Sci. Total Environ. 633 (2018) 630-640.  
32 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.129>.
- 33 [16] T.C. Van Dijk, M.A. Van Staalduinen, J.P. Van der Sluijs, Macro-invertebrate  
34 decline in surface water polluted with imidacloprid, PloS One. 8 (2013) p. e62374.  
35 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062374>.

- 1 [17] S. Shukla, R.C Jhamtani, M.S. Dahiya, R. Agarwal, Oxidative injury caused by  
2 individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide  
3 in zebrafish, *Toxicol. Rep.* 4 (2017) 240-244.  
4 <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.05.002>.
- 5 [18] E.C. Bortoluzzi, D.S. Rheinheimer, C.S Gonçalves, J.B.R. Pellegrini, R. Zanella,  
6 A.C.C. Copetti, Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do  
7 uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS, *Rev. Bras. Eng. Agr. Amb.*  
8 10 (2006) 881-887. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662006000400015>.
- 9 [19] A.G. Becker, B.S. Moraes, C.C. Menezes, V.L. Loro, D.R. Santos, J.M. Reichert,  
10 B. Baldisserotto, Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile  
11 silver catfish, *Rhamdia quelen*, *Ecotox. Environ. Safe.* 72 (2009) 1734-1739.  
12 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.01.006>.
- 13 [20] L.M. He, J. Troiano, A. Wang, K. Goh, Environmental chemistry, ecotoxicity, and  
14 fate of lambda-cyhalothrin, in: L.M. He, J. Troiano, A. Wang, K. Goh (Eds.), *Reviews*  
15 *of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer New York, 2008, pp. 71-  
16 91. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-77030-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-77030-7_3).
- 17 [21] D. Gibbons, C. Morrissey, P. Mineau, A review of the direct and indirect effects  
18 of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife, *Environ. Sci. Pollut. R.* 22 (2015)  
19 103-118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>.
- 20 [22] P. Piner, N. Üner, Oxidative and apoptotic effects of lambda-cyhalothrin  
21 modulated by piperonyl butoxide in the liver of *Oreochromis niloticus*, *Environ.*  
22 *Toxicol. Phar.* 33 (2012) 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.01.001>.
- 23 [23] F.G. Iturburu, M. Zomisch, A.M. Panzeri, A.C. Crupkin, V. Contardo-jara, S.  
24 Pflugmacher, M.L. Menone, Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity  
25 of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*, *Environ. Toxicol. Chem.*  
26 36 (2016) 699-708. <https://doi.org/10.1002/etc.3574>.
- 27 [24] F.G. Iturburu, M.F. Simoniello, S. Medici, A.M. Panzeri, M.L. Menone,  
28 Imidacloprid Causes DNA Damage in Fish: Clastogenesis as a Mechanism of  
29 Genotoxicity, *B. Environ. Contam. Tox.* 1 (2018b) 1-5.  
30 <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2338-0>.

- 1 [25] Y. Wang, S. Wu, J. Chen, C. Zhang, Z. Xu, G. Li, L. Cai, W. Shen, Q. Wang,  
2 Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish  
3 (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints, Chemosphere. 192 (2018)  
4 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.129>.
- 5 [26] T.M. Barroca, M.A. Gutiérrez-Espinosa, A. Giraldo, A.G. Bedore, A.L. Godinho,  
6 Coded wire tagging of juvenile curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes,  
7 1837)(Characiformes): mortality, tag retention, and growth, Neotrop. Ichthyol. 13  
8 (2015) 383-388. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20140074>.
- 9 [27] C.B.R. Martinez, I.M.S. Cólus, Biomarcadores em peixes neotropicais para o  
10 monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi, in: M.E. Medri, E.  
11 Bianchini, O.A. Shibatta, J.A. Pimenta (Eds.), A bacia do Rio Tibagi, Editora dos  
12 Editores, Londrina-PR, 2002, pp. 551-577.
- 13 [28] L. Pereira, M.N. Fernandes, C.B.R. Martinez, Hematological and biochemical  
14 alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone,  
15 Environ. Toxicol. Phar. 36 (2013) 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.019>.
- 16 [29] Á.M.D.M.C. Gontijo, R.E. Barreto, G. Speit, V.A.V. Reyes, G.L. Volpato, D.M.F.  
17 Salvadori, Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay  
18 results, Mutat. Res-Gen. Tox. En. 534 (2003) 165-172.  
19 [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00276-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00276-0).
- 20 [30] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for  
21 quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, Exp. Cell Res. 175  
22 (1988) 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- 23 [31] M.M. Cestari, P.M.M. Lemos, C.A.O. Ribeiro, J.R.M.A. Costa, E. Pelletier,  
24 M.V.M. Ferraro, M.S. Mantovani, A.S. Fenocchio, Genetic damage induced by  
25 trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes,  
26 Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations, Genet.  
27 Mol. Biol. 27 (2004) 270-274.
- 28 [32] D.G.S.M. Cavalcante, C.B.R. Martinez, S.H. Sofia, Genotoxic effects of  
29 Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*, Mutat. Res-Gen. Tox. En, 655 (2008) 41-  
30 46. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.06.010>.
- 31 [33] T. Ueda, M. Hayashi, Y. Ohtsuka, T. Nakamura, J. Kobayashi, T. Sofuni, A  
32 preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining  
33 compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic  
34 cells, Water Sci. Technol. 25 (1992) 235-240.

- 1 [34] K.R. Carrasco, L. Tilbury, M.S. Myers, Assessment of the piscine micronucleus  
2 test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects, Can. J. Fish.  
3 Aquat. Sci. 47 (1990) 2123-2136. <https://doi.org/10.1139/f90-237>.
- 4 [35] R.L. Levine, J.A. Williams, E.P. Stadtman, E. Shacter, Carbonyl assays for  
5 determination of oxidatively modified proteins, Method. Enzymol. 233 (1994) 346-  
6 357.
- 7 [36] G. Camejo, B. Wallin, M. Enojärvi, Analysis of oxidation and antioxidants using  
8 microtiter plates, in: D. Armstrong (Eds.), Free radical and antioxidant protocols,  
9 Human Press, 1998, pp. 377-387.
- 10 [37] M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
11 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72  
12 (1976) 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- 13 [38] M.A. Campana, A.M. Panzeri, V.J. Moreno, F.N. Dulout, Genotoxic evaluation of  
14 the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the  
15 fish *Cheirodon interruptus interruptus*, Mutat. Res-Gen. Tox. En. 438 (1999) 155-161.  
16 [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00167-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00167-3).
- 17 [39] P.N. Saxena, L.K.S. Chauhan, S.K. Gupta, Cytogenetic effects of commercial  
18 formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic  
19 basis of chromosome damage, Toxicology. 216 (2005) 244-252.  
20 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.08.008>.
- 21 [40] N. Shimizu, N. Itoh, H. Utiyama, G.M. Wahl, Selective entrapment of  
22 extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S  
23 phase, J Cell Biol. 140 (1998) 1307-1320. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.6.1307>.
- 24 [41] R. Seriani, T.M.J. Ranzani-Paiva, Â.T. Silva-Souza, S.R. Napoleão, Hematology,  
25 micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas  
26 Gerais state, Brazil. Acta Sci. Biol. Sci. 33 (2011)  
27 <https://doi.org/10.4025/actascibiolsoci.v33i1.7117>.
- 28 [42] M.C. Peitsch, H.G. Mannherz, J. Tschopp, The apoptosis endonucleases:  
29 cleaning up after cell death?, Trends Cell Biol. 4 (1994) 37-41.  
30 [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0962-8924(94)90002-7).

- 1 [43] Z. Zakeri, R.A. Lockshin, Cell death during development. J Immunol Methods.  
2 265 (2002) 3-20. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00067-4).
- 3 [44] X. Hong, X. Zhao, X. Tian, J. Li, J. Zha, Changes of hematological and  
4 biochemical parameters revealed genotoxicity and immunotoxicity of neonicotinoids  
5 on Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*), Environ. Pollut. 233 (2018) 862-871.  
6 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.036>.
- 7 [45] J. Bianchi, D.C. Cabral-de-Mello, M.A. Marin-Morales, Toxicogenetic effects of  
8 low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and  
9 in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*, Ecotox.  
10 Environ. Safe. 120 (2015) 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.040>.
- 11 [46] W. Ge, S. Yan, J. Wang, L. Zhu, A. Chen, J. Wang, Oxidative stress and DNA  
12 damage induced by Imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*), J. Agr. Food Chem. 63  
13 (2015) 1856-1862. <https://doi.org/10.1021/jf504895h>.
- 14 [47] G. Mohanty, J. Mohanty, A.K. Nayak, S. Mohanty, S.K. Dutta, Application of  
15 comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*)  
16 fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate  
17 pesticide, Ecotoxicology. 20 (2011) 283-292. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0580-2>.
- 19 [48] R.F. Lee, S. Steinert, Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for  
20 detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, Mutat. Res-Rev.  
21 Mutat. 544 (2003) 43-64. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00017-6).
- 22 [49] A. Kienzler, S. Bony, A. Devaux, DNA repair activity in fish and interest in  
23 ecotoxicology: a review, Aquat. Toxicol. 134 (2013) 47-56.  
24 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.005>.
- 25 [50] B.S. Banu, K. Danadevi, M.F. Rahman, Y.R. Ahuja, J. Kaiser, Genotoxic effect of  
26 monocrotophos to sentinel species using comet assay, Food Chem. Toxicol. 39  
27 (2001) 361–366. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00141-1](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00141-1).
- 28 [51] F.D.G. Muranli, U. Güner, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in  
29 erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid  
30 insecticide lambda-cyhalothrin, Mutat. Res-Gen. Tox. En. 726 (2011) 104-108.  
31 <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.004>.

- 1 [52] V.D. Dang, K.J. Kroll, S.D. Supowit, R.U. Halden, N.D. Denslow, Tissue  
2 distribution of organochlorine pesticides in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)  
3 from laboratory exposure and a contaminated lake. *Environ. Pollut.* 216 (2016) 877-  
4 883. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.061>.
- 5 [53] A. Gupta, A.K. Agarwal, G.S. Shukla, Effect of quinalphos and cypermethrin  
6 exposure on developing blood–brain barrier: role of nitric oxide, *Environ. Toxicol.*  
7 *Phar.* 8 (2000) 73-78. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(99\)00034-4](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(99)00034-4).
- 8 [54] R.B. Walter, H.M. Sung, R.D. Obermoeller, D.L. Mitchell, G.W. Intano, C.A.  
9 Walter, Relative base excision repair in *Xiphophorus* fish tissue extracts, *Mar.*  
10 *Biotechnol.* 3 (2001) S50-S60. <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0027-0>.
- 11 [55] D.R. Livingstone, Contaminant-stimulated reactive oxygen species production  
12 and oxidative damage in aquatic organisms, *Mar. Pollut. Bull.* 42 (2001) 656-666.  
13 [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1).
- 14 [56] A. Valavanidis, T. Vlahogianni, M. Dassenakis, M. Scoullou, Molecular  
15 biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental  
16 pollutants, *Ecotox. Environ. Safe.* 64 (2006) 178-89.  
17 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>.
- 18 [57] C.M. Wong, L. Marcocci, L. Liu, Y.J. Suzuki, Cell signaling by protein  
19 carbonylation and decarbonylation, *Antioxid. Redox Sign.* 12 (2010) 393-404.  
20 <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2805>.
- 21 [58] G. Colombo, M. Clerici, M.E. Garavaglia, D. Giustarini, R. Rossi, A. Milzani, I.  
22 Dalle-Donne, A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological  
23 samples, *J. Chromatogr. B.* 1019 (2016) 178-190.  
24 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.052>.
- 25 [59] R.A. Ansari, M. Kaur, F. Ahmad, S. Rahman, H. Rashid, F. Islam, S. Raisuddin,  
26 Genotoxic and oxidative stress-inducing effects of deltamethrin in the erythrocytes of  
27 a freshwater biomarker fish species, *Channa punctata* Bloch, *Environ. Toxicol.* 24  
28 (2009) 429-436. <https://doi.org/10.1002/tox.20445>.
- 29 [60] R.A. Ansari, S. Rahman, M. Kaur, S. Anjum, S. Raisuddin, In vivo cytogenetic  
30 and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa*  
31 *punctata* Bloch, *Ecotox. Environ. Safe.* 74 (2011) 150-156.  
32 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.036>.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que a exposição à LC e ao IMI quando isolados são capazes de induzir danos no DNA em diferentes órgãos de *Prochilodus lineatus*, com uma predominância de nucleoides danificados de classe 1 e uma menor frequência de nucleoides de classe 2 para os peixes expostos a LC, nas brânquias e no sangue, variando quanto ao tempo de exposição. Além disso, esses inseticidas promoveram alterações na estrutura do núcleo dos eritrócitos, ocasionando as chamadas alterações eritrocíticas nucleares, indicando assim, o potencial genotóxico desses inseticidas para peixes. A LC demonstrou ser o inseticida mais tóxico, mesmo em concentrações menores que o IMI, promovendo danos no DNA em todos os órgãos analisados.

Assim como os peixes expostos aos inseticidas isolados, os peixes expostos à mistura apresentaram danos no DNA em diferentes órgãos e aumento na frequência de alterações eritrocíticas nucleares, indicando ainda, uma provável interação sinérgica nos menores tempos, no sangue em 48 h e no fígado em 48 e 96 h de exposição. Provavelmente o efeito observado na mistura se deve principalmente à presença da LC devido a sua maior toxicidade observada em nosso estudo. Além disso, a mistura promoveu aumento da PCO e LPO em brânquias, após 48 h, e aumento da LPO, após 48 h e da PCO, após 96 h no fígado, quando comparado aos grupos isolados de LC e IMI, reforçando uma provável interação sinérgica desses inseticidas nas brânquias e no fígado, nos tempos mais curtos de exposição.

Notamos que as brânquias foram o tecido mais sensível a ação desses inseticidas, principalmente quando em combinação, podendo estar relacionado ao fato desse órgão estar em contato direto com a via de exposição desses compostos. Em contrapartida, o cérebro demonstrou ser o órgão menos sensível a ação da LC e do IMI, provavelmente devido a presença da barreira hematoencefálica e de sua maior capacidade de reparo, comparada aos demais órgãos analisados.

Esses efeitos sinérgicos observados na mistura mostraram-se potencialmente mais tóxicos em tempos mais curtos de exposição (48 e 96 h), causando tanto danos ao DNA como danos oxidativos em proteínas e lipídios. Dado o aumento constante no uso e venda desses produtos, é provável que suas concentrações nas águas superficiais e nos sedimentos também aumentem, tornando-se

particularmente prejudiciais aos peixes, vulneráveis aos efeitos da exposição ao LC e ao IMI, tanto isolados como principalmente em mistura.