



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TIAGO TOMIAMA ALVIM

**EFEITOS DE INSETICIDAS FORMULADOS À BASE DE  $\lambda$ -  
cialotrina E imidacloprido, ISOLADOS E EM MISTURA, NAS  
FASES EMBRIOLARVAL E ADULTA DE *Danio rerio***

---

Londrina  
2023



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



Programa de  
Pós-graduação em  
Genética e Biologia Molecular



**IDR-Paraná**  
Instituto de Desenvolvimento  
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



TIAGO TOMIAMA ALVIM

**EFEITOS DE INSETICIDAS FORMULADOS À BASE DE  $\lambda$ -  
cialotrina E imidacloprido, ISOLADOS E EM MISTURA, NAS  
FASES EMBRIOLARVAL E ADULTA DE *Danio rerio***

TIAGO TOMIAMA ALVIM

**EFEITOS DE INSETICIDAS FORMULADOS À BASE DE  $\lambda$ -  
cialotrina E imidacloprido, ISOLADOS E EM MISTURA, NAS  
FASES EMBRIOLARVAL E ADULTA DE *Danio rerio***

Trabalho de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez.

Londrina  
2023

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

A475e Alvim, Tiago Tomiama .  
Efeitos de inseticidas formulados á base de  $\lambda$ -cialotrina e imidacloprido, isolados e em mistura, nas fases embriolarval e adulta de *Danio rerio* ! Tiago Tomiama Alvim. - Londrina, 2023.  
118 f. • il.

Orientador• Claudia Bueno dos Reis Martinez.  
Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2023.  
Inclui bibliografia

1. Fase embriolarval e adulta de *Danio rerio* - Tese. 2. Biomarcadores genotóxicos, bioquímicos e de desenvolvimento - Tese. 3. Inseticidas isolados e em mistura - Tese. 4. Ecotoxicologia aquática - Tese. 1. Martinez, Claudia Bueno dos Reis. 11. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Ili. Título.

CDU 575.1

TIAGO TOMIAMA ALVIM

**EFEITOS DE INSETICIDAS FORMULADOS À BASE DE  $\lambda$ -  
cialotrina E imidacloprido, ISOLADOS E EM MISTURA, NAS  
FASES EMBRIOLARVAL E ADULTA DE *Danio rerio***

Trabalho de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Fernandes de Oliveira  
Instituto Federal do Paraná - IFPR

---

Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha  
Universidade Federal de Goiás - UFG

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline Santos  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---


Prof. Dr. Paulo Cesar Meletti  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2023.

“Dedico esta tese à minha  
querida batchan (*In  
memoriam*), cuja presença foi  
essencial na minha vida.”

## AGRADECIMENTOS

Nesses anos de doutorado, de muito estudo, esforço e empenho no meio de uma pandemia, gostaria de agradecer algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização de mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Satsuki Aparecida Tomiama Alvim e Israel Pereira Alvim e toda minha família por sempre me apoiarem em minhas decisões e acreditarem que eu consigo alcançar os meus objetivos e superá-los. Sou e sempre serei eternamente grato por tudo que vocês fizeram e fazem por mim. Em especial, quero agradecer a minha batchan Kimio Tomiama, tudo ficou diferente com a sua partida, mas a gente tenta não ficar só triste ao lembrar que vivemos tudo o que podíamos ao seu lado . Amo vocês.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e todos seus professores pela dedicação ao ensino. À CAPES pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

À Profa. Dra. Claudia Buenos dos Reis Martinez. Você é, sem dúvida nenhuma, minha maior inspiração nos últimos anos. Agradeço imensamente pela confiança e por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço por toda a paciência, conselhos e ensinamentos dentro e fora do laboratório. Obrigado por ter me acolhido e ter sido minha mãe científica durante essa jornada. Saiba que serei eternamente grato a você e seus ensinamentos eu levarei comigo para sempre. Muito obrigado pela excelente orientação ao longo dos anos.

Aos membros titulares da banca examinadora da defesa do meu doutorado, Dra Caroline Santos, Profa. Dra. Luciana Fernandes de Oliveira, Prof. Dr. Paulo César Meletti e Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha, pela disponibilidade em colaborar com o nosso trabalho. Aos membros suplentes da banca examinadora da defesa do meu doutorado, Profa. Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha e Profa. Dra. Marta Margarete Cestari, pela disponibilidade em colaborar com o nosso trabalho, caso algum membro titular não possa comparecer.

À Profa. Dra Silvia Sofia e ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani pela disponibilização dos equipamentos laboratoriais para as análises de síntese do cDNA e expressão gênica. Agradeço também ao Luan Vitor e a Thais Kotelok que me

ensinaram e me ajudaram com os equipamentos. À Profa. Dra. Daniele Sartori pela ajuda com os meus primers da qPCR. Sua ajuda foi essencial para a realização dessa análise.

Ao Prof. Dr. Paulo César Meletti pela disponibilização do seu laboratório e dos seus equipamentos para a realização dos experimentos da fase embrionária dos *D. rerio*. Agradeço também por todo o conhecimento sobre as técnicas necessárias para a realização desses experimentos.

A todos do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) da velha e nova geração: Angeliks, Carlão, Carol, Duda, Gabi, Hellen, Jamille, Jéssica, Jheimison, Ju, Julia, Kathya, Laís, Laura Fernanda, Laurinha Lui, Lu, Mari Lauer, Milena, Mi, Nicholas, Paulo, Thais, Vanessa e William, que contribuíram em peso com esse trabalho, além de, me proporcionar muitas risadas e momentos incríveis nesses 6 anos de convivência do mestrado e doutorado. Agradeço ao técnico Wagner Riso que contribuiu massivamente em minhas amostragens e me socorreu diversas vezes quando eu precisava de algum tipo de ajuda. A todos os ICs que me ajudaram ao longo do percurso.

Aos meus amigos de rolê: Ana, Brunim, Clarinha, Felps, Gui, Guilherme, Jaum, Luan, Lud, Millena e Same. Obrigado pelos momentos inesquecíveis de resenha e gargalhadas. Obrigado a Juci, mesmo eu sendo chato às vezes, sempre esteve comigo me dando forças para continuar e sempre me ajudando em momentos difíceis.

Aos meus amigos-irmãos: Angélik, Carlão, Carool, Hellenzinha, J, Jess, Julia, Kenny, Moo, Mari, Mateus, Milena e Renan. Obrigado por todo o suporte emocional, sem vocês a vida seria muito mais amarga. Vocês apareceram em minha vida me mostrando que os vínculos podem ser muito fortes, mesmo sem ser de sangue. Tenho gratidão por toda a amizade e companheirismo em todos esses anos. Quero poder viver sempre ao lado de vocês, compartilhando histórias e vivências inesquecíveis. Obrigado por todos os conselhos dados a mim.

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades ao longo do caminho.

“Feliz aquele que transfere o que  
sabe e aprende o que ensina”  
(Cora Coralina)

ALVIM, Tiago Tomiama. **Efeitos de inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina e imidacloprido, isolados e em mistura, nas fases embriolarval e adulta de *Danio rerio***. 2023. 118 f. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor, Londrina.

## RESUMO

Nesta tese foram avaliados os efeitos da exposição aguda aos inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina (LC) e imidacloprido (IMI) em concentrações ambientalmente relevantes, isolados e em mistura (MIX), nas fases embriolarval e adulta de *Danio rerio*, por meio da análise de múltiplos biomarcadores. Na fase embriolarval, LC, IMI e MIX causaram aumento na mortalidade de embriões em 24 hpf (horas pós-fertilização) e diminuição da eclosão de larvas (96 hpf). IMI causou ainda danos ao DNA e diminuição da eclosão (72 hpf). MIX também reduziu a eclosão (72 hpf), além de promover aumento de lipoperoxidação (LPO) e da concentração de Glutathione (possível interação sinérgica). Nos adultos, LC, IMI e MIX levaram ao aumento de danos no DNA em diferentes tecidos e alterações eritrocíticas nucleares. LC ocasionou aumento de lipoperoxidação (LPO) em vários órgãos e da expressão relativa do gene *ogg1* (brânquias). As defesas antioxidantes do cérebro foram expressivas e eficientes em proteger o órgão do estresse oxidativo dos animais expostos ao IMI e MIX. A MIX promoveu ainda LPO (brânquias), aumento da concentração de Glutathione e da atividade da 7-etoxiresorufina o-deetilase (EROD) no fígado (possível interação sinérgica). A PCA demonstrou que os biomarcadores genéticos e de estresse oxidativo foram os que mais contribuíram para explicar a variabilidade dos resultados (principalmente cometa, alterações eritrocíticas e catalase). Estes resultados mostram que os inseticidas testados são prejudiciais para ambas as fases de desenvolvimento de *D. rerio*. O IMI apresentou mais efeitos subletais na fase embriolarval e a LC na fase adulta.

**Palavras-chave:** Piretroides; Neonicotinoides; Genotoxicidade; Estresse oxidativo; Zebrafish.

ALVIM, Tiago Tomiama. **Effects of insecticides formulated based on  $\lambda$ -cyhalothrin and imidacloprid, isolated and mixed, on the embryo-larval and adult stages of *Danio rerio***. 2023. 118 p. Thesis presented to the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, at the State University of Londrina, as a requirement for obtaining the title of Doctor, Londrina.

## ABSTRACT

In this thesis, the effects of acute exposure to insecticides formulated based on  $\lambda$ -cyhalothrin (LC) and imidacloprid (IMI) in environmentally relevant concentrations, isolated and mixed (MIX), in the embryo-larval and adult phases of *Danio rerio*, were evaluated through analysis of multiple biomarkers. In the embryo-larval phase, LC, IMI, and MIX caused an increase in embryo mortality at 24 hpf (post-fertilization hours) and a decrease in larval hatching (96 hpf). IMI also caused DNA damage and reduced hatching (72 hpf). MIX also reduced hatching (72 hpf), in addition to increasing lipoperoxidation (LPO) and Glutathione concentration (possible synergistic interaction). In adults, LC, IMI, and MIX led to increased DNA damage in different tissues and erythrocytic nuclear changes. LC caused an increase in lipid peroxidation (LPO) in several organs and the relative expression of the *ogg1* gene (gills). Brain antioxidant defenses were expressive and efficient in protecting the organ from oxidative stress in animals exposed to IMI and MIX. MIX also promoted LPO (gills), increased Glutathione concentration, and 7-ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) activity in the liver (possible synergistic interaction). PCA showed that genetic and oxidative stress biomarkers contributed the most to explaining the variability of results (mainly comet, erythrocytic alterations, and catalase). These results show that the tested insecticides are harmful to both stages of development of *D. rerio*. IMI showed more sublethal effects in the embryo-larval phase and LC in the adult phase.

**Key-words:** Pyrethroids; Neonicotinoids; Genotoxicity; Oxidative stress; Zebrafish.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Consumo de agrotóxicos e afins no Brasil (2008-2021).....   | 22 |
| <b>Figura 2</b> – Vias de dissipação de agrotóxicos em águas superficiais .....   | 22 |
| <b>Figura 3</b> – Estrutura química dos dois isômeros da $\lambda$ -cialotrina.....   | 24 |
| <b>Figura 4</b> – Estrutura química do imidacloprido.....   | 26 |
| <b>Figura 5</b> – Esquema simplificado que ilustra os potenciais impactos da exposição a contaminantes em níveis sucessivos de organização biológica..... | 29 |
| <b>Figura 6</b> – Principais efeitos dos contaminantes no material genético .....   | 30 |
| <b>Figura 7</b> – Classes de danos no DNA.....  | 31 |
| <b>Figura 8</b> – Representação das AENs mais comuns encontradas em peixes .....  | 32 |
| <b>Figura 9</b> – Esquema representativo das AENs em <i>D. rerio</i> .....  | 33 |
| <b>Figura 10</b> – Esquema representativo do processo de reparo por excisão de base (BER).....  | 35 |
| <b>Figura 11</b> – Os princípios de biotransformação de contaminantes orgânicos.....  | 36 |
| <b>Figura 12</b> – Principais efeitos do estresse oxidativo .....   | 38 |
| <b>Figura 13</b> – Possíveis influências de contaminantes na sinapse .....  | 39 |
| <b>Figura 14</b> – Distribuição natural do <i>D. rerio</i> .....  | 40 |
| <b>Figura 15</b> – Desenho representativo do <i>D. rerio</i> adulto .....   | 40 |
| <b>Figura 16</b> – O uso do <i>D. rerio</i> em várias áreas da pesquisa científica.....   | 41 |
| <b>Figura 17</b> – Estágios iniciais de desenvolvimento do <i>D. rerio</i> .....  | 42 |

---

### ARTIGO I

**Figura 1** – Taxa de mortalidade (A); taxa de eclosão cumulativa (B) e; frequência cardíaca (C) na fase embriolarval de *Danio rerio* expostos a  $\lambda$ -cialotrina (LC: 0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI: 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 hpf. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 8). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo de exposição. Asteriscos (\*) indicam diferença significativa entre os tempos para um mesmo grupo experimental. Letras maiúsculas

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
|                 | diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de exposição ( $p < 0,05$ ).....  | 67 |
| <b>Figura 2</b> | – Escore de danos no DNA em larvas de <i>Danio rerio</i> expostos a $\lambda$ - cialotrina (LC: $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 hpf. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP ( $n = 8$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....   | 68 |
| <b>Figura 3</b> | – Lipoperoxidação (LPO) em larvas de <i>Danio rerio</i> expostos a $\lambda$ - cialotrina (LC: $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 hpf. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP ( $n = 8$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).....  | 68 |
| <b>Figura 4</b> | – Concentração de glutathiona – GSH (A); atividade das defesas antioxidantes: superóxido dismutase – SOD (B), catalase – CAT (C) e glutathiona peroxidase – GPx (D) em larvas de <i>Danio rerio</i> expostos a $\lambda$ -cialotrina (LC: $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 hpf. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP ( $n = 8$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ )..... | 69 |
| <b>Figura 5</b> | – Atividade das enzimas glutathiona s-transferase – GST (A) e da acetilcolinesterase – AChE (B) em larvas de <i>Danio rerio</i> expostos a $\lambda$ -cialotrina (LC: $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 hpf. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP ( $n = 8$ ).....   | 70 |

---

## ARTIGO II

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>Figura 1</b> | – Escore de danos no DNA (A) no corpo inteiro, brânquias, sangue, fígado, cérebro; e expressão relativa do gene <i>ogg1</i> (B) nas brânquias, fígado e cérebro, em <i>Danio rerio</i> expostos a $\lambda$ - cialotrina (LC: $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 h. As barras representam as |
|-----------------|---|

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
|                   | médias e as linhas verticais o EP (n = 6). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05). .....   | 94 |
| <b>Figura 2 –</b> | Frequência (%) de alterações eritrocíticas nucleares totais, núcleo em forma de rim, segmentado e lobulado em <i>Danio rerio</i> expostos a λ-cialotrina (LC: 0,15 µg L <sup>-1</sup> ) e imidacloprido (IMI: 100 µg L <sup>-1</sup> ), isolados e em mistura (MIX), por 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 6). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05). 95  |    |
| <b>Figura 3 –</b> | Lipoperoxidação (A) e carbonilação de proteínas (B) no corpo inteiro, brânquias, fígado e cérebro de <i>Danio rerio</i> expostos a λ-cialotrina (LC: 0,15 µg L <sup>-1</sup> ) e imidacloprido (IMI: 100 µg L <sup>-1</sup> ), isolados e em mistura (MIX), por 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 6). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05). .....  | 96 |
| <b>Figura 4 –</b> | Concentração de glutathiona – GSH (A); atividade das defesas antioxidantes: superóxido dismutase – SOD (B), catalase – CAT (C) e glutathiona peroxidase – GPx (D) no corpo inteiro, brânquias, fígado e cérebro de <i>Danio rerio</i> expostos a λ-cialotrina (LC: 0,15 µg L <sup>-1</sup> ) e imidacloprido (IMI: 100 µg L <sup>-1</sup> ), isolados e em mistura (MIX), por 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 6). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05). ..... | 98 |
| <b>Figura 5 –</b> | Atividade das enzimas 7-etoxiresorufina o-deetilase – EROD (A) e glutathiona s transferase – GST (B) no corpo inteiro, brânquias, fígado e cérebro de <i>Danio rerio</i> expostos a λ-cialotrina (LC: 0,15 µg L <sup>-1</sup> ) e imidacloprido (IMI: 100 µg L <sup>-1</sup> ), isolados e em mistura (MIX), por 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 6). .....  | 99 |
| <b>Figura 6 –</b> | Atividade da enzima acetilcolinesterase – AChE no corpo inteiro e cérebro de <i>Danio rerio</i> expostos a λ-cialotrina (LC:   |    |

0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI: 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 6). ..... 100

**Figura 7 –** Análise de componentes principais (PCA) dos biomarcadores medidos no *Danio rerio* expostos a  $\lambda$ -cialotrina (LC: 0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI: 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96h. Os vetores representam os biomarcadores analisados que apresentaram diferenças significativas em cada tecido. Eles são apresentados pelas abreviações dos biomarcadores + abreviações dos tecidos. Biomarcadores: COM (cometa), AENs (alterações eritrocíticas nucleares totais), NR (núcleo em forma de rim), LPO (lipoperoxidação), GSH (conteúdo de glutathione), SOD (atividade da superóxido dismutase), CAT (atividade da catalase), GPX (atividade da glutathione peroxidase), EROD (7-etoxiresorufina o-deetilase). Tecidos: ci (corpo inteiro), br (brânquias), sng (sangue), fig (fígado) e cer (cérebro). As diferentes cores dos vetores estão relacionadas à contribuição de cada variável (biomarcador) para toda a variabilidade dos dados (contrib), no qual, um vetor vermelho é mais influente e um azul é menos influente ..... 102

## LISTA DE QUADROS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Quadro 1** - Concentrações do inseticida  $\lambda$ -cialotrina no sedimento e em águas superficiais em diferentes locais ..... 24
- Quadro 2** - Concentrações do inseticida imidacloprido no sedimento e em águas superficiais em diferentes locais..... 27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                |                                    |
|----------------|------------------------------------|
| <b>-SH</b>     | Grupamentos sulfidríla             |
| <b>&gt;</b>    | Maior que                          |
| <b>°C</b>      | Graus Celsius                      |
| <b>µg</b>      | Micrograma                         |
| <b>µL</b>      | Microlitro                         |
| <b>AChE</b>    | Acetilcolinesterase                |
| <b>AENs</b>    | Alterações eritrocíticas nucleares |
| <b>BER</b>     | Reparo por excisão de base         |
| <b>BHT</b>     | Butilhidroxitolueno                |
| <b>BSA</b>     | Albumina de soro bovino            |
| <b>CA</b>      | Adição de concentração             |
| <b>CAT</b>     | Catalase                           |
| <b>CB</b>      | Células binucleadas                |
| <b>CDNB</b>    | 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno         |
| <b>CEUA</b>    | Comitê de Ética no Uso de Animais  |
| <b>CL 50</b>   | Concentração letal média           |
| <b>cm</b>      | Centímetro                         |
| <b>CTR</b>     | Controle                           |
| <b>CYP 450</b> | Família do citocromo P450          |
| <b>DDT</b>     | Dicloro-difenil-tricloroetano      |
| <b>DMSO</b>    | Dimetilsulfóxido                   |
| <b>DNPH</b>    | 2,4-dinitrofenilhidrazina          |
| <b>EDTA</b>    | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| <b>EP</b>      | Erro padrão                        |
| <b>ERO</b>     | Espécies reativas de oxigênio      |
| <b>EROD</b>    | 7-etoxiresorufina o-deetilase      |
| <b>ex</b>      | Exemplo                            |
| <b>FET</b>     | Fish Embryo Acute Toxicity         |
| <b>Fig</b>     | Figura                             |
| <b>g</b>       | Grama ou G-Force                   |
| <b>GSH</b>     | Glutathiona                        |
| <b>GPx</b>     | Glutathiona peroxidase             |

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <b>GR</b>                            | Glutaciona redutase                       |
| <b>GST</b>                           | Glutaciona S-transferase                  |
| <b>h</b>                             | Hora                                      |
| <b>hpf</b>                           | Horas pós-fertilização                    |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>    | Peróxido de hidrogênio                    |
| <b>HCl</b>                           | Ácido clorídrico                          |
| <b>IA</b>                            | Ação independente                         |
| <b>i.a</b>                           | Ingrediente ativo                         |
| <b>IBAMA</b>                         | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente     |
| <b>IMI</b>                           | Imidacloprid                              |
| <b>KCl</b>                           | Cloreto de potássio                       |
| <b>L</b>                             | Litro                                     |
| <b>LC</b>                            | λ-cialotrina                              |
| <b>LPO</b>                           | Lipoperoxidação                           |
| <b>M</b>                             | Molar                                     |
| <b>mA</b>                            | Miliampère                                |
| <b>MDA</b>                           | Malondialdeído                            |
| <b>mg</b>                            | Miligrama                                 |
| <b>mL</b>                            | Mililitro                                 |
| <b>mm</b>                            | Milímetro                                 |
| <b>mM</b>                            | Milimolar                                 |
| <b>MN</b>                            | Micronúcleo                               |
| <b>mS</b>                            | milliSiemens                              |
| <b>nº</b>                            | Número                                    |
| <b>nAChR</b>                         | Receptores nicotínicos de acetilcolina    |
| <b>NaCl</b>                          | Cloreto de sódio                          |
| <b>NADPH</b>                         | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | Hidrogenofosfato dissódico                |
| <b>NaH<sub>2</sub>PO</b>             | Fosfato de sódio monobásico               |
| <b>NaN<sub>3</sub></b>               | Azida sódica                              |
| <b>NaOH</b>                          | Hidróxido de sódio                        |
| <b>neonics</b>                       | Neonicotinoídes                           |
| <b>ng</b>                            | Nanograma                                 |
| <b>NL</b>                            | Núcleo lobulado                           |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>nm</b>                        | Nanômetros  |
| <b>NR</b>                        | Núcleo em forma de rim                                |
| <b>NS</b>                        | Núcleo segmentado                                     |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> | Radical superóxido                                    |
| <b>OECD</b>                      | Organisation for Economic Cooperation and Development |
| <b>OD</b>                        | Oxigênio dissolvido                                   |
| <b>OH<sup>-</sup></b>            | Radical hidroxil                                      |
| <b>PCA</b>                       | Análise de componentes principais                     |
| <b>S.A</b>                       | Sociedade Anônima                                     |
| <b>SBF</b>                       | Soro bovino fetal                                     |
| <b>SOD</b>                       | Superóxido-dismutase                                  |
| <b>T</b>                         | Temperatura   |
| <b>TBARS</b>                     | Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico       |
| <b>TBA</b>                       | Ácido tiobarbitúrico                                  |
| <b>TCA</b>                       | Ácido tricloroacético                                 |
| <b>TNB</b>                       | tiolato   |
| <b>TRIS</b>                      | Tris(hidroximetil)aminometano                         |
| <b>U</b>                         | Unidade   |
| <b>UFPR</b>                      | Universidade Federal do Paraná                        |
| <b>V</b>                         | Volts   |
| <b>x</b>                         | Vezes   |

## APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese foi organizada para atender às normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo geral desta tese foi avaliar os efeitos de inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina e imidacloprido, isolados e em mistura (MIX), em diferentes fases de desenvolvimento do teleósteo *Danio rerio*. No capítulo I encontram-se a introdução geral, a revisão bibliográfica, objetivos e hipóteses traçados para o projeto da tese. O capítulo II contém o manuscrito “Efeitos de inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina e imidacloprido, isolados e em mistura, na fase embrionária do *Danio rerio*”, a ser submetido ao periódico *Environmental Toxicology and Pharmacology* (ISSN: 1382-6689; Fator de Impacto: 5,785). O capítulo III contém o manuscrito em desenvolvimento: “Efeitos de inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina e imidacloprido, isolados e em mistura, em diferentes tecidos de *Danio rerio*: biomarcadores bioquímicos e genéticos”. Também pretendemos submeter esse manuscrito ao periódico *Environmental Toxicology and Pharmacology* (ISSN: 1382-6689; Fator de Impacto: 5,785). No capítulo IV encontram-se as conclusões finais geradas a partir dos dados coletados.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>CAPÍTULO I</b> .....   | 20 |
| <b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....   | 20 |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 22 |
| 2.1 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR INSETICIDAS .....   | 22 |
| 2.2 INSETICIDAS PIRETROIDES – $\lambda$ -CIALOTRINA (LC) .....  | 24 |
| 2.3 INSETICIDAS NEONICOTINOIDES – IMIDACLOPRIDO (IMI).....  | 26 |
| 2.4 INTERAÇÃO ENTRE CONTAMINANTES .....   | 28 |
| 2.5 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA .....  | 29 |
| 2.5.1 Danos no DNA .....  | 30 |
| 2.5.2 Reparo do Material Genético.....  | 35 |
| 2.5.3 Biomarcadores Bioquímicos .....   | 36 |
| 2.6 <i>DANIO RERIO</i> : UM ÓTIMO MODELO DE VERTEBRADO .....  | 40 |
| <b>3 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS</b> .....   | 44 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....  | 44 |
| 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....  | 44 |
| <b>4 HIPÓTESES</b> .....  | 45 |
| <b>REFERÊNCIAS – CAPÍTULO I</b> .....   | 46 |
| <br>  |    |
| <b>CAPÍTULO II – Efeitos de inseticidas formulados à base de <math>\lambda</math>-cialotrina e imidacloprido, isolados e em mistura, na fase embrionarval do <i>Danio rerio</i></b> ..... | 55 |
| <b>DESTAQUES</b> .....  | 57 |
| <b>RESUMO</b> .....   | 58 |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 59 |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 61 |
| 2.1 Produtos químicos .....   | 61 |
| 2.2 Desenho experimental .....  | 61 |
| 2.3 Teste FET .....   | 63 |
| 2.4 Análise de danos genotóxicos.....   | 63 |
| 2.5 Biomarcadores bioquímicos .....   | 63 |
| 2.6 Análises estatísticas.....  | 65 |
| <b>3 RESULTADOS</b> .....   | 66 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.1      | FET.....                               | 66        |
| 3.2      | Danos no DNA .....                     | 68        |
| 3.3      | Lipoperoxidação.....                   | 68        |
| 3.4      | Defesas antioxidantes .....            | 69        |
| 3.5      | Atividade da GST e AChE .....          | 70        |
| <b>4</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....                 | <b>71</b> |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....                 | <b>75</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS – CAPÍTULO II</b> ..... | <b>76</b> |

**CAPÍTULO III – Efeitos de inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina e imidacloprido, isolados e em mistura, em diferentes tecidos de *Danio rerio*: biomarcadores bioquímicos e genéticos .....**

|          |  |            |
|----------|--|------------|
|          | <b>DESTAQUES</b> .....   | <b>83</b>  |
|          | <b>RESUMO</b> .....  | <b>84</b>  |
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>85</b>  |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                | <b>87</b>  |
| 2.1      | Produtos químicos .....  | 87         |
| 2.2      | Desenho experimental .....                                     | 87         |
| 2.3      | Biomarcador genotóxico.....                                    | 88         |
| 2.4      | Expressão relativa do gene de reparo <i>ogg1</i> .....         | 89         |
| 2.4      | Biomarcadores mutagênicos .....                                | 90         |
| 2.6      | Biomarcadores bioquímicos .....                                | 90         |
| 2.7      | Análises estatísticas.....                                     | 91         |
| <b>3</b> | <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>93</b>  |
| 3.1      | Escore de danos no DNA e expressão gênica de <i>ogg1</i> ..... | 93         |
| 3.2      | Frequência de AENs .....                                       | 95         |
| 3.3      | Danos oxidativos.....  | 96         |
| 3.4      | Defesas antioxidantes .....                                    | 97         |
| 3.5      | Enzimas de biotransformação .....                              | 99         |
| 3.6      | Neurotoxicidade.....   | 100        |
| 3.7      | Análise de componentes principais (PCA).....                   | 101        |
| <b>4</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | <b>103</b> |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | <b>108</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS – CAPÍTULO III</b> .....                        | <b>109</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES GERAIS.....</b>           | <b>114</b> |
| <b>APÊNDICES .....</b>                                | <b>116</b> |
| APÊNDICES A – Imagens da fase embrionária.....        | 116        |
| APÊNDICES B – Classes de danos no DNA.....            | 118        |
| APÊNDICES C – Alterações eritrocíticas nucleares..... | 118        |

## CAPÍTULO I

---

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, o Brasil é considerado o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, respondendo por aproximadamente 20% do consumo mundial total (ALBUQUERQUE et al., 2016; DO AMARAL et al., 2018). Em 2021, o consumo de agrotóxicos no país ultrapassou mais de 720 mil toneladas de ingredientes ativos. Nesse cenário, destacam-se os inseticidas, que correspondem a 13% do mercado brasileiro (IBAMA, 2022). Duas classes de inseticidas que vêm sendo muito utilizadas na agricultura, devido à alta eficácia contra um amplo espectro de insetos em uma variedade de culturas, são eles os piretroides e os neonicotinoides (FAI; KINFACK; TOWA, 2017; VIEIRA et al., 2018).

Na agricultura, as misturas de inseticidas são frequentemente utilizadas para melhorar a eficácia e reduzir o custo do tratamento contra insetos-praga, resultando em toxicidade combinada (BACCHETTA et al., 2014). O uso de piretroides em combinação com neonicotinoides é comum na agricultura (REGAN et al., 2017). Entre as misturas utilizadas atualmente em todo o mundo está a combinação do piretroide  $\lambda$ -cialotrina (LC) com o neonicotinoide imidacloprido (IMI) (WANG et al., 2015). A presença de misturas complexas e seus efeitos sobre o ambiente aquático ainda é um desafio em estudos ecotoxicológicos, existindo poucos estudos sobre seus impactos no meio ambiente.

Como resultado do uso extensivo, esses inseticidas são encontrados em diversos compartimentos ambientais e levam à contaminação de recursos hídricos, como consequência principalmente da deriva de pulverização, da lixiviação e do escoamento superficial após aplicação (GIDDINGS et al., 2019; BIJLSMA et al., 2021). A LC já foi encontrada no sedimento (0,42 a 60  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e em águas superficiais (0,02 a 0,046  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) próximo a áreas agrícolas com produção de soja e cacau (HUNT et al., 2016; AFFUM et al., 2018). Nas últimas décadas, foi observado um aumento na utilização desses produtos devido à proibição e à aplicação restrita de agrotóxicos organoclorados e organofosforados (DEANOVIC et al., 2018). Por sua vez, o IMI já foi detectado em concentrações mais elevadas no sedimento (70 a 78  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e em águas superficiais (0,00164 a 320  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de áreas influenciadas por atividades agrícolas (VAN DIJK et al., 2013; SHUKLA et al., 2017). No Brasil, o IMI foi o 12º

ingrediente ativo mais vendido durante o ano de 2021, com mais de 9 mil toneladas vendidas (IBAMA, 2022). Já, a LC foi o 30º, com mais de 3,800 mil toneladas de ingredientes ativos vendidos em 2021 (IBAMA, 2022).

Devido a frequente contaminação dos ambientes aquáticos por esses produtos, o uso de biomarcadores é de extrema importância em estudos ecotoxicológicos para a avaliação dos efeitos resultantes da exposição a inseticidas. A análise de diversos biomarcadores considerando-se diferentes níveis de organização biológica deve ser cada vez mais incorporada em estudos de monitoramento aquático, principalmente em peixes (JANZ, 2013). Os peixes constituem um grupo de grande importância para a avaliação da toxicidade e efeitos de contaminantes, pois estão em contato direto com esses produtos na água. Uma espécie que vem sendo muito utilizada em estudos genéticos é o peixe-zebra (*Danio rerio*), devido ao ciclo reprodutivo curto e à alta capacidade de reprodução (PEI; STRAUSS, 2013). Além de estudos genéticos, esse animal já é um sistema modelo bem estabelecido em diferentes áreas de pesquisa, como biologia do desenvolvimento, ecotoxicologia, nanotecnologia, biologia da evolução, entre outras (CANEDO et al., 2022).

Estudos já mostraram que LC e IMI são tóxicos para o *D. rerio*, em diferentes fases de desenvolvimento, como demonstrado pelos valores de concentração letal média ( $CL_{50-96h}$ ). A  $CL_{50-96h}$  do inseticida LC varia de 110 – 180  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a fase embriolarval (SHEN et al., 2020) e 1,94 a 7,55  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a fase adulta (WANG et al., 2007; HE, et al., 2008). Já para o inseticida IMI, a  $CL_{50-96h}$  é de 121600 – 128900  $\mu\text{g L}^{-1}$  para fase embriolarval (WU et al., 2018) e 241000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a fase adulta (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015). Entretanto, faltam estudos sobre os efeitos subletais desses inseticidas, tanto isolados como em combinação, em peixes neotropicais, visto que um composto pode afetar a desintoxicação metabólica de outro, podendo assim, interferir em sua toxicidade (KHAN et al., 2013; FAI; KINFACK; TOWA, 2017).

Com base no exposto, este trabalho busca compreender os efeitos dos inseticidas LC e IMI e, isolados e em mistura, em concentrações ambientalmente relevantes e abaixo da  $CL_{50}$ , em múltiplos biomarcadores, na fase embriolarval e adulta de *D. rerio*. Deste modo, busca-se propor parâmetros biológicos que possam contribuir para o monitoramento ambiental de áreas contaminadas por inseticidas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

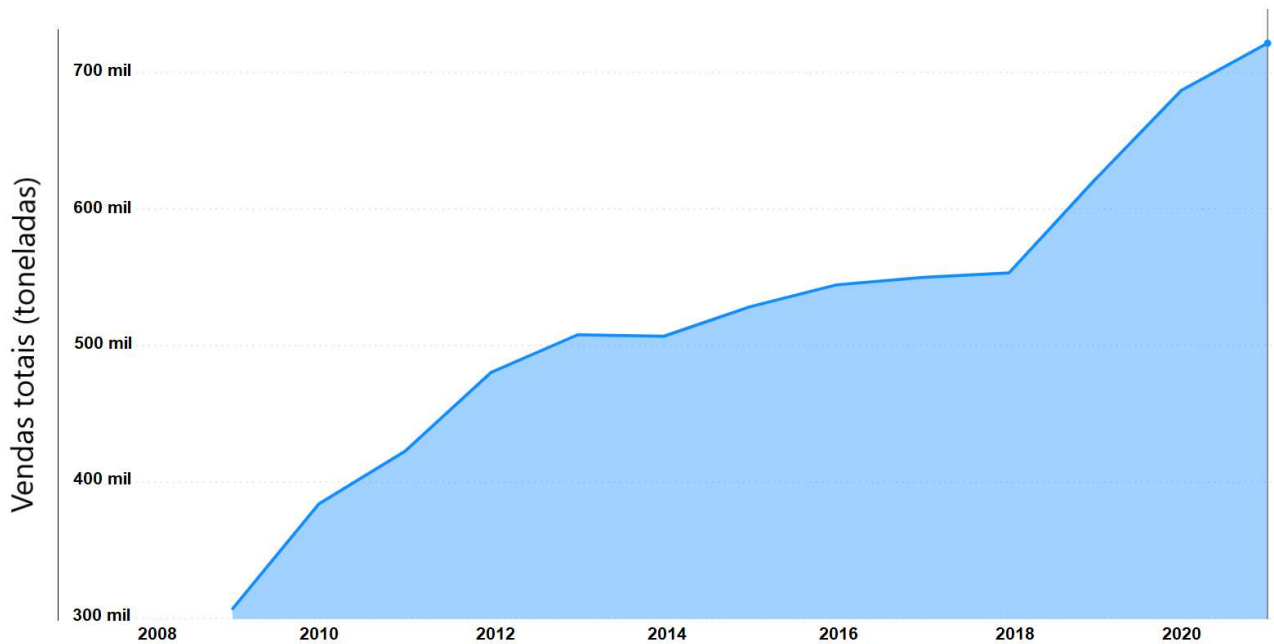
### 2.1 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR INSETICIDAS

A agricultura atual do Brasil baseia-se no conceito de produtividade máxima, com a utilização intensiva da terra e na aplicação constante de agrotóxicos. Isso representa uma ameaça direta aos organismos aquáticos, visto que esses produtos serão inevitavelmente levados para corpos de água, no qual podem se acumular (DO AMARAL et al., 2018). 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).

Nos últimos anos, o mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190%, superando os Estados Unidos. Atualmente, o Brasil é considerado o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, respondendo por aproximadamente 20% do total mundial (ALBUQUERQUE et al., 2016; DO AMARAL et al., 2018). Em 2021, o consumo de agrotóxicos e afins no Brasil ultrapassou mais de 720 mil toneladas no país (IBAMA, 2022) (Fig. 1). Nesse cenário, destacam-se os inseticidas, que correspondem a 13% do mercado brasileiro de agrotóxicos (IBAMA, 2022).

A crescente dependência global do uso de inseticidas tem originado preocupações sobre os impactos na biodiversidade e no funcionamento do ecossistema (VAN DER SLUIJS et al., 2015). A contaminação aquática tornou-se uma grande preocupação ambiental, visto que o ambiente aquático foi convertido em um depósito de vários contaminantes. Devido ao uso extensivo de inseticidas, muitos organismos que habitam o ambiente aquático estão sendo expostos a concentrações diversas desses produtos (GUILHERME et al., 2014; VAN DER SLUIJS et al., 2015). Como resultado, a contaminação por resíduos de agrotóxicos tornou-se uma questão de crescente preocupação devido à alta persistência e toxicidade de alguns produtos em espécies não-alvo (SILVA et al., 2019).

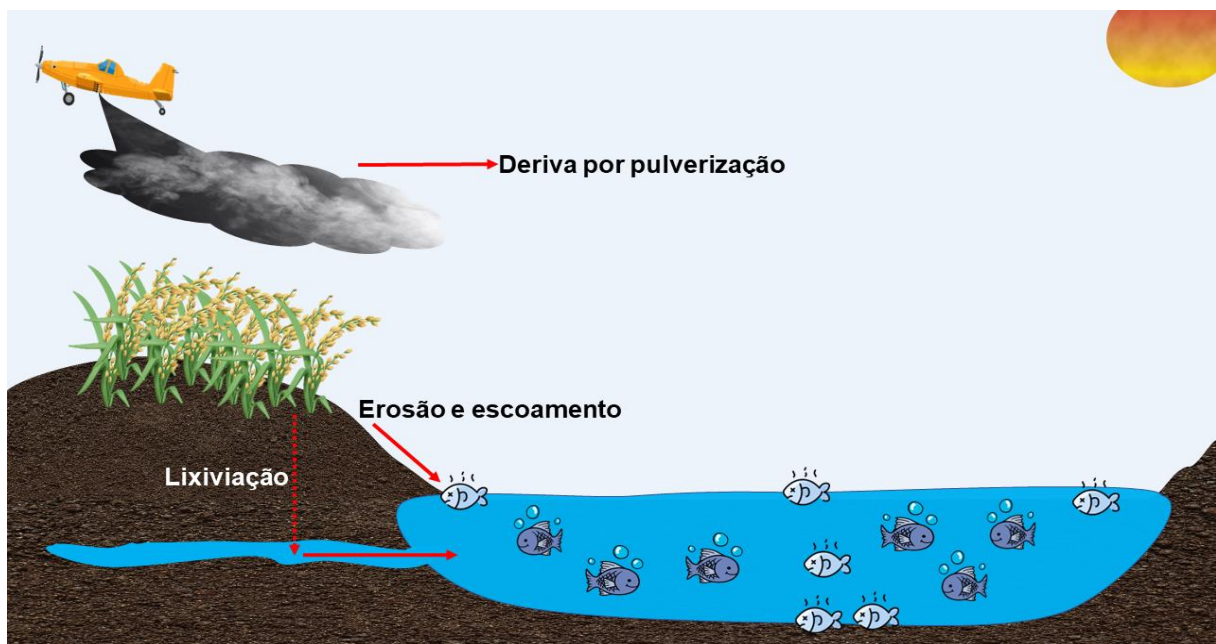
**Figura 1 – Consumo de agrotóxico e afins no Brasil (2008-2021).**



Fonte: IBAMA (2022).

Os inseticidas podem ser transportados para ambientes aquáticos principalmente pela deriva de pulverização transportada por correntes aéreas, pela erosão, escoamento ou lixiviação do solo, que são rotas iminentes de contaminação dos ecossistemas aquáticos. Deste modo, uma vez aplicado, esses produtos podem ser degradados ou dissipados (SOLOMON et al., 2013) (Fig. 2).

**Figura 2 – Vias de dissipação de agrotóxicos em águas superficiais.**



Fonte: modificado e adaptado de SOLOMON et al. (2013).

2.2 INSETICIDAS PIRETROIDES –  $\lambda$ -CIALOTRINA (LC)

Os piretroides são uma classe de inseticidas sintéticos muito utilizada na agricultura há mais de 35 anos, principalmente no controle de pragas (DEANOVIC et al., 2018). Estes produtos são semelhantes as piretrinas, que são ésteres naturais encontrados nas flores da planta de crisântemo, *Tanacetum cinerariifolium* (GIDDINGS et al., 2019; LU et al., 2019).

Nas últimas décadas, foi observado um aumento na utilização desses produtos devido à proibição e à aplicação restrita de agrotóxicos organoclorados e organofosforados (DEANOVIC et al., 2018). Posteriormente, seguiu-se um aumento nas detecções de piretroides em ambientes aquáticos em todo o mundo, em concentrações potencialmente tóxicas para os organismos, dentre eles a  $\lambda$ -cialotrina (AWOYEMI et al., 2019) (Quadro 1).

**Quadro 1** – Concentrações do inseticida  $\lambda$ -cialotrina no sedimento e em águas superficiais em diferentes locais.

| Concentração                       | Local              | País      | Localização          | Referência                     |
|------------------------------------|--------------------|-----------|----------------------|--------------------------------|
| 19,7 – 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$    | Sedimento          | Brasil    | Rio Cuiabá           | Possavatz et al., 2014         |
| 0,035 – 0,046 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Águas superficiais | Grécia    | Lago Vistonis        | Papadakis et al., 2015         |
| 0,42 – 6,09 $\mu\text{g kg}^{-1}$  | Sedimento          | Argentina | Rio Arrecifes        | Hunt et al., 2016              |
| 1,32 $\mu\text{g kg}^{-1}$         | Sedimento          | Brasil    | Rio São Francisco    | Hunt et al., 2016              |
| 1,22 – 16,57 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | Sedimento          | Paraguai  | Rio Pirapó           | Hunt et al., 2016              |
| 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$          | Águas superficiais | Gana      | Rio Ankobra          | Affum et al., 2018             |
| 1,75 – 50, 92 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Águas superficiais | México    | Rio Ayuquila-Armería | Rodríguez-Aguilar et al., 2022 |

Fonte: o próprio autor.

Os piretroides podem entrar no ambiente aquático por meio da deriva de pulverização e escoamento superficial após sua aplicação (GIDDINGS et al., 2019) e, portanto, podem estar presentes em concentrações tóxicas em águas superficiais próximas a áreas agrícolas em todo mundo (DEANOVIC et al., 2018). Por serem neurotóxicos potentes, esses produtos podem desencadear múltiplas vias de toxicidade em organismos não-alvo, como por exemplo, em crustáceos, insetos, peixes, moluscos e plantas aquáticas (AWOYEMI et al., 2019; GIDDINGS et al., 2019).

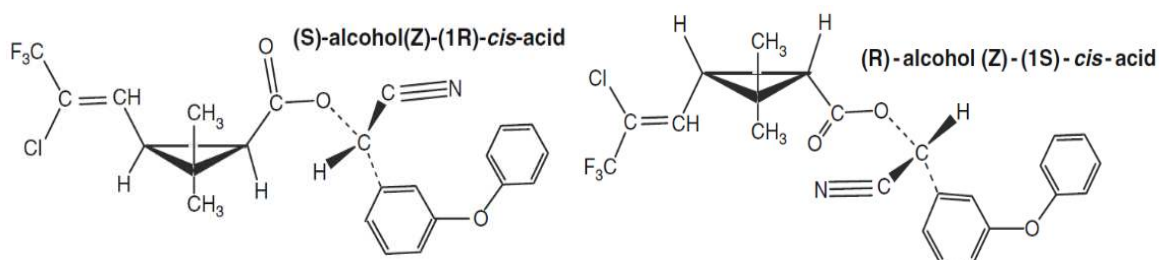
Existem dois grupos de piretroides, denominados Tipo I e Tipo II. Quimicamente os piretroides do Tipo II distinguem-se do Tipo I pela presença de um grupo  $\alpha$ -ciano na sua estrutura (HE et al., 2008). Em comparação com os piretroides

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 piretroides 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; SALATAS; FAIRBROTHER, 2012).

Um dos inseticidas piretroides do Tipo II mais amplamente utilizados é a  $\lambda$ -cialotrina (LC): (S)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil-(1R,3R)-3-[(Z)-2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil]-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato e a (R)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil-(1S,3S)-3-[(Z)-2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil]-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato (Fig. 3), que geralmente é usado em diferentes tipos de culturas para controlar uma ampla gama de insetos praga, tais como, percevejos, lagartas, moscas e pulgões (HE et al., 2008; GUEDEGBA et al., 2019).

Devido à natureza lipofílica dos piretroides, as membranas biológicas e tecidos dos organismos alvos podem facilmente absorvê-los. Diante disso, o inseticida  $\lambda$ -cialotrina 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).

**Figura 3** – Estrutura química dos dois isômeros da  $\lambda$ -cialotrina.



Fonte: HE et al. (2008).

Como a  $\lambda$ -cialotrina é comumente aplicada em campos de arroz para controlar insetos, a possível contaminação de água e sedimentos pode levar à toxicidade em organismos aquáticos. Estudos já mostraram que este inseticida é altamente tóxico para diferentes organismos aquáticos, como demonstrado pelos valores de concentração letal média  $CL_{50-96\text{ h}}$ :  $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$  para a *Daphnia magna*;

0,008  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a carpa *Cyprionodum variegatus*; 0,21  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o “bluegill” *Lepomis macrochirus* e 0,24  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* e 1,94 – 7,55  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o *Danio rerio* adulto (WANG et al., 2007; HE, et al., 2008) e para a fase embrionarval de *D. rerio* varia de 110 – 180  $\mu\text{g L}^{-1}$  (SHEN et al., 2020).

### 2.3 INSETICIDAS NEONICOTINOIDES – IMIDACLOPRIDO (IMI)

Os neonicotinoides (abreviados como "neonics") são um grupo de inseticidas derivados da nicotina (YI et al., 2019). Esses inseticidas são utilizados em diversas culturas, pois possuem uma alta eficácia contra um amplo espectro de insetos (BEBANE et al., 2019). A esta classe corresponde pelo menos sete compostos principais com uma participação de mercado de mais de 25% do inseticida global que é utilizado nas culturas (BASS et al., 2015). Além disso, os neonicotinoides são considerados potenciais produtos de substituição para os inseticidas organofosforados e carbamatos, e espera-se que seu uso aumente globalmente (JESCHKE et al., 2011).

Inseticidas neonicotinoides atuam sistemicamente, o que significa que são absorvidos pela planta e transportados para todos os tecidos onde permanecem ativos por muitas semanas ou meses, protegendo todas as partes da cultura, sendo aplicados principalmente nas sementes (BEBANE et al., 2019; GOULSON, 2013). O potencial de lixiviação em águas subterrâneas 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). Alguns estudos já caracterizaram a probabilidade dos neonicotinoides serem encontrados nas camadas dos solos, águas superficiais e subterrâneas como resultado da deriva de pulverização, lixiviação ou escoamento, dentre eles o imidacloprido (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015; TIŠLER et al., 2009) (Quadro 2).

Os neonicotinoides são agonistas nicotínicos que agem interferindo a transmissão neural no sistema nervoso central dos organismos alvos. Eles se ligam aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) no neurônio pós-sináptico, atuando como "falsos neurotransmissores". 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, além de morte em concentrações mais

elevadas (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015; GOULSON, 2013; VAN DER SLUIJS et al., 2015).

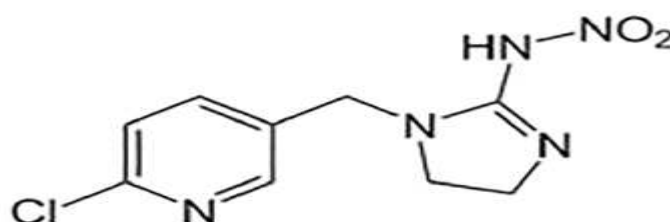
**Quadro 2** – Concentrações do inseticida imidacloprido no sedimento e em águas superficiais em diferentes locais.

| Concentração                      | Local              | País           | Localização               | Referência              |
|-----------------------------------|--------------------|----------------|---------------------------|-------------------------|
| 0,38 – 2,19 µg L <sup>-1</sup>    | Águas superficiais | Brasil         | Microbacia do Arroio Lino | Bortoluzzi et al., 2005 |
| 0,67 – 3,65 µg L <sup>-1</sup>    | Águas superficiais | Estados Unidos | Lino Creek                | Becker et al., 2009     |
| 320 µg L <sup>-1</sup>            | Águas superficiais | Holanda        | Noordwijkerhout           | Van Dijk et al., 2013   |
| 107 – 123 µg L <sup>-1</sup>      | Águas superficiais | Brasil         | Microcábia do Tijunheiro  | Rocha et al., 2015      |
| 70 – 78 µg kg <sup>-1</sup>       | Sedimento          | Brasil         | Microcábia do Tijunheiro  | Rocha et al., 2015      |
| 0,0016 – 0,014 µg L <sup>-1</sup> | Águas superficiais | Espanha        | Rio Ebro                  | Shukla et al., 2017     |
| 0,02 – 0,04 µg L <sup>-1</sup>    | Águas superficiais | Brasil         | Reservatório Passo Real   | Do Amaral et al., 2018  |
| 0,031 µg L <sup>-1</sup>          | Águas superficiais | Brasil         | Rio Dourados e Brilhantes | Sposito et al., 2018    |

Fonte: o próprio autor.

Um dos inseticidas neonicotinoides mais amplamente utilizado e eficaz é o imidacloprido (IMI) (1-(6-cloro-3-piridinilmetil)-Nnitro-2-imidazolidinimina) (FIORENZA et al., 2020) (Fig. 4). O IMI foi um dos primeiros neonicotinoides lançados e se tornou um dos principais produtos utilizados no controle de pragas em campos agrícolas (SHARMA; BASU, 2020). No Brasil, esse inseticida foi o nono ingrediente ativo mais vendido durante o ano de 2020, com aproximadamente 9,4 mil toneladas de compostos vendidos (IBAMA, 2022). O uso desse produto 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 (ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015; TIŠLER et al., 2009).

**Figura 4** – Estrutura química do imidacloprido



Fonte: FIORENZA et al. (2020).

O IMI possui elevada solubilidade em água e seus valores de  $CL_{50}$  variam de 83000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para adultos de *O. mykiss* até 241000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para adultos de *D. rerio* (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU 2015). Já para a fase embriolarval de *D. rerio* este valor varia de 121600 – 128900  $\mu\text{g L}^{-1}$  (WU et al., 2018).

Embora a autorização para 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) de modo a se 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 CONTAMINANTES

As misturas de agrotóxicos são constantemente utilizadas para melhorar a eficácia e reduzir o custo do controle de organismos indesejáveis. Entretanto, essas combinações podem resultar em efeitos interativos a diversos organismos não-alvo que habitam locais próximos a áreas agrícolas (BACCHETTA et al., 2014; METER et al., 2019). 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).

As combinações de compostos podem ocasionar diversos efeitos interativos, tais como: i) efeitos aditivos, que são caracterizados pela soma dos efeitos de cada agente de forma isolada; ii) efeitos sinérgicos, que ocorrem quando os efeitos combinados de dois produtos químicos são maiores do que a soma dos efeitos de cada contaminante isolado; iii) 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 (KLAASSEN; WATKINS, 2012; NIKINMAA, 2014).

A aplicação conjunta de neonicotinoides e piretroides são comuns na agricultura e reprimem os insetos-alvo efetivamente (REGAN et al., 2017; XIA et al., 2016). Alguns agrotóxicos comercializados no Brasil possuem ambos os inseticidas no mesmo produto, como por exemplo, Engeo Pleno (14,1% i.a. tiametoxam + 10,6% i.a.  $\lambda$ -cialotrina), Connect (10% i.a. imidacloprido + 1,25 % i.a. beta-ciflutrina) e Galil SC (25% i.a. imidacloprido + 5% i.a. 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 à sua eficácia, estão os inseticidas  $\lambda$ -cialotrina 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 caracterizassem os riscos proporcionados por estes produtos e seus metabólitos, além de suas misturas. Além disso, não há profissionais suficientes e laboratórios capazes de analisar baixas concentrações de contaminantes na água, solos e sedimentos (FURLEY et al., 2018). Neste contexto, Furley et al. (2018) destacaram ser necessário desenvolver ferramentas e implementar regulamentações que caracterizem os riscos do uso simultâneo de no mínimo 2 ou 3 mais agrotóxicos.

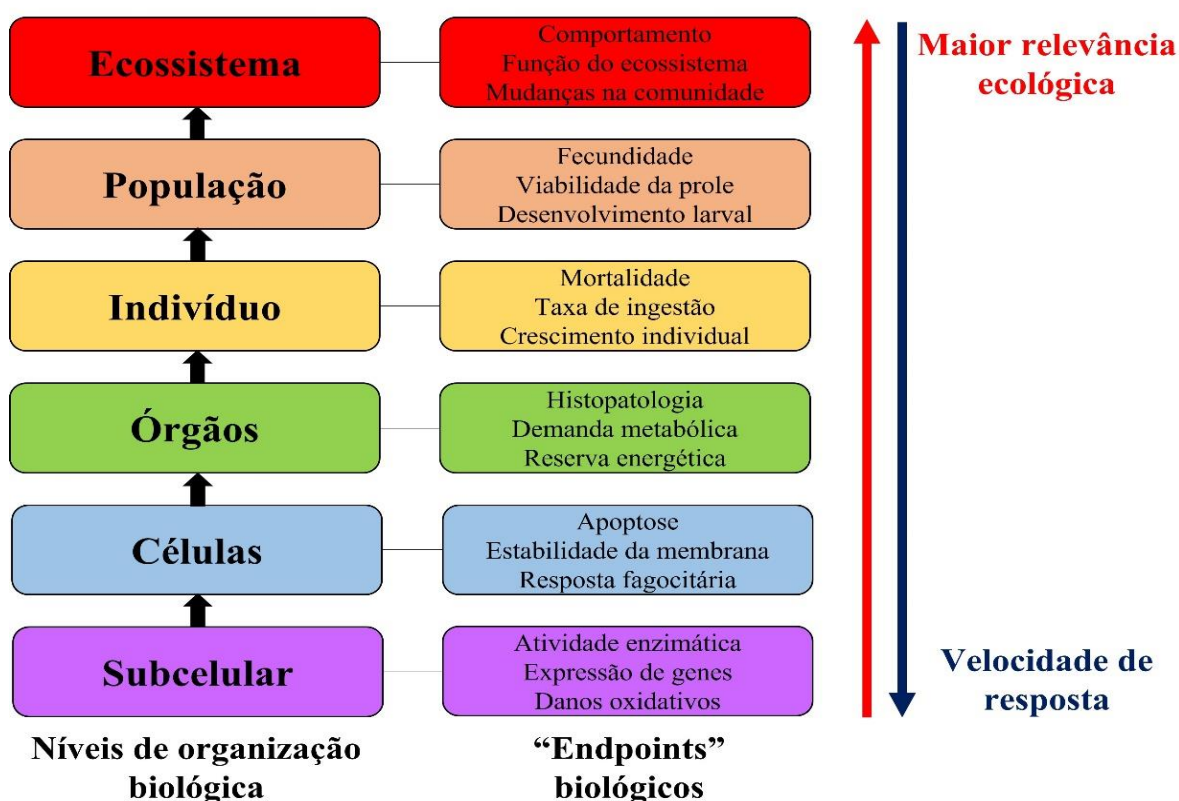
### 2.5 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

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, 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). Os efeitos dos contaminantes para os organismos aquáticos podem ser avaliados em diversos níveis de organização biológica, como evidenciado na Figura 5. 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.

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 compostos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Além disso, o estágio de desenvolvimento de um animal também pode afetar sua tolerância à exposição a agrotóxicos (HANAZATO, 2001).

**Figura 5** – Esquema simplificado que ilustra os potenciais impactos da exposição a contaminantes em níveis sucessivos de organização biológica.



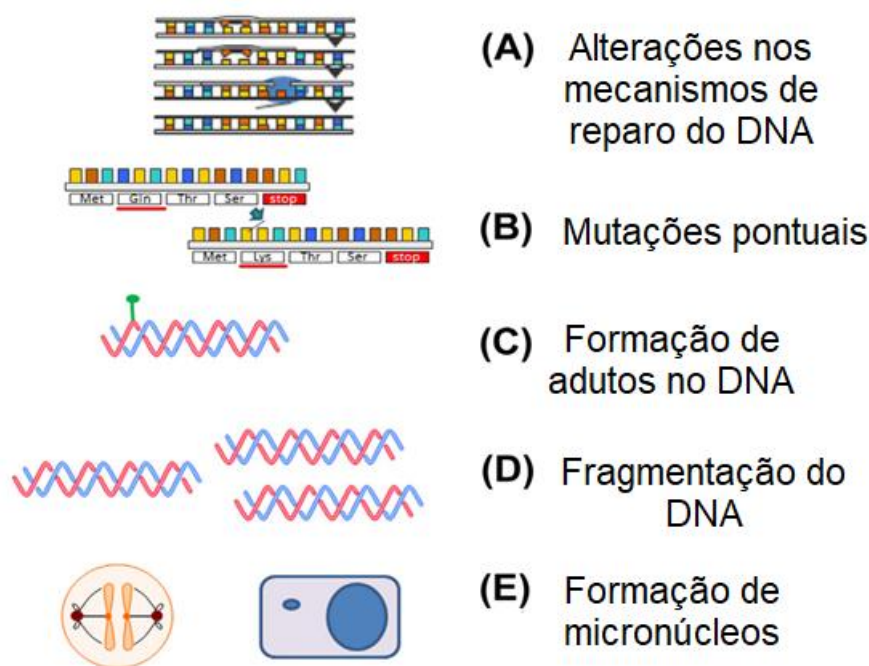
Fonte: Modificado de GALLOWAY; COLE; LEWIS (2017).

### 2.5.1 Danos No DNA

Uma grande preocupação a respeito da contaminação ambiental é o efeito dos contaminantes no material genético. Diante disso, muitos estudos visam avaliar os danos ao DNA para desenvolver biomarcadores ambientais (COSTA et al.,

2018). 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). Os contaminantes podem causar diversos efeitos genotóxicos no material genético, como por exemplo, alterações nos mecanismos de reparo do DNA; mutações de ponto; aumento na formação de adutos de DNA; fragmentação do DNA e até mesmo a formação de micronúcleos (NIKINMAA, 2014) (Fig. 6).

**Figura 6** – Principais efeitos dos contaminantes no material genético.



**Fonte:** adaptado de NIKINMAA (2014).

Além disso, fatores de estresse ambiental, como a exposição a contaminantes ou fatores abióticos também podem ter efeitos epigenéticos (principalmente metilação do DNA), conforme descrito para muitas espécies ecologicamente relevantes (algas, plantas, vários invertebrados e peixes) (VANDEGEHUCHTE; JANSSEN, 2014). Um exemplo é a influência da temperatura ambiental afetando a epigenética em um estudo com o peixe *Dicentrarchus labrax*

(popularmente chamado de robalo) (NAVARRO-MARTÍN et al., 2011). Nesses animais, a temperatura durante o estágio embriolarval pode modificar as proporções sexuais da população (NAVARRO-MARTÍN et al., 2011).

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 alcalino, pois ela permite a visualização eficiente dos danos no DNA em células individuais, podendo ser aplicada tanto em ensaios *in vivo* em diferentes órgãos quanto *in vitro* (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004; CEMELI; BAUMGARTNER; ANDERSON, 2009; ALVIM; MARTINEZ, 2019). Esta técnica tem sido amplamente utilizada para avaliação de possíveis danos causados por contaminantes ambientais. Os danos no DNA podem ser classificados, considerando-se o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem danos aparentes; 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 (ALVIM; MARTINEZ, 2019) (Fig. 7).

**Figura 7** – Classes de danos no DNA



Fonte: o próprio autor.

Outro biomarcador de danos no DNA bastante utilizado em peixes é a frequência de micronúcleos (MN) (Fig. 6 e 8). A avaliação de micronúcleos permite detectar as propriedades mutagênicas de compostos presentes no meio aquático (UDROIU, 2006). Além disso, MN são facilmente visualizados em eritrócitos de peixes e são fortes indicativos para mensuração de aberrações cromossômicas (CAMPANA et al., 2003).

A formação de MN 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 os fragmentos com centrômero são. 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 MN (SCHMID, 1975).

Além da frequência de micronúcleos (MN), a ocorrência de outras alterações eritrocíticas nucleares (AENs) também é considerada como um indicador de danos mutagênicos. Essas alterações foram descritas primeiramente em eritrócitos de peixes por Carrasco; Tilbury; Myers (1990) e foram classificadas em: 1) núcleo segmentado; 2) núcleo lobulado; 3) núcleo entalhado; e posteriormente houve a identificação da presença de células binucleadas. Na figura 8 podemos observar as AENs mais comuns encontradas em peixes.

**Figura 8** – Representação das AENs mais comuns encontradas em peixes.

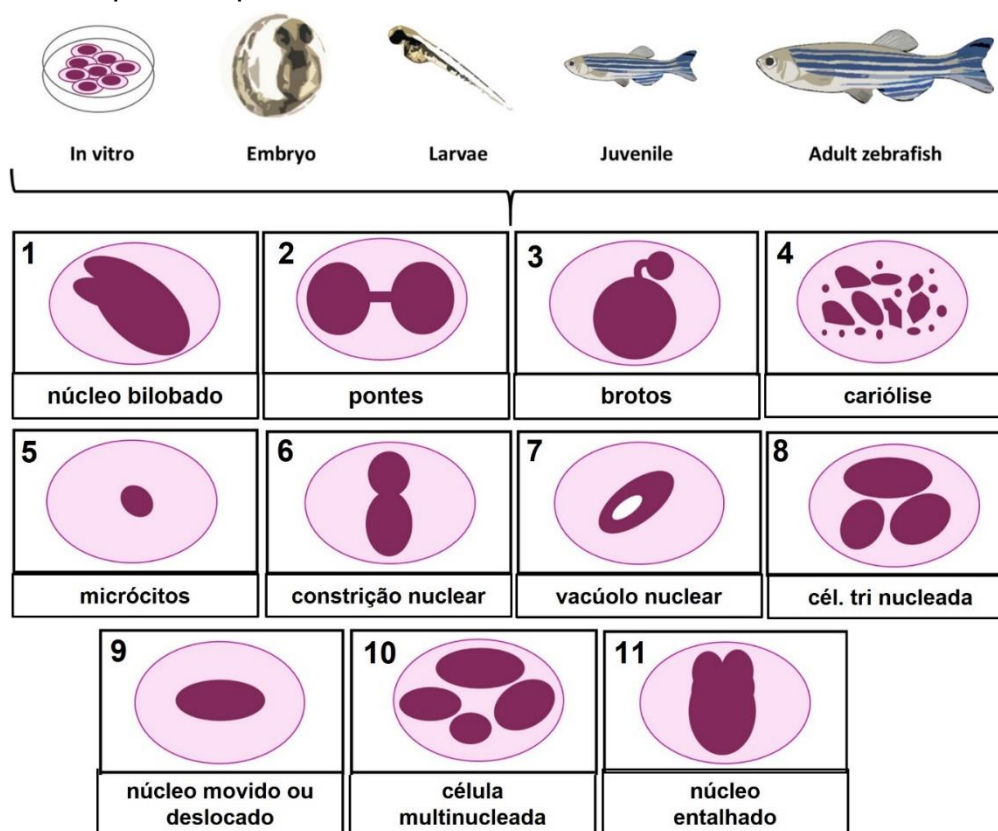


**Fonte:** Adaptado de CARROLA et. al. (2014).

Além destas, no peixe *D. rerio* foram reportados outros tipos de AENs induzidas por contaminantes tradicionais e emergentes, podendo ser visualizadas na cultura celular de hepatócitos, embriões, larvas, juvenis e adultos desse animal (CANEDO et al., 2021). De acordo com Canedo et al. (2021), 62 artigos foram publicados utilizando o *D. rerio* como sistema modelo para a avaliação da frequência de MN e outras alterações eritrocíticas induzidas por diferentes contaminantes.

Essas alterações foram identificadas como: 1) núcleos bilobados; 2) pontes; 3) brotos; 4) cariólise; 5) micrócitos; 6) constrição nuclear; 7) vacúolo nuclear; 8) célula trinucleada; 9) núcleo deslocado; 10) célula multinucleada e 11) núcleo entalhado (Fig. 9).

Figura 9 – Esquema representativo das AENs em *D. rerio*.



Fonte: modificado de CANEDO et al. (2021).

Existem algumas 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 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 MN em pesquisas genotóxicas de rotina (ÇAVAŞ; KÖNEN, 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 Reparo Do Material Genético

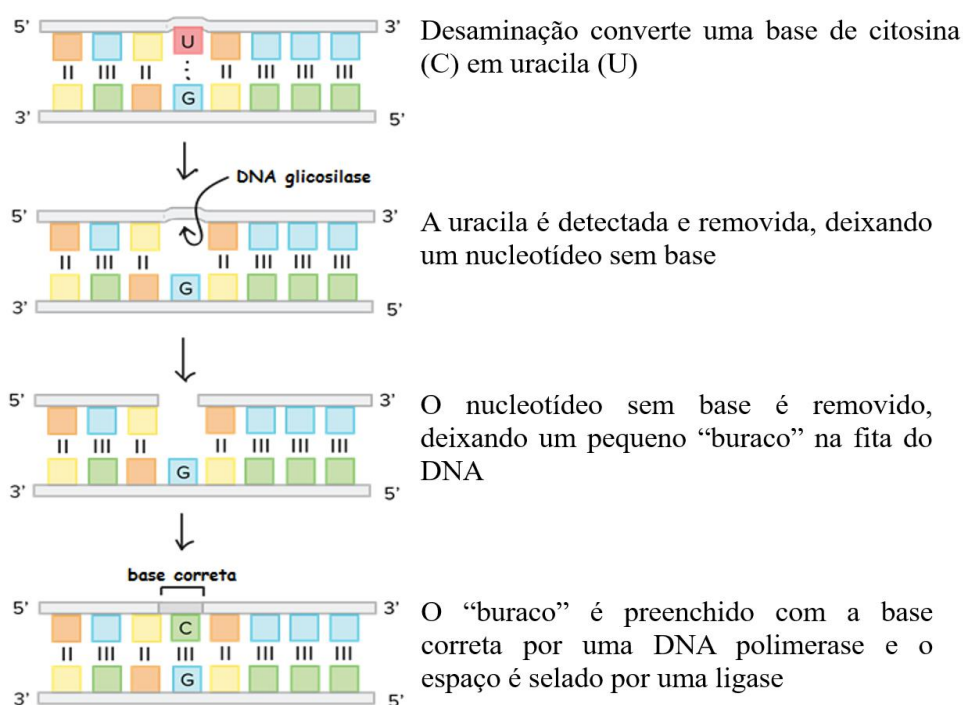
A expressão de genes representa o primeiro nível de integração entre fatores ambientais e o genoma (GALLOWAY; COLE; LEWIS, 2017). Assim, a análise de alterações da expressão gênica é uma ferramenta importante para diagnosticar os principais fatores de estresse em populações e analisar os mecanismos de respostas correspondentes (COSSU-LEGUILLE; VASSEUR, 2013). O método mais dinâmico para avaliação da expressão gênica por meio da quantificação de mRNA é a RT-qPCR (transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa), considerada muito eficaz (VELDHOEN; IKONOMOU; HELBING, 2012). Dentre os genes comumente estudados em peixes estão os relacionados ao reparo do material genético (SHI et al., 2011; LING et al., 2017; ARCANJO et al., 2018).

O reparo do DNA é a principal linha de defesa dos organismos contra substâncias genotóxicas (KIENZLER et al., 2013). Os danos não reparados no material genético ou mecanismos ineficientes de reparo podem prejudicar a capacidade de transmissão de informações genéticas para as próximas gerações ou até mesmo a sobrevivência do organismo (COSTA et al., 2018). Entre os diferentes sistemas de reparo do DNA, o reparo por excisão de bases (BER) se destaca, pois atua principalmente sobre danos como alquilação, oxidação de bases e quebras de fitas simples que podem ser provocados por contaminantes genotóxicos (COSTA et al., 2018). Neste mecanismo, uma base alterada por contaminantes é primeiro retirada e então o nucleotídeo inteiro é substituído. A excisão dessas bases é catalisada por um conjunto de enzimas chamado de DNA glicosilases, no qual cada enzima reconhece e remove um tipo específico de base modificada. Após a base ser removida, uma enzima chamada AP (apurínica ou apirimidínica) endonuclease corta a ligação fosfodiéster e outras enzimas removem o açúcar desoxirribose. Na sequência, a DNA polimerase adiciona o novo nucleotídeo, que é ligado à fita pela DNA ligase, fazendo com que a sequência original seja restaurada (COSTA et al., 2018) (Fig. 10). A guanina é a base mais vulnerável à oxidação devido ao seu baixo

potencial redox. A lesão de base 8-oxoguanina é reparada pela via BER e iniciada pela 8-oxoguanina DNA glicosilase (ogg1), podendo ser avaliada pela expressão do gene *ogg1* (WANG et al., 2018).

Um melhor conhecimento da capacidade de reparo do material genético em peixes pode ajudar a interpretar os dados de genotoxicidade e auxiliar na escolha das espécies-alvo e estágios de desenvolvimento a receberem atenção, tanto para estudos de biomonitoramento ambiental quanto para testes de reparo de DNA (KIENZLER et al., 2013).

**Figura 10** – Esquema representativo do processo de reparo por excisão de base (BER).



Fonte: Adaptado de KHAN ACADEMY (2019).

### 2.5.3 Biomarcadores Bioquímicos

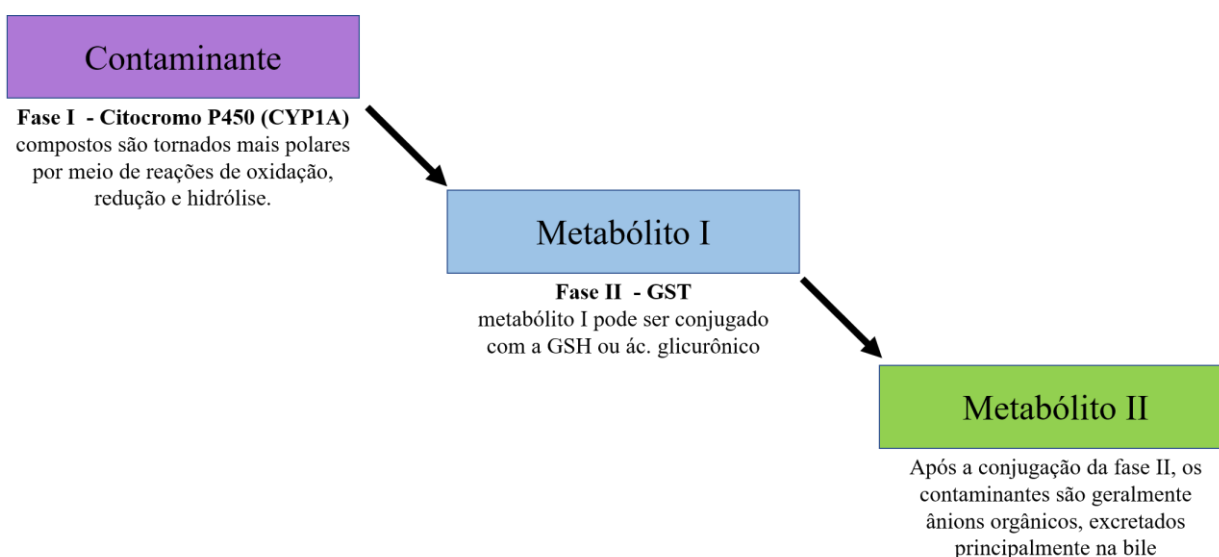
Os biomarcadores bioquímicos apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (SCHLENK, 2008). Os xenobióticos podem ser transformados através de mecanismos celulares em metabólitos menos tóxicos. O fígado ou órgão equivalente, possuem atividade elevada de enzimas de desintoxicação responsáveis pela biotransformação de xenobióticos (NIKINMAA, 2014). A biotransformação de produtos químicos geralmente é um processo enzimático que envolve duas fases, no qual moléculas lipofílicas (ex: contaminantes

orgânicos) não polares são transformadas em compostos polares hidrofílicos excretáveis (Fig. 11) (NIKINMAA, 2014). Entretanto, nem sempre ocorre a diminuição da sua toxicidade, podendo o metabólito ser ainda mais tóxico que o produto original (VAN DER OOST et al., 2003).

Na fase I de biotransformação, os compostos tornam-se mais polares, sendo catalisados pelas enzimas pertencentes à família do citocromo P450 (CYP 450), proteínas localizadas no retículo endoplasmático que estão envolvidas no transporte de elétrons (NIKINMAA, 2014). Exemplos de xenobióticos que são biotransformados nesta fase são alguns agrotóxicos (COSSU-LEGUILLE; VASSEUR, 2013; JANZ, 2013). Em estudos envolvendo peixes, a família de citocromo P450 mais estudada é a CYP1A, sendo a enzima 7-etoxiresorufina o-deetilase (EROD) muito utilizada para mensurar a atividade da CYP1A (KARAMI et al., 2011).

Na fase II ocorre à conjugação dos contaminantes, sejam provenientes da fase I (metabólitos) ou não, com moléculas endógenas presentes nas células (ex: GSH), tornando os produtos mais excretáveis (NIKINMAA, 2014; GLISIC et al., 2015). As Glutathione-S-transferases (GSTs) são uma das principais enzimas que mediam a fase II da biotransformação (GLISIC et al., 2015). Além disso, algumas isoformas das GSTs são componentes integrais da defesa antioxidante. O papel delas GSTs na defesa antioxidante em animais aquáticos pode ser mais importante do que nos terrestres (NIKINMAA, 2014).

**Figura 11** – Os princípios de biotransformação de contaminantes orgânicos.



**Fonte:** modificado de NIKINMAA (2014).

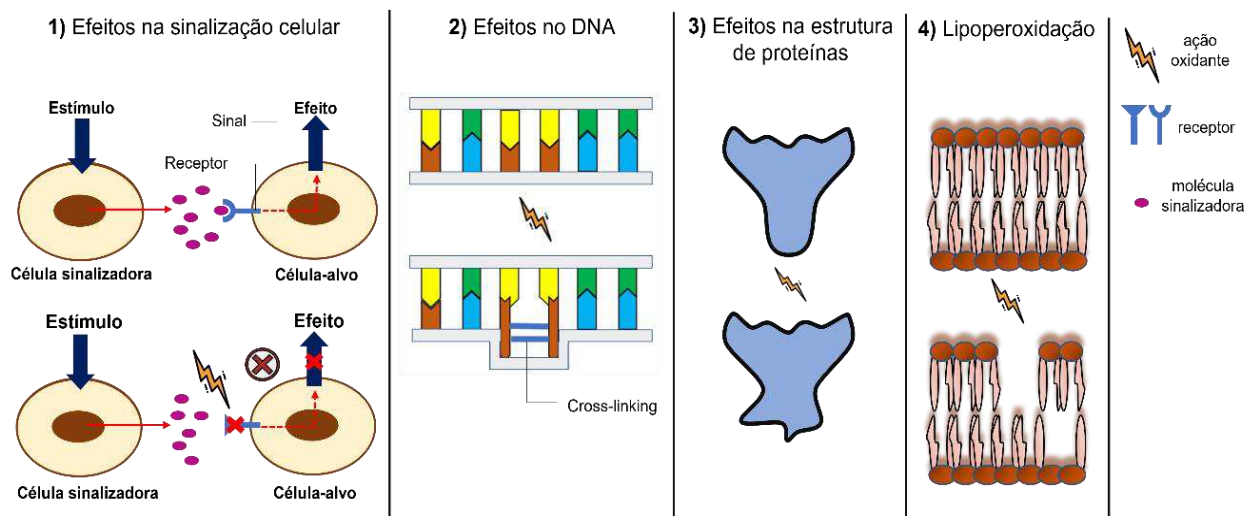
Muitos efeitos bioquímicos têm sido associados com o aumento do fluxo de espécies reativas de oxigênio (ERO), provenientes do processo de biotransformação ou do metabolismo dos organismos. Enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GPx) desempenham papel importante na eliminação de ERO produzidas durante a biotransformação de contaminantes e a indução do sistema SOD / CAT pode ser o primeiro mecanismo de defesa contra ERO (LUSHCHAK, 2016; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

A SOD é a primeira enzima de desintoxicação e o antioxidante mais poderoso da célula. Ela é responsável por dismutar o ânion superóxido ( $^*O_2$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ), e, conseqüentemente, diminuindo a ação oxidativa do ânion inicial no interior da célula (JEEVA et al., 2015; IGHODARO; AKINLOYE, 2018). A CAT é uma enzima antioxidante comum presente em quase todos os tecidos vivos que utilizam oxigênio. Ela é responsável por catalisar a decomposição direta do  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular, principalmente quando a concentração de peróxido é alta (JEEVA et al., 2015; IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Já a GPx é uma enzima que também quebra o peróxido de hidrogênio em água, cuja importância na remoção do peróxido de hidrogênio aumenta com uma diminuição na concentração inicial do peróxido de hidrogênio (JEEVA et al., 2015; IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Além dessas enzimas, a glutathione reduzida (GSH) é frequentemente medida para indicar o estado redox dos organismos. Além de ser importante na regulação redox, a GSH pode ser conjugada aos xenobióticos durante a fase II de biotransformação, nas reações catalisadas pela GST (NIKINMAA, 2014).

O oxigênio é fundamental à vida e ao mesmo tempo pode ser tóxico devido à formação de radicais livres. A produção de ERO é um fenômeno natural, desencadeado por diversos fatores externos. Deste modo, o estresse oxidativo é caracterizado quando ocorre o desequilíbrio entre as defesas antioxidantes das células e a produção de ERO em excesso (BHAGAT; INGOLE; SINGH, 2016).

O estresse oxidativo provocado pelo aumento de ERO pode: a) afetar a sinalização celular; b) causar efeitos no DNA, aumentando a formação de adutos de DNA, que podem exceder a capacidade de reparo celular e resultar no aumento da taxa de mutações; c) afetar a estrutura tridimensional das proteínas, alterando a atividade dessas proteínas; d) influenciar os lipídeos, causando, por exemplo, lipoperoxidação (LPO), ou seja, alterações na permeabilidade das membranas celulares (NIKINMAA, 2014) (Fig. 12).

**Figura 12 – Principais efeitos do estresse oxidativo.**



**Fonte:** modificado de NIKINMAA (2014).

A LPO consiste em uma reação em cadeia, na qual um excesso de ERO pode causar a quebra dos fosfolipídios insaturados 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).

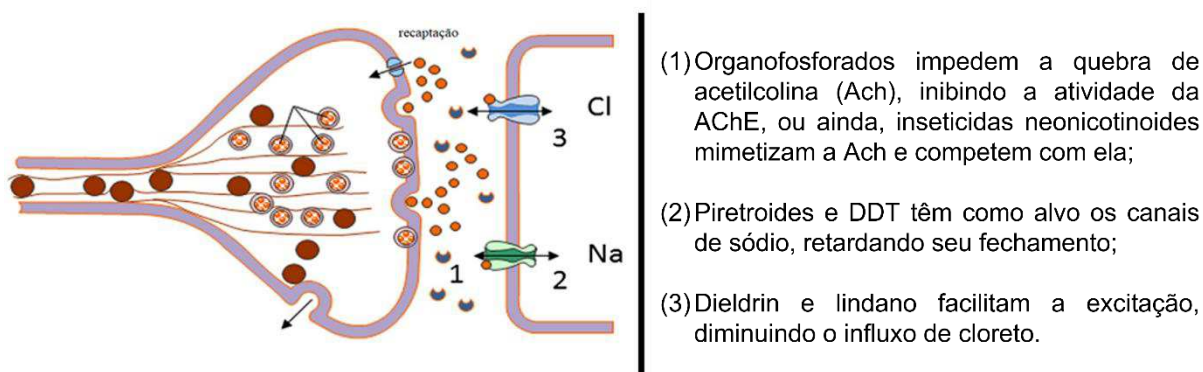
Já a carbonilação de proteínas (PCO), pode ser reversível ou irreversível, dependendo do alvo e da forma de dano oxidativo (TRACHOOTHAM et al., 2008). Devido à alta reatividade do radical hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ), ele exerce mais efeitos nocivos a proteínas, enquanto o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o ânion superóxido ( $\text{O}_2^\cdot^-$ ) 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).

A exposição a um composto químico pode afetar a função do sistema nervoso dos organismos, sendo que a maioria dos inseticidas tem como alvo a transmissão sináptica, especialmente nas junções neuromusculares (NIKINMAA, 2014). Uma das enzimas cuja atividade é comumente usada para a avaliação de neurotoxicidade em peixes é a acetilcolinesterase (AChE). A AChE atua em várias vias colinérgicas no sistema nervoso central e periférico, no final da transmissão do

impulso nervoso, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético (COLOVIC et al., 2013). Portanto, a inibição ou inativação da AChE pode levar ao acúmulo de acetilcolina, hiperestimulação de receptores colinérgicos e alterações na neurotransmissão, resultando em uma estimulação contínua (COLOVIC et al., 2013). Muitos contaminantes ambientais são excitotóxicos, ou seja, impedem o retorno da célula pós-sináptica ao estado de repouso (NIKINMAA, 2014) (Fig. 13).

A inibição da AChE tem sido relacionada à exposição a inseticidas organofosforados e carbamatos (COLOVIC et al., 2013; NIKINMAA, 2014). Entretanto, alguns estudos demonstram que as acetilcolinesterases podem ser sensíveis também a outros tipos de contaminantes ambientais como metais e inseticidas piretroides (SIMONATO et al., 2016; VIEIRA; MARTINEZ, 2018). A atividade a AChE tem sido constantemente usada como biomarcador para a verificação dos efeitos primários da contaminação em diferentes organismos, incluindo peixes, e na avaliação da qualidade das águas (VIEIRA et al., 2016, 2017).

**Figura 13** – Possíveis influências de contaminantes na sinapse.



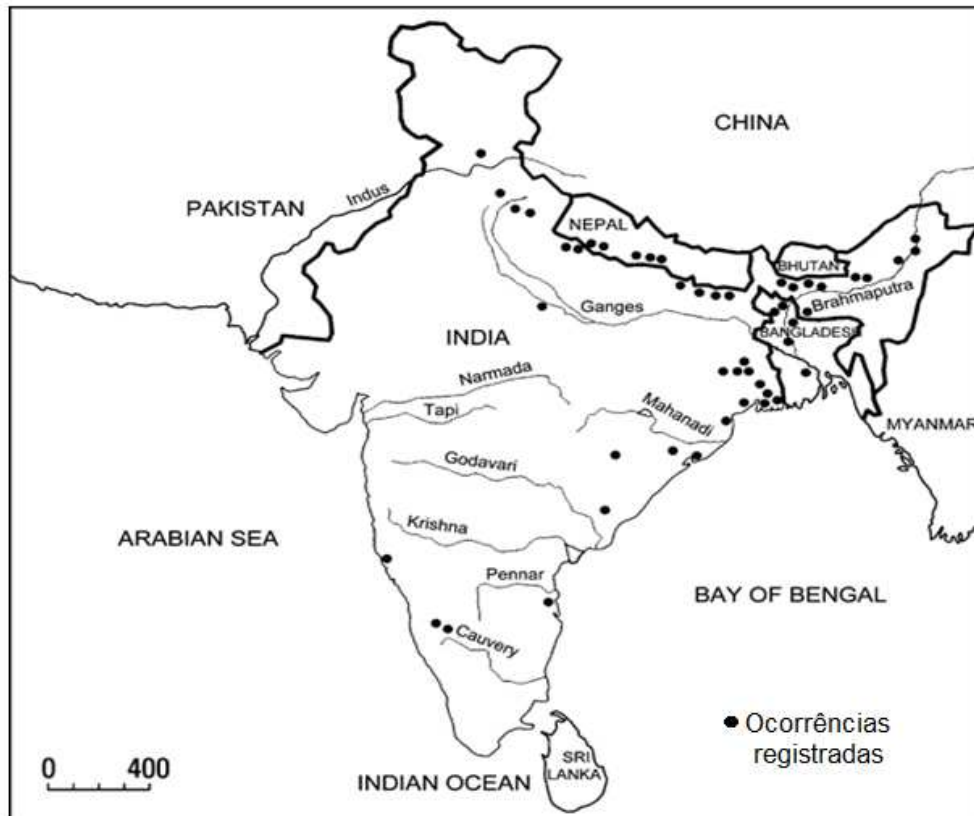
**Fonte:** adaptado de NIKINMAA (2014); GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU (2015).

## 2.6 *DANIO RERIO*: UM ÓTIMO MODELO DE VERTEBRADO

O peixe-zebra, *Danio rerio* (Hamilton 1822), é uma espécie pequena de peixe tropical que é amplamente utilizada no aquarismo (CANEDO et al., 2022). Esse animal é nativo da região sudeste do Himalaia, incluindo Índia, Paquistão, Bangladesh, Nepal e Myanmar (SPENCE et al., 2008) (Fig. 14). Por ser encontrada em uma ampla gama de habitats naturais com condições ambientais altamente variáveis, tornou-se essa espécie adequada para ser criada em laboratório (LARS;

BEATA, 2022).

**Figura 14** – Distribuição natural do *D. rerio*.



Fonte: SPENCE et al., 2008

Na fase adulta esse peixe tem entre 2 e 4 cm de comprimento, com o macho apresentando forma semelhante a um torpedo (Fig. 15 A) e a fêmea, uma barriga maior e caracteristicamente esbranquiçada (Fig. 15 B). Além disso, ambos os sexos têm listras azul-escuras em cada lado, intercaladas com listras douradas nos machos ou prateadas nas fêmeas (LARS; BEATA, 2022).

**Figura 15** – Desenho representativo do *D. rerio* adulto.

**(A)** Machos

**(B)** Fêmeas

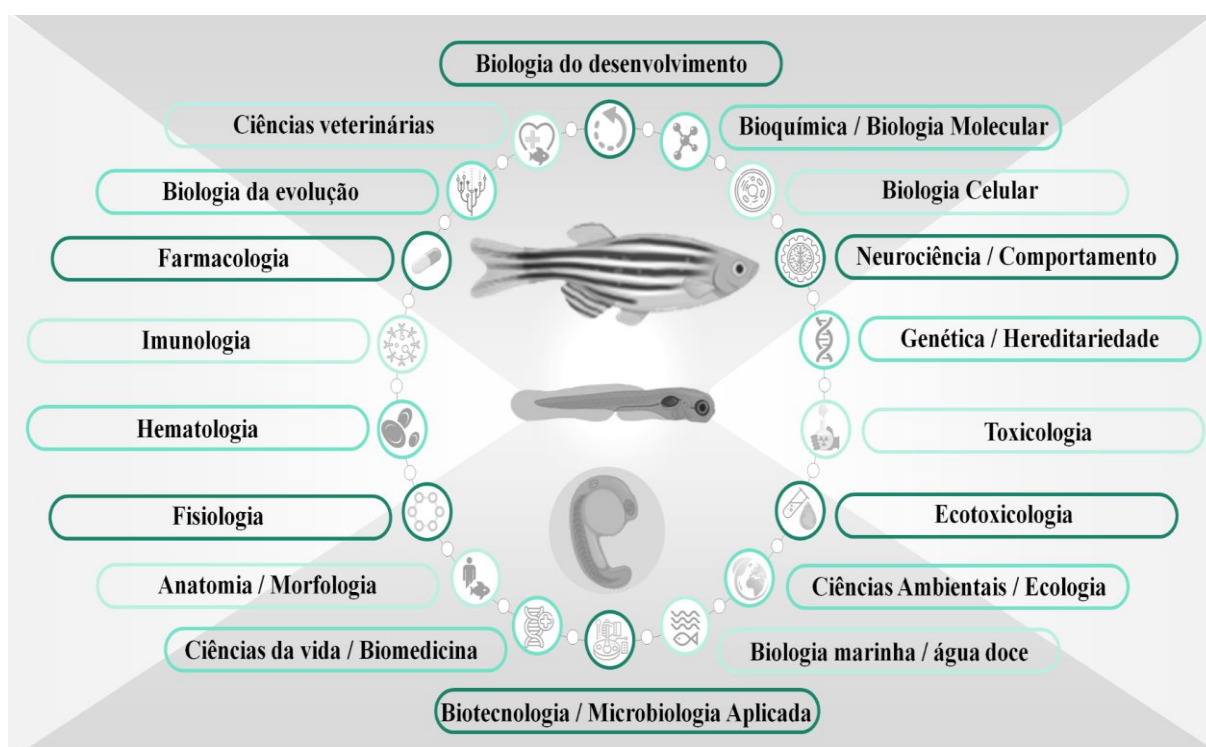


Fonte: adaptado de LARS; BEATA (2022). Ilustrações de BioRender.

Esse animal tem sido muito utilizado em estudos genéticos, principalmente por causa do ciclo reprodutivo curto e da alta capacidade de reprodução, indicando ser um modelo ideal para obter informações sobre mecanismos de dano em biomoléculas, reparo do material genético, formação de MN e AENs (PEI; STRAUSS, 2013; CANEDO et al., 2021). Além disso, o peixe-zebra já possui seu genoma totalmente sequenciado e depositado em um banco de dados (CANEDO; ROCHA, 2021), o que facilita na criação de primers para a análise da expressão gênica. Como o genoma do peixe-zebra é altamente conservado com o dos humanos (~ 70% ortólogo), é possível recapitular os estados de doença humana no peixe-zebra (NIEDERRITER et al., 2013).

Além de estudos genéticos, esse peixe tem sido um ótimo sistema modelo bem estabelecido em diferentes áreas de pesquisa, como biologia do desenvolvimento, ecotoxicologia, nanotecnologia, biologia da evolução, entre outras (CANEDO et al., 2022) (Fig. 16).

**Figura 16** – O uso do *D. rerio* em várias áreas da pesquisa científica.



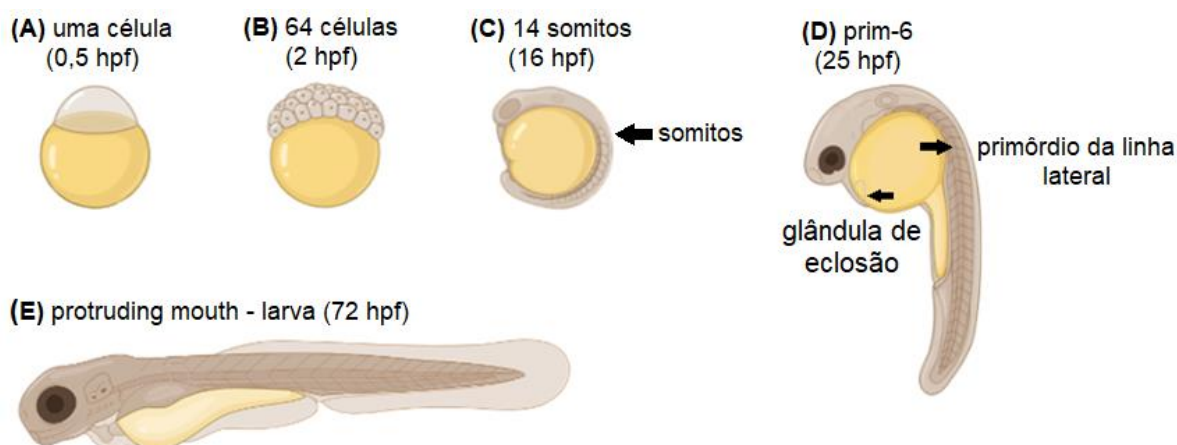
Fonte: CANEDO et al. (2022).

O teleósteo *D. rerio* possui produção de ovos em larga escala com desenvolvimento rápido, seus embriões são transparentes, o que permite a observação da formação de órgãos importantes nos primeiros dias após a fertilização,

além de serem de fácil manuseio em condições de laboratório (DAVIS et al., 2014; TORRE et al., 2022).

Os precursores de quase todos os órgãos são formados durante a somitogênese. Além disso, após apenas 24 h pós-fertilização (hpf), o embrião já possui uma rede axonal funcional (LARS; BEATA, 2022). Logo depois, o coração começa a bater (aproximadamente 30 hpf) e a partir de aproximadamente 48 hpf o peixe-zebra eclode (LARS; BEATA, 2022). Os estágios iniciais de desenvolvimento do peixe-zebra podem ser observados na Figura 17.

**Figura 17** – Estágios iniciais de desenvolvimento do *D. rerio*.



**Fonte:** adaptado de KIMMEL et al. (1995) e LARS; BEATA (2022). Ilustrações de BioRender.

A fase embriolarval deste animal é frequentemente utilizada para determinar a toxicidade aguda de produtos químicos (OECD, 2013). O teste *Fish Embryo Acute Toxicity* (FET) é baseado em estudos e atividades de validação realizadas no peixe-zebra. Os ovos recém-fertilizados são expostos por 96 h ao produto químico a ser testado, e a cada 24 horas, até quatro observações são registradas como indicadores de letalidade: coagulação dos ovos fertilizados; ausência de formação de somitos; não desprendimento da cauda do saco vitelínico; e a falta de batimentos cardíacos (OECD, 2013).

Dada a considerável importância do peixe-zebra como modelo experimental, juntamente com os custos econômicos associados ao seu uso em larga escala na pesquisa, esse teleósteo torna-se um excelente modelo para avaliação de ambientes contaminados por inseticidas, visto que podemos utilizar diferentes fases de desenvolvimento para avaliar efeitos letais e subletais.

### 3 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os possíveis efeitos da exposição aguda aos inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina (LC) e imidacloprido (IMI) em concentrações ambientalmente relevantes, isolados e em mistura (MIX), na fase embriolarval e adulta do peixe *Danio rerio*, por meio da análise de múltiplos biomarcadores.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar se a exposição ao longo de 96 hpf de *D. rerio* na fase embriolarval aos formulados LC e IMI, isolados e em mistura promove alterações nos biomarcadores de desenvolvimento (taxa de mortalidade e eclosão, falta de formação de somitos, não descolamento da cauda, alterações morfológicas, ausência e frequência cardíaca);
- b) Determinar os efeitos genotóxicos (danos no DNA), oxidativos (alterações nas enzimas antioxidantes e na lipoperoxidação) e neurotóxicos (alterações na atividade da AChE) dos produtos formulados de LC e IMI, isolados e em mistura, na fase embriolarval de *D. rerio*;
- c) Avaliar se os formulados LC e IMI, isolados e em mistura, promovem alterações em biomarcadores genéticos (danos no DNA, expressão gênica do gene de reparo *ogg1*, frequência de MN e AENs) na fase adulta de *D. rerio*;
- d) Analisar se os formulados LC e IMI, isolados e em mistura, promovem alterações em biomarcadores bioquímicos (LPO, PCO, GSH, SOD, CAT, GPx, EROD, GST e AChE) na fase adulta de *D. rerio*;
- e) Investigar os efeitos interativos (aditivos, sinérgicos ou antagônicos) da mistura dos formulados LC e IMI nos parâmetros analisados;
- f) Caracterizar as respostas biológicas nas diferentes fases de desenvolvimento de *D. rerio* após a exposição aguda aos produtos formulados LC e IMI, isolados e em mistura.

#### 4 HIPÓTESES

- 1) A fase adulta será mais sensível que a fase embriolarval;
- 2) A fase embriolarval apresentará alterações nos biomarcadores de desenvolvimento quando expostos aos inseticidas formulados LC e IMI, isolados e em mistura;
- 3) A exposição à mistura dos agrotóxicos testados resultará em efeitos subletais diferentes daqueles promovidos pelos inseticidas de forma isolada;
- 4) Os prováveis danos genotóxicos nos exemplares de *D. rerio* expostos aos inseticidas formulados isolados e em mistura correlacionam-se com os danos oxidativos encontrados em lipídeos e proteínas;
- 5) As defesas antioxidantes e o sistema de reparo serão afetados negativamente pelos inseticidas formulados isolados e em mistura, devido ao estresse oxidativo gerado por eles;
- 6) A toxicidade desses inseticidas formulados, isolados e em mistura, provocará a inibição da atividade das enzimas de biotransformação e da acetilcolinesterase.

REFERÊNCIAS – CAPÍTULO I

AFFUM, A. O. et al. 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.

ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: A critical review. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.

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

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.

ARCANJO, C. et al. Tritiated water exposure disrupts myofibril structure and induces mis-regulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages. **Aquatic Toxicology**, v. 200, n. April, p. 114–126, 2018.

AWOYEMI, O. M. et al. Behavioral, molecular and physiological responses of embryonal larval zebrafish exposed to types I and II pyrethroids. **Chemosphere**, v. 219, p. 526–537, 2019.

BACCHETTA, C. et al. Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. **Ecological Indicators**, v. 36, p. 532–538, abr. 2014.

BASS, C. et al. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 78–87, 2015.

BEBANE, P. S. A. et al. The effects of the neonicotinoid imidacloprid on gene expression and DNA methylation in the buff-tailed bumblebee *Bombus terrestris*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 286, n. 1905, 2019.

BECKER, A. G. et al. 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.

BHAGAT, J.; INGOLE, B. S.; SINGH, N. Glutathione S-transferase, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and lipid peroxidation as biomarkers of oxidative stress in snails: A review. **Invertebrate Survival Journal**, v. 13, n. 1, p. 336–349, 2016.

BIJLSMA, Lubertus et al. Ecological risk assessment of pesticides in the Mijares River (eastern Spain) impacted by citrus production using wide-scope screening and target quantitative analysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 412, p. 125277, 2021.

BLANC, M. et al. The insecticide permethrin induces transgenerational behavioral changes linked to transcriptomic and epigenetic alterations in zebrafish (*Danio rerio*). **Science of the Total Environment**, v. 779, p. 146404, 2021.

BORTOLUZZI, E. C. et al. 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: 12 jun. 2019.

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 jun. 2019.

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

CAMPANA, M. A. et al. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 99–103, 2003.

CANEDO, A. et al. Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. **Environmental Pollution**, v. 290, p. 118019, 2021.

CANEDO, A. et al. Zebrafish (*Danio rerio*) meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, 2022.

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.

CARROLA, J. et al. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries—

Portugal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 9, p. 6057-6068, 2014.

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.

COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

COSTA, S. R. et al. Comparison of the Base Excision Repair Activity in Liver Cell Models of Zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 15, n. 2, p. 107–111, 2018.

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

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.

DAVIS, E. E.; FRANGAKIS, S.; KATSANIS, N. Interpreting human genetic variation with in vivo zebrafish assays. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 10, p. 1960–1970, 2014.

DEANOVIC, L. A. et al. Tracking pyrethroid toxicity in surface water samples: Exposure dynamics and toxicity identification tools for laboratory tests with *Hyalella azteca* (Amphipoda). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 462–472, 2018.

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.

DO AMARAL, A. M. B. et al. Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir. **Chemosphere**, v. 191, p. 876–885, 2018.

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

FIORENZA, R. et al. Preferential removal of pesticides from water by molecular imprinting on TiO<sub>2</sub> photocatalysts. **Chemical Engineering Journal**, v. 379, p. 122309, jul. 2020.

FURLEY, T. H. et al. Toward sustainable environmental quality: Identifying priority research questions for Latin America. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 14, n. 3, p. 344–357, 2018.

GALLOWAY, T. S.; COLE, M.; LEWIS, C. Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. **Nature Ecology and Evolution**, v. 1, n. 5, p. 1–8, 2017.

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.

GIDDINGS, J. M. et al. Derivation of combined species sensitivity distributions for acute toxicity of pyrethroids to aquatic animals. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 2, p. 242–250, 2019.

GLISIC, B. et al. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 50–62, 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.

GUEDEGBA, N. L. et al. Comparative acute toxicity of two phytosanitary molecules, lambda-cyhalothrin and acetamiprid, on Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) juveniles. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 7, p. 580-589, 2019.

GUILHERME, S. et al. Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure? **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 213–221, 2014.

HANAZATO, T. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental pollution*, v. 112, n. 1, p. 1-10, 2001.

HE, L. M. et al. Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of lambda-cyhalothrin. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 195, p. 71–91, jan. 2008.

HUNT, L. et al. 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. Relatório de comercialização de agrotóxicos. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>>. Acesso em: 31 jan. 2023.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria journal of medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

IN, O. E. C. D. OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4. 2013.

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

JEEVA, J. S. et al. Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 7, n. Suppl 2, p. S331, 2015.

JESCHKE, P. et al. A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2897-2908, 2011.

KARAMI, A. et al. The effects of intramuscular and intraperitoneal injections of benzo[a]pyrene on selected biomarkers in *Clarias gariepinus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1558–1566, 2011.

KHAN ACADEMY. Verificação e reparo do DNA. 2019. Disponível em: <<https://pt.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-replication/a/dna-proofreading-and-repair>>. Acesso em: 16 ago. 2019.

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.

KIENZLER, A. et al. Assessment of base-excision repair activity in fish cell lines: Toward a new biomarker of exposure to environmental contaminants? **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 753, n. 2, p. 107–113, 2013.

KIMMEL, Charles B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

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

KOVÁCS, R. et al. Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study. **Water research**, v. 77, p. 201-212, 2015.

LARS, B.; BEATA, F. G. Biology and research applications. In: Laboratory Fish in Biomedical Research. **Academic Press**, p. 3-21, 2022.

LING, L. et al. Oxidative stress intensity-related effects of cadmium (Cd) and paraquat (PQ) on UV-damaged-DNA binding and excision repair activities in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 167, p. 10–18, 2017.

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.

LU, Z. et al. Understanding the bioavailability of pyrethroids in the aquatic environment using chemical approaches. **Environment International**, v. 129, p. 194–207, dez. 2019.

LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish physiology and biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 711-747, 2016.

MANDUZIO, H. et al. The point about oxidative stress in molluscs. **Invertebrate Survival Journal**, v. 2, n. 2, p. 91–104, 2005.

METER, R. J. V. et al. Agrochemical Mixtures and Amphibians: The Combined Effects of Pesticides and Fertilizer on Stress, Acetylcholinesterase Activity, and Bioaccumulation in a Terrestrial Environment. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 38, n. 5, p. 1052–1061, 2019.

NAVARRO-MARTÍN, L. et al. DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. **PLoS genetics**, v. 7, n. 12, p. e1002447, 2011.

NIEDERRITER, A. R. et al. In vivo modeling of the morbid human genome using *Danio rerio*. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 78, p. e50338, 2013.

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- 3 SPEC. ISS., p. 109–149, 2004.

PALMQUIST, K.; SALATAS, J.; FAIRBROTHER, A. Pyrethroid Insecticides: Use, **Environmental Fate, and Ecotoxicology**. *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*, 2012.

PAPADAKIS, E. N. et al. Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 536, p. 793-802, 2015.

PEI, D. S.; STRAUSS, P. R. Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 743–744, p. 151–159, 2013.

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.

POSSAVATZ, J. et al. 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. et al. 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.

ROCHA, A. A. et al. Monitoring of pesticide residues in surface and subsurface waters, sediments, and fish in center-pivot irrigation areas. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 2269-2278, 2015.

SCHLENK, D. et al. Biomarkers. In: DI GIULIO, R.T., HINTON D.E. (Org.). **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, New York, pp. 683-715, 2008.

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

SERIANI, R. et al. Hematological characteristics, frequency of micronuclei and nuclear abnormalities in peripheral of fish from São Francisco river Basin, Minas Gerais State, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 1, p. 107–112, 2011.

SHARMA, S.; BASU, S. Separation and Purification Technology Highly reusable visible light active hierarchical porous WO<sub>3</sub> / SiO<sub>2</sub> monolith in centimeter length scale for enhanced photocatalytic degradation of toxic pollutants. **Separation and Purification Technology**, v. 231, p. 115916, jul. 2020.

SHEN, W. et al. Lethal toxicity and gene expression changes in embryonic zebrafish upon exposure to individual and mixture of malathion, chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin. **Chemosphere**, v. 239, p. 124802, 2020.

SHI, X. et al. Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish. **Chemosphere**, v. 85, n. 6, p. 1010–1016, 2011.

SHIMIZU, N. et al. 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. et al. Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. **Toxicology Reports**, v. 4, p. 240–244, mai. 2017.

SILVA, V. et al. Science of the Total Environment Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 1532–1545, 2019.

SIMONATO, J. D. et al. Biomarkers of waterborne copper exposure in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic toxicology**, v. 170, p. 31-41, 2016.

SOLOMON, K. R. et al. Effects of Herbicides on Fish. In: **Fish physiology**. Academic Press, p. 369-409, 2013.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

SPOSITO, J. C. V. et al. Emerging contaminants in Brazilian rivers: occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 209, p. 696-704, 2018.

TIŠLER, T. et al. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. **Chemosphere**, v. 76, n. 7, p. 907–914, 2009.

TORRE, C. D. et al. The zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval contact assay combined with biochemical biomarkers and swimming performance in sewage sludge and hydrochar hazard assessment. **Environmental Pollution**, p. 119053, 2022.

TRACHOOTHAM, D. et al. Redox regulation of cell survival. **Antioxidants and 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. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

VANDEGEHUCHTE, M. B.; JANSSEN, C. R. Epigenetics in an ecotoxicological context. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 764, p. 36-45, 2014.

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. et al. 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, n. 1, 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, 2013.

VELDHOEN, N.; IKONOMOU, M. G.; HELBING, C. C. Molecular profiling of marine fauna: Integration of omics with environmental assessment of the world's oceans. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 23-38, 2012.

VIEIRA, C. E. D. et al. 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. et al. 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. et al. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 598–609, 2017.

VIEIRA, C. E. D. et al. 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.

VIEIRA, C. E. D.; MARTINEZ, C. B. R. The pyrethroid  $\Lambda$ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus*

*lineatus*. **Chemosphere**, v. 210, p. 958–967, 2018.

WANG, W. et al. Comparison of the acute toxicity for gamma-cyhalothrin and lambda-cyhalothrin to zebra fish and shrimp. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 47, n. 2, p. 184-188, 2007.

WANG, Y. et al. 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.

WU, S. et al. Joint toxic effects of triazophos and imidacloprid on zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Pollution**, v. 235, p. 470-481, 2018.

XIA, X. et al. Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 132–139, 2016.

YI, X. et al. Occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface water and sediment of the Guangzhou section of the Pearl River, South China. **Environmental Pollution**, v. 251, p. 892–900, 2019.

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

## CAPÍTULO II

---

**Efeitos de inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina e imidacloprido, isolados e em mistura, na fase embriolarval de *Danio rerio***

Tiago Tomiama Alvim; Caroline Santos; Claudia Buenos dos Reis Martinez

**Manuscrito a ser submetido à revista Environmental Toxicology and Pharmacology**

Guia para autores: <https://www.elsevier.com/journals/environmental-toxicology-and-pharmacology/1382-6689/guide-for-authors>

Environmental Toxicology and Pharmacology

**Efeitos de inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina e imidacloprido, isolados e em mistura, na fase embriolarval de *Danio rerio***

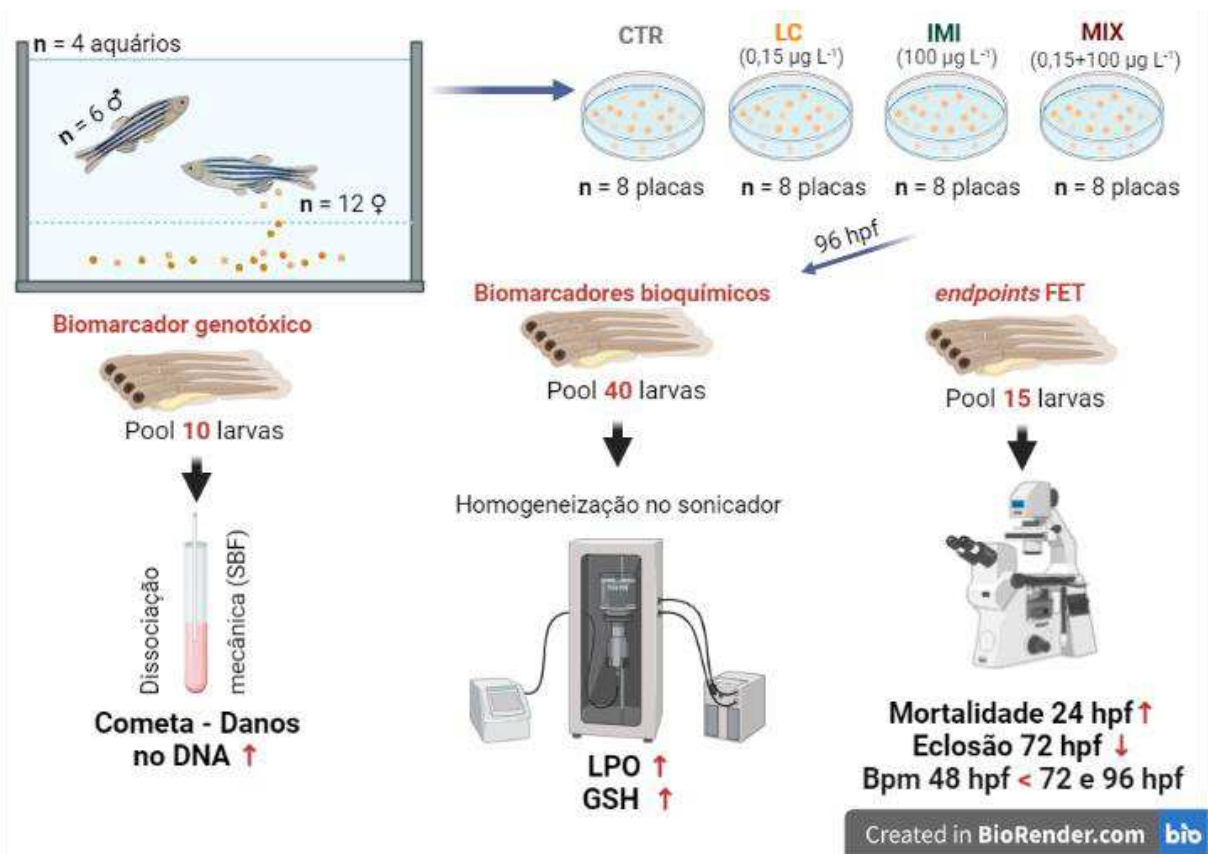
Tiago Tomiama Alvim, Caroline Santos; Claudia Bueno dos Reis Martinez\*

\*Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, Londrina, Paraná, 86057-970, Brasil.

Autor correspondente: Tel.: +55-43-33715146; E-mail: cbueno@uel.br

**DESTAQUES:**

- LC, IMI e MIX causaram aumento na mortalidade de embriões em 24 hpf;
- IMI promoveu danos no DNA e diminuição na taxa de eclosão de larvas em 72 e 96 hpf;
- LC provocou diminuição na taxa de eclosão de larvas em 96 hpf;
- MIX causou diminuição na taxa de eclosão de larvas em 72 e 96 hpf;
- MIX induziu lipoperoxidação e aumento da concentração de glutatona em larvas.



### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos inseticidas  $\lambda$ -cialotrina (LC 0,15 $\mu$ g L<sup>-1</sup>) e imidacloprido (IMI 100 $\mu$ g L<sup>-1</sup>), isolados e em mistura, para a fase embrionarval de *Danio rerio*, após exposições de 96 hpf. Foram avaliados parâmetros de desenvolvimento, a ocorrência de danos no DNA e lipoperoxidação, concentração de glutathione, a atividade de enzimas antioxidantes, de biotransformação e neurotoxicidade. LC e IMI, isolados e em combinação, causaram aumento da mortalidade em embriões após 24 hpf e diminuição da eclosão após 96 hpf. O IMI apresentou mais efeitos subletais, causando danos ao DNA e diminuição da eclosão após 72 hpf. A mistura reduziu a eclosão, promoveu maiores níveis de lipoperoxidação e da concentração de glutathione, indicando provável interação sinérgica. LC e IMI isolados ou em combinação podem ser prejudiciais nas fases iniciais de vida de *D. rerio* e a interação entre esses inseticidas pode levar a um aumento da toxicidade.

**Palavras-chave:** piretroides; neonicotinoides; genotoxicidade; estresse oxidativo; ecotoxicologia.

## 1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento e a intensificação da agricultura, a utilização de agrotóxicos vem aumentando progressivamente ao longo dos anos (Zhang, et al., 2020). O uso indiscriminado e errôneo desses produtos resulta na contaminação de ambientes aquáticos como consequência da deriva de pulverização, da lixiviação e do escoamento superficial (Giddings et al., 2019; Bijlsma et al., 2021). De acordo com Xia et al. (2016), apenas cerca de 1% dos agrotóxicos atuam nos organismos-alvo, enquanto o restante permanece no solo, evapora ou escoam para águas superficiais.

Dentre os compostos utilizados na agricultura estão os inseticidas piretroides e os neonicotinoides utilizados em todo mundo no controle de insetos-alvo em uma grande variedade de culturas vegetais (Fai; Kinfaek; Towa, 2017; Deanovic, et al., 2018; Kundoo et al., 2018). No processo de aplicação nas plantações, os agricultores costumam pulverizar diferentes agrotóxicos e a aplicação conjunta de inseticidas piretroides e neonicotinoides são comuns na agricultura, pois além de reprimir os insetos-alvo efetivamente, a mistura proporciona o controle diferentes tipos de pragas (Xia et al., 2016; Regan et al., 2017). Esses inseticidas já foram detectados em águas superficiais próximos a áreas agrícolas, o que gera preocupação sobre seus potenciais efeitos nos ecossistemas aquáticos e organismos não-alvo (Fai; Kinfaek; Towa, 2017; Deanovic, et al., 2018; Kundoo et al., 2018).

O piretroide  $\lambda$ -cialotrina (LC) e o neonicotinoide imidacloprido (IMI) são inseticidas de alta eficiência considerados substitutos dos agrotóxicos organofosforados em diferentes países (Wang et al., 2015). O IMI possui alta 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 Staalduien; Van Der Sluijs, 2013). No Brasil, alguns estudos encontraram concentrações que variam de 0,001 a  $123 \mu\text{g L}^{-1}$  (Rocha et al., 2015; Sposito et al., 2018; Montagner et al., 2019). Em relação a LC, esse inseticida já foi encontrado em águas superficiais próximas a áreas agrícolas em concentrações que variam de 0,02 a  $50,92 \mu\text{g L}^{-1}$  (Papadakis, et al., 2015; Affum et al., 2018; Rodríguez-Aguilar et al., 2022). No Brasil, a  $\lambda$ -cialotrina foi encontrada em sedimentos de fundo de rios e riachos em concentrações que variam de  $1,32 \mu\text{g kg}^{-1}$  a  $60 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Possavatz et al., 2014; Hunt et al., 2016).

Considerando a aplicação combinada nas culturas agrícolas e o transporte dos compostos para ao ambiente aquático, geralmente os agrotóxicos ocorrem em

misturas no ambiente natural (Vieira et al., 2016; Marchand et al., 2022). As misturas de agrotóxicos podem apresentar efeitos característicos que diferem dos observados nos compostos isolados, efeitos estes classificados como sinérgicos, aditivos e antagonísticos (Wang et al., 2015, 2022; Xia et al., 2016).

A compreensão dos efeitos das misturas de agrotóxicos é especialmente importante na definição precisa do risco potencial das misturas para espécies não-alvo (Bacchetta et al., 2014; Wang et al., 2021, 2022). As espécies que se reproduzem no ambiente contaminado estão sujeitas a alterações nos parâmetros reprodutivos e nas taxas de sobrevivência e desenvolvimento de embriões e larvas, o que pode repercutir na dinâmica populacional ao longo do tempo (Golin et al., 2022; Marchand et al., 2022).

Para a análise dos efeitos de contaminantes em organismos não-alvo, o peixe-zebra (*Danio rerio*) é um organismo modelo amplamente utilizado principalmente devido às conhecidas características reprodutivas da espécie, ao ciclo de vida curto e à facilidade na observação do desenvolvimento embrionário (Davis; Frangakis; Katsanis, 2014; Velki et al., 2019; Torre et al., 2022;). A LC é tóxica em pequenas concentrações para o teleosteo *D. rerio*, conforme indicado pelos valores da concentração letal média ( $CL_{50-96h}$ ) variando de 11000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para embriões e 18000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para larvas (Shen et al., 2020). Por sua vez, o IMI aparenta ser menos tóxico em comparação com a  $\lambda$ -cialotrina, com valores maiores de  $CL_{50-96h}$ , variando de 121600  $\mu\text{g L}^{-1}$  para embriões e 128900  $\mu\text{g L}^{-1}$  para larvas (Wu et al., 2018).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos inseticidas LC e IMI, isolados e em mistura, nos biomarcadores baseados no *Fish Embryo Acute Toxicity* (FET) e nos em biomarcadores genotóxicos e bioquímicos na fase embriolarval de *D. rerio*, utilizando concentrações ambientalmente relevantes dos compostos. Os resultados desse estudo devem contribuir para elucidar os mecanismos de ação da  $\lambda$ -cialotrina, do imidacloprido e da mistura destes agrotóxicos nos primeiros estágios de vida do peixe *D. rerio*, fornecendo informações relevantes para o monitoramento ambiental.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Produtos químicos

As concentrações testadas referem-se às concentrações nominais do ingrediente ativo nas formulações comerciais da  $\lambda$ -cialotrina (Karate Zeon® CS - 5% i.a. de  $\lambda$ -cialotrina, Syngenta S.A., Brasil) e do imidacloprido (48% i.a. – Nortox S.A. Brasil). Essas concentrações nominais são consideradas subletais, pois estão abaixo dos valores de  $CL_{50-96\text{ h}}$  para a fase embriolarval de *D. rerio* para  $\lambda$ -cialotrina (Shen et al., 2020) e imidacloprido (Wu et al., 2018) e são ambientalmente relevantes (Van Dijk et al., 2013; Papadakis et al., 2015; Shukla et al., 2017; Affum et al., 2018; Rodríguez-Aguilar et al., 2022).

### 2.2 Desenho experimental

As matrizes de reprodução de *D. rerio* foram constituídas por 72 animais (48 machos e 24 fêmeas) comprados de uma piscicultura e transportados para o laboratório. Os peixes foram aclimatados por no mínimo sete dias, distribuídos em quatro aquários de 18 L (12 machos e 6 fêmeas por aquário), contendo água desclorada em fluxo contínuo, filtro biológico, aeração constante e fotoperíodo de 14 h: 10 h (claro/ escuro). Os animais foram alimentados 3 vezes ao dia com ração comercial (Alcon Basic MEP 200 Complex) e artemias congeladas (Bio Artemia).

As reproduções eram realizadas no início da manhã (7:00 às 8:30) para obtenção dos embriões. Os ovos eram coletados pelo método de bandejas coletoras, instaladas no fundo dos aquários de 18L. Esse método foi escolhido para evitar a predação dos ovos pelas matrizes de reprodução. Após o período de coleta, os ovos foram lavados cuidadosamente com água de cultivo desclorada para selecionar os embriões viáveis. Logo em seguida, os organismos-teste foram divididos em quatro grupos de exposição: I) grupo controle (CTR), com embriões expostos apenas à água reconstituída ( $CaCl_2 - 2\text{ mM}$ ,  $MgSO_4 - 0,5\text{ mM}$ ,  $NaHCO_3 - 0,7\text{ mM}$  e  $KCl - 0,07\text{ mM}$ ); II) grupo LC, com embriões expostos à água reconstituída contendo  $0,15\ \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\lambda$ -cialotrina; III) grupo IMI, com embriões expostos à água reconstituída contendo  $100\ \mu\text{g L}^{-1}$  de imidacloprido; IV) grupo MIX, com embriões expostos à água reconstituída contendo  $100\ \mu\text{g L}^{-1}$  de imidacloprido e  $0,15\ \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\lambda$ -cialotrina durante 96 horas pós-fertilização (96 hpf). Os testes de desenvolvimento com embriões e larvas foram

baseados no “*Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*”, de acordo com OECD 236 (2013).

Durante o período de aclimação e de reproduções, as medidas de temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD), pH e condutividade da água foram mensuradas diariamente. As características físicas e químicas da água permaneceram estáveis e não foram detectadas diferenças significativas entre os aquários de aclimação e de reprodução (T:  $26,13 \pm 0,33$  °C; pH:  $7,13 \pm 0,13$ ; OD:  $7,08 \pm 0,001$  mg L<sup>-1</sup>; condutividade:  $0,166 \pm 0,001$  mS cm<sup>-1</sup>).

Para o experimento baseado no FET de 96 hpf, foram realizadas exposições em placas de Petri (60x15 mm), em octoplicata (n=8 placas), contendo no máximo 15 embriões por placa. Em cada placa foi adicionado 15 mL das respectivas soluções teste de LC, IMI ou MIX, enquanto nas placas do grupo controle (CTR) foi adicionado 15 ml de água reconstituída. Os biomarcadores de desenvolvimento baseados no FET foram observados a cada 24 hpf em todos os animais.

Para os experimentos bioquímicos, as exposições foram realizadas em placas de Petri de 90x15 mm em octoplicata, contendo no máximo 50 embriões por placa. Em cada placa foi adicionando 40 mL das respectivas soluções teste de LC, IMI ou MIX, enquanto nas placas do grupo CTR foi adicionado 40 ml de água reconstituída. Após a exposição de 96 hpf, foram coletadas 40 larvas (pool) de cada placa de Petri (320 larvas por grupo experimental), anestesiadas no gelo, homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M e pH 7,8) imediatamente e armazenadas a -75° C até o momento das análises. Os experimentos bioquímicos foram repetidos três vezes para completar todas as análises bioquímicas (1° experimento: LPO e PCO; 2° experimento: GSH, SOD, CAT e GPx; 3° experimento: GST e AChE).

Na avaliação da genotoxicidade, as exposições foram realizadas seguindo os mesmos procedimentos descritos para os ensaios baseados do FET. Ao final das 96 hpf de exposição, foram coletadas 10 larvas (pool) de cada placa de Petri (80 larvas por grupo experimental), anestesiadas no gelo e dissociadas mecanicamente em soro bovino fetal (SBF) para a realização do ensaio alcalino do cometa.

Em todos os experimentos foi feita a renovação de 50% do meio experimental a cada 24 hpf (sistema semi-estático de exposição). As placas durante os experimentos eram armazenadas dentro da DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 26° C, com fotoperíodo de 14 h claro: 10 h escuro. As larvas excedentes dos ensaios bioquímicos e genotóxicos foram anestesiadas no gelo e depois mortas por imersão

em hipoclorito de sódio 6,15%. Os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 004.2020).

### 2.3 Teste FET

Os biomarcadores analisados a partir de 24 hpf em cada embrião/larva testados incluíram: a taxa de mortalidade; a falta de formação de somitos; o não descolamento da cauda e; alterações morfológicas. Além disso, a partir de 48 hpf foram analisados: a ausência de batimentos cardíacos; a frequência cardíaca (observada durante 60s) e; a taxa de eclosão ( $n^\circ$  de embriões eclodidos/ $n^\circ$  total de embriões  $\times$  100). As observações foram feitas em microscópio invertido (Olympus CKX41SF, Kyoto, Japão).

### 2.4 Análise de danos genotóxicos

O ensaio alcalino do cometa foi realizado de acordo com Singh et al. (1988) com modificações de Alvim e Martinez (2019). As amostras de larvas de *D. rerio* (pools) foram dissociadas mecanicamente em soro bovino fetal (SBF) e armazenadas refrigeradas (4° C) até o início do ensaio. As lâminas foram coradas com GelRed (Uniscience), cobertas com lamínula e analisadas por meio de teste cego em microscópio de fluorescência na objetiva de 40x. Foram avaliados 100 nucleoides por lâmina ( $n = 8$  lâminas por grupo experimental). Os danos no DNA foram classificados visualmente, considerando-se o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem danos 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 calculado pela fórmula:  $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$ , 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.

### 2.5 Biomarcadores Bioquímicos

As amostras de larvas de *D. rerio* foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M e pH 7,8), centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4°C) e o sobrenadante foi armazenado em ultrafreezer (-75 °C) até o momento das análises. Todas as análises bioquímicas foram padronizadas pela concentração de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

O ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi realizado de acordo com Camejo et al. (1998) para a medida de lipoperoxidação (LPO). Ao sobrenadante foi acrescentado butilhidroxitolueno (BHT 1 M), solução salina fosfatada (KCl 2 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM; NaCl 357 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; pH = 7), ácido tricloroacético (TCA 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 glutatona (GSH) foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963), através da reação dos grupamentos -SH com o reagente de cor 5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), que resulta em tiolato (TNB) e foi quantificado em 412 nm. A atividade da superóxido-dismutase (SOD) foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido em espectrofotômetro, a 550 nm, de acordo com McCord; Fridovich (1969). A atividade da catalase (CAT) foi determinada através da velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio pela enzima (Beutler, 1975). As amostras (1:100) foram adicionadas a um meio de reação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,25 mM), e o decréscimo de sua absorvância a 240 nm determinado durante 1 min. A atividade da glutatona peroxidase (GPx) foi estimada indiretamente através da oxidação do NADPH em presença de glutatona redutase (GR) e o substrato glutatona oxidada, produzida pela ação da GPx de acordo com Hopkins; Tudhope (1973). Uma alíquota (10 µL) das amostras foi misturada concomitantemente a 1 mL do tampão (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM; EDTA 2 mM; NaN<sub>3</sub> 5 mM; NADPH 0,2 mM; GSH 1 mM, 25°C e protegido da luz), à GR (1 U) e ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,4 mM) e a cinética da reação foi analisada por 1 minuto em espectrofotômetro a 340 nm.

A atividade da glutatona S-transferase (GST) foi determinada pelo monitoramento da complexação da glutatona reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), de acordo com o método descrito por Keen; Habig; Jakoby (1976). O aumento de CDNB conjugado foi monitorado durante 1 minuto, em

espectrofotômetro a 340 nm. Por fim, a atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi estimada segundo o método descrito por Ellman et al. (1961) e adaptado por Costa et al. (2007) para leitura em espectrofotômetro de microplacas a 415 nm. A atividade da AChE ( $\text{nmol DTNB}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$ ) foi determinada através da reação do iodeto de acetilcolina (9 mM) com reagente de cor contendo ditionitrobenzoato (0,5 mM). O produto da degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE, reage com o DTNB formando nitrobenzoato, que foi mensurado espectrofotometricamente a cada 3 minutos pelo tempo total de 6 minutos.

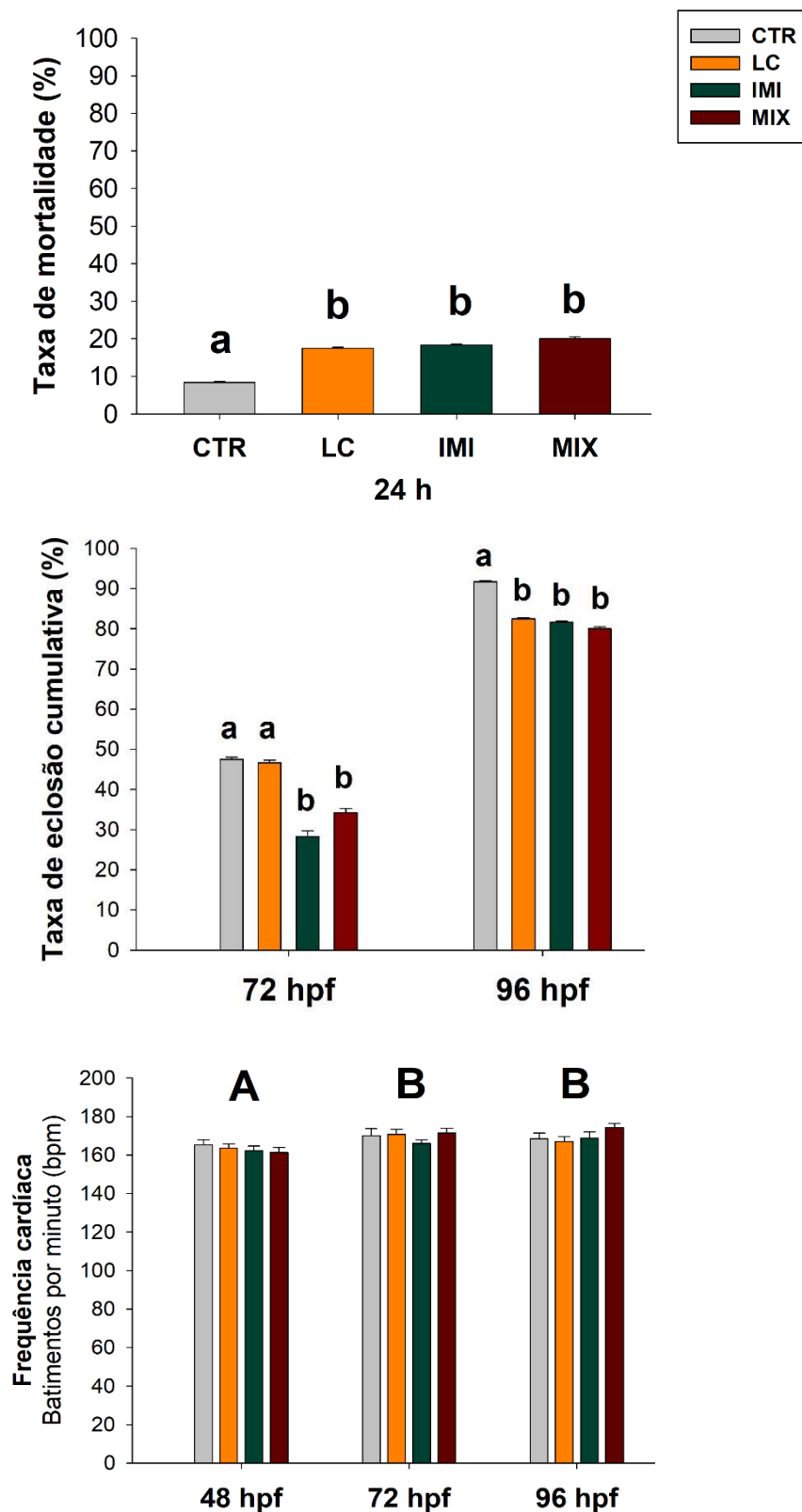
### 2.6 Análises estatísticas

Os resultados dos biomarcadores obtidos nos diferentes tratamentos, foram comparados entre si (CTR x LC x IMI x MIX) por meio de testes paramétricos (ANOVA) ou não-paramétricos (Kruskall-Wallis) pela análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), seguidos por testes de comparações múltiplas (Student-Newman-Keuls ou Dunn's) quando indicado, de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Já os resultados relacionados a frequência cardíaca batimentos por minuto – bpm) foram comparados estatisticamente por meio de análise de variância de dois fatores (*two-way* ANOVA, seguida por testes de comparações múltiplas (Tukey). Em ambos foi utilizado o software SigmaPlot 11.0, considerando significativos valores de  $p < 0,05$ .

**3 RESULTADOS****3.1 FET**

Após 24 hpf de exposição, os embriões dos grupos experimentais LC, IMI e MIX apresentaram taxa de mortalidade significativamente maior do que os embriões do grupo CTR (Fig. 1A). Nos demais tempos (48, 72 e 96 hpf), não houve mortalidade de embriões e larvas. Após 72 hpf de exposição, as larvas dos grupos experimentais IMI e MIX apresentaram taxa de eclosão significativamente menor que os animais do grupo CTR e LC (Fig. 1B). Após 96 hpf de exposição, todos os grupos experimentais apresentaram taxa de eclosão significativamente menor que os animais do grupo CTR (Fig. 1B).

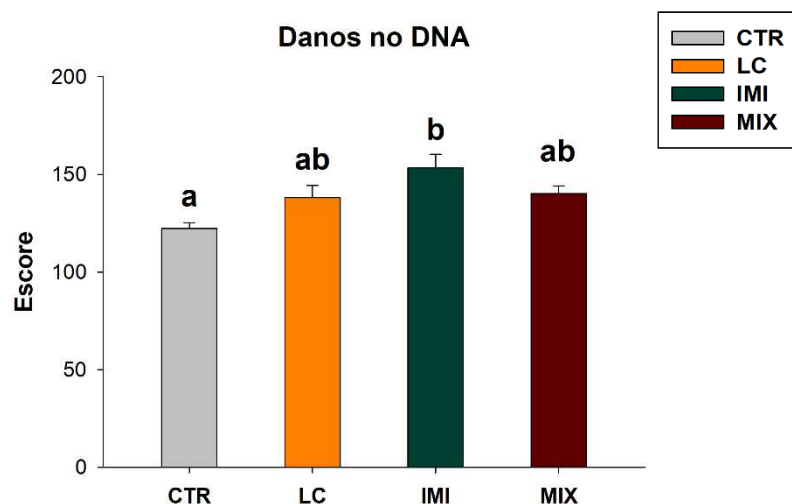
Em relação a frequência cardíaca, nos tempos de 72 e 96 hpf foi observado aumento dos batimentos cardíacos por minuto (bpm) quando comparado ao tempo de 48 hpf (Fig. 1C). Em todos os animais sobreviventes ao longo do experimento houve a formação de somitos e o desprendimento da cauda. Por fim, não foram encontradas alterações morfológicas ao longo de 96 hpf.



**Figura 1** – Taxa de mortalidade (A); taxa de eclosão cumulativa (B) e; batimentos cardíacos por minuto (C) na fase embrionária de *Danio rerio* expostos a  $\lambda$ -cialotrina (LC:  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI:  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 hpf. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP ( $n = 8$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo de exposição. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de exposição ( $p < 0,05$ ).

## 3.2 Danos no DNA

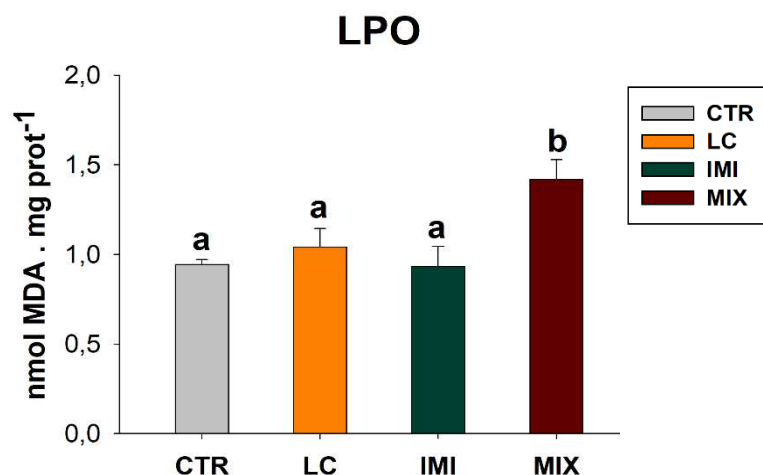
As larvas do grupo IMI apresentaram escore de danos no DNA significativamente maiores do que os animais do grupo CTR (Fig. 2). Não houve diferença significativa nos escores de dano nos grupos LC e MIX.



**Figura 2** – Escore de danos no DNA em larvas de *Danio rerio* expostas a  $\lambda$ -cialotrina (LC:  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI:  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 hpf. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

## 3.3 Lipoperoxidação

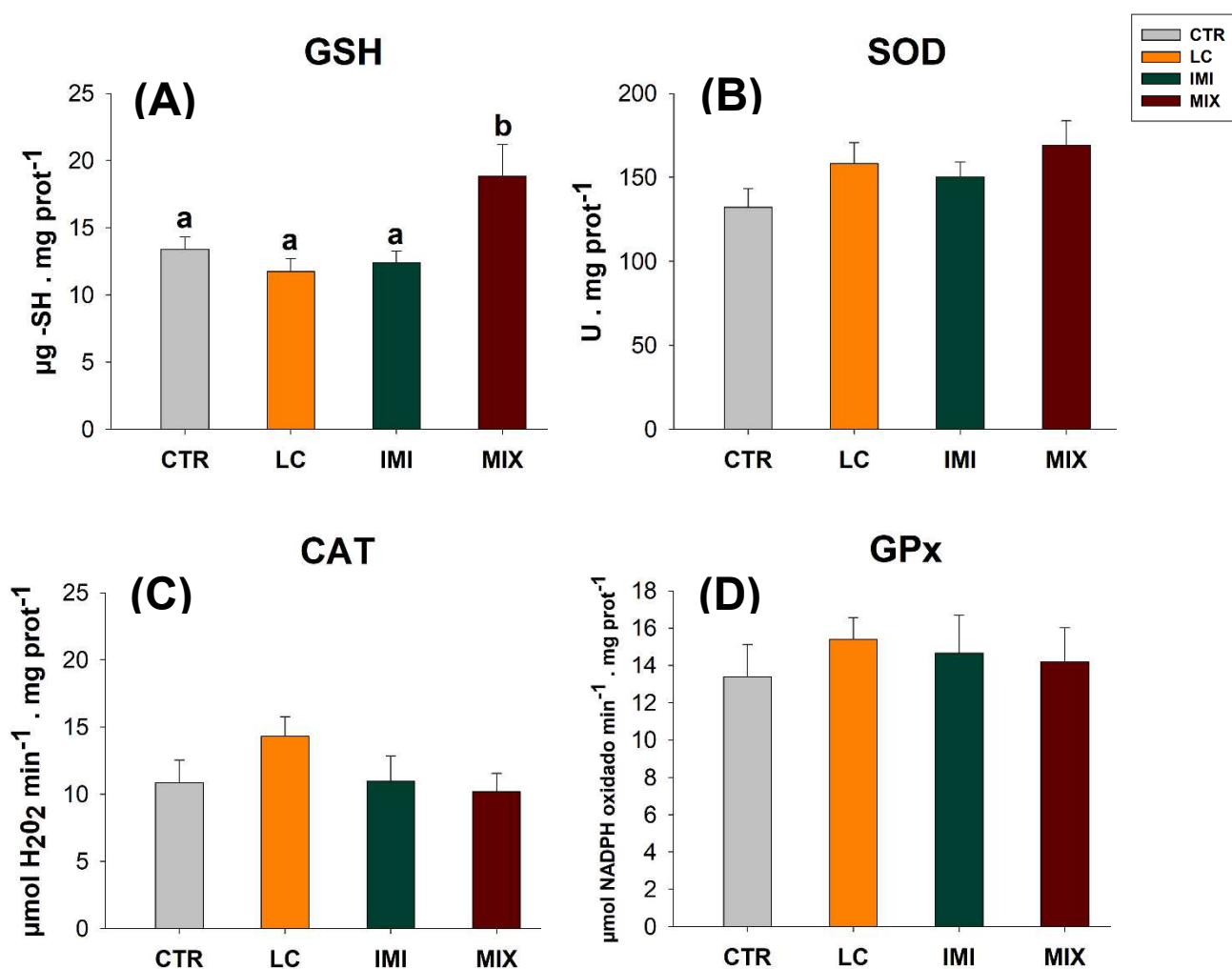
As larvas do grupo MIX apresentaram valor de lipoperoxidação (LPO) significativamente maior em relação aos demais grupos experimentais (Fig. 3). Não houve diferença significativa na ocorrência de LPO nos grupos LC e IMI.



**Figura 3** – Lipoperoxidação (LPO) em larvas de *Danio rerio* expostas a  $\lambda$ -cialotrina (LC:  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI:  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 hpf. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

3.4 Defesas antioxidantes

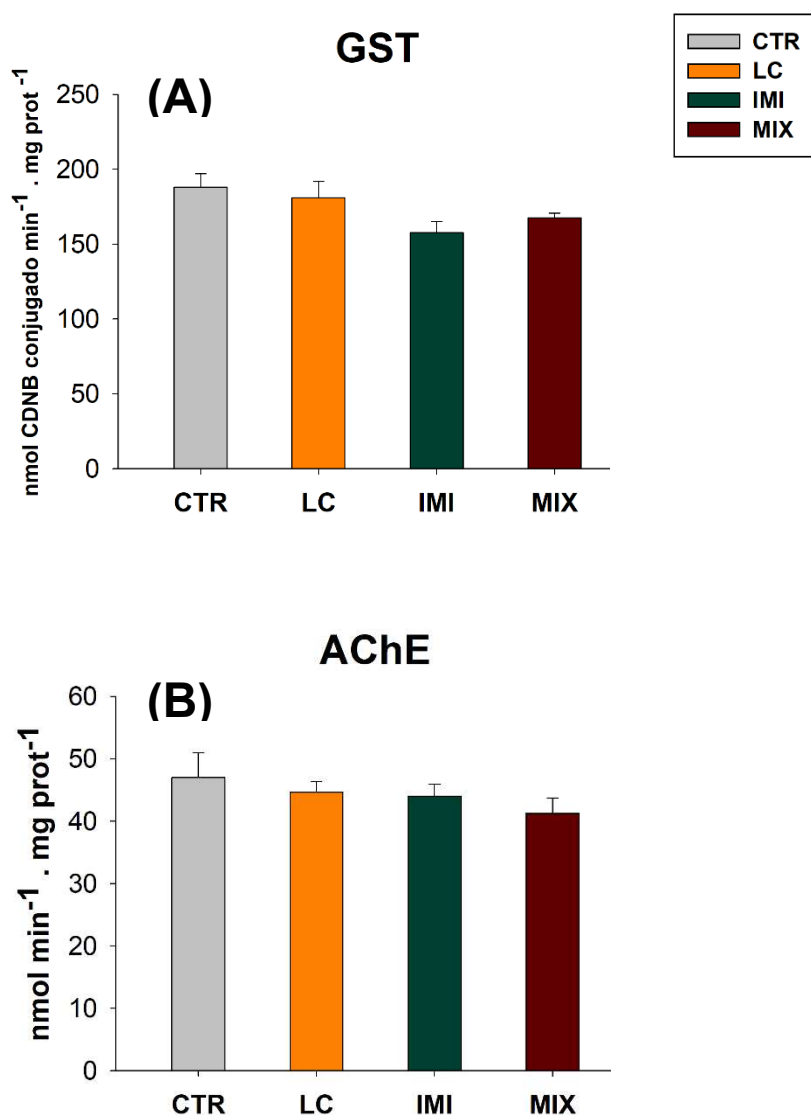
As larvas do grupo MIX apresentaram uma concentração de glutatona (GSH) significativamente maior que os animais dos demais grupos experimentais (Fig. 4A). Não houve diferença significativa nas atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) (Fig. 4B, 4C e 4D).



**Figura 4** – Concentração de glutatona – GSH (A); atividade das defesas antioxidantes: superóxido dismutase – SOD (B), catalase – CAT (C) e glutatona peroxidase – GPx (D) em larvas de *Danio rerio* expostas a  $\lambda$ -cicalotrina (LC:  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI:  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 hpf. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

## 3.5 Atividade da GST e AChE

Não houve diferença significativa na atividade das enzimas glutathione s-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE) entre os grupos experimentais (Fig. 5A e 5B).



**Figura 5** – Atividade das enzimas glutathione s-transferase – GST (A) e da acetilcolinesterase – AChE (B) em larvas de *Danio rerio* expostas a  $\lambda$ -cialotrina (LC: 0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI: 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 hpf. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 8).

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo verificamos que a fase embriolarval do *Danio rerio* foi afetada pela exposição dos inseticidas  $\lambda$ -cialotrina e imidacloprido, tanto isolados como em mistura. O inseticida IMI apresentou mais efeitos tóxicos subletais quando comparado a LC, visto que promoveu danos genotóxicos e alterações na taxa de eclosão já em 72 hpf desses animais, ao contrário da LC. A mistura desses compostos também se mostrou tóxica, já que foi capaz de promover danos oxidativos e alterações no sistema antioxidante não-enzimático, diferentemente da exposição isolada a esses inseticidas. Embora os principais modos de ação pelos quais esses produtos afetam os organismos-alvo sejam conhecidos, eles podem apresentar muitos efeitos adicionais que também podem afetar negativamente organismos não-alvos (Velki et al., 2019).

Nossos resultados mostraram que os embriões de *D. rerio* expostos à LC apresentaram um aumento significativo de 9,17% na taxa de mortalidade de embriões ao longo de 24 hpf de exposição. Resultados semelhantes foram observados em DeMicco et al. (2010) e Zhang et al. (2017) em concentrações que variaram de 1,12 – 224,93  $\mu\text{g L}^{-1}$ , concentrações estas maiores do que as utilizadas no nosso estudo. Estes autores observaram mortalidade em embriões de maneira concentração-dependente, prejudicando assim a sobrevivência de *D. rerio* nas fases iniciais de desenvolvimento. De acordo com DeMicco et al. (2009) e Awoyemi et al. (2019), piretroides do tipo II como a LC são mais potentes e perigosos que piretroides do tipo I para os organismos. Um estudo realizado por Shen et al. (2020) mostrou que a LC exibiu maior toxicidade para embriões de *D. rerio* quando comparado a outros inseticidas, como por exemplo, malation e clorpirifós.

Assim como a exposição a LC, os embriões de *D. rerio* expostos ao IMI apresentaram um aumento significativo de 10% na taxa de mortalidade de embriões ao longo de 24 hpf de exposição. Islam et al. (2019) também observaram aumento de mortalidade em 24 hpf de maneira concentração-dependente (10 – 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de IMI na fase embriolarval do peixe *Cyprinus carpio*. Esses resultados demonstram que embriões de *D. rerio* são sensíveis a ação do IMI, assim como a LC.

A eclosão é um período crítico da embriogênese que depende de processos bioquímicos e comportamentais, incluindo a digestão do córion por enzimas específicas e movimentos da larva para abrir o córion (Agbohessi et al., 2013). Os animais expostos ao IMI e a MIX apresentaram uma diminuição significativa de 19,17

% e 13,14 respectivamente na taxa de eclosão de larvas após 72 hpf de exposição. Isso pode indicar que parte do efeito observado na MIX, esteja relacionado ao efeito IMI, já que a LC não promoveu alterações na taxa de eclosão em 72 hpf. Islam et al. (2019) também observaram diminuição da taxa de eclosão após 72 hpf ao IMI, com efeito concentração-dependente ( $10 - 1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) na fase embriolarval do peixe *Cyprinus carpio*.

Em 96 hpf, observamos que todos os grupos experimentais apresentaram uma diminuição na taxa de eclosão de larvas em relação ao grupo CTR (LC: 9,16%; IMI: 10%; e MIX: 11,66%). Zhang et al. (2017), após expor embriões de *D. rerio* por 96 hpf a concentrações mais elevadas de LC ( $56,23$  e  $224,93 \mu\text{g L}^{-1}$ ), também observaram diminuição na taxa de eclosão de larvas. Com base nesses resultados, é possível que as variações na taxa de eclosão de larvas de *D. rerio* após a exposição a essas inseticidas pode estar relacionada a atividade da enzima proteolítica responsável pela eclosão na condição de estresse (Ma et al., 2019). A enzima de eclosão proteolítica desempenha um papel significativo na digestão do córion durante o processo de eclosão de larvas de teleósteos e pode ter sido afetada pela exposição a LC e ao IMI, isolados e em mistura (Pandey; Guo, 2014).

Um dos primeiros órgãos funcionais a se desenvolver no teleósteo *D. rerio* é o coração (Kuder; Gundala, 2018). Observamos que as larvas de *D. rerio* apresentaram um aumento na frequência cardíaca nos tempos de 72 e 96 hpf quando comparados ao tempo de 48 hpf. Esse aumento pode estar relacionado ao próprio desenvolvimento desses animais, pois eles requerem um aumento da frequência cardíaca para apoiar as atividades metabólicas ao longo do desenvolvimento (Watson et al., 2014).

Em nossos resultados, notamos o potencial genotóxico do IMI, pois observamos um aumento significativo no escore de danos DNA. Neste caso, é possível que esse inseticida atue como agente alquilante, formando adutos de DNA como visto em outros trabalhos (Bianchi; Cabral-de-Mello; Morales, 2015; Ge et al., 2015). Nos nossos resultados a LC na concentração utilizada não promoveu diferença significativa no escore de danos no DNA. Entretanto, sabe-se que esse inseticida é capaz de promover danos no DNA, visto que esse piretroide pode se ligar ao material genético através dos grupos reativos da sua fração ácida, podendo levar a desestabilização e ao desenrolamento do DNA, ocasionando assim, danos ao material genético (Saxena; Chauhan; Gupta, 2005).

As misturas de agrotóxicos são frequentemente encontradas em ambientes

aquáticos e o risco ecológico desses produtos em águas superficiais não pode ser previsto com precisão analisando apenas seus efeitos de maneira isolada (Wang et al., 2020). A mistura de agrotóxicos pode gerar efeitos colaterais na população de peixes, ameaçando o funcionamento normal dos ecossistemas aquáticos (Wang et al., 2020). Os embriões expostos a MIX apresentaram um aumento significativo de 11,7 % na taxa de mortalidade de embriões ao longo de 24 hpf de exposição. Os 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; Kinck; Towa, 2017). De acordo com Xia et al. (2016), quando piretroides e neonicotinoides atuam simultaneamente, essa combinação pode aumentar a toxicidade para peixes, o que foi observado em nossos resultados.

As larvas expostas à MIX apresentaram valores significativamente maiores de lipoperoxidação e no conteúdo de GSH em relação ao grupo CTR. A lipoperoxidação destaca-se como biomarcador clássico de estresse oxidativo, ocasionando prejuízos na organização da membrana e perda de funcionalidade (Niki, 2009). Já a glutathiona (GSH) se caracteriza como um peptídeo com diversas funções intracelulares que incluem desintoxicação, defesa antioxidante e até mesmo a modulação da proliferação celular (Lu, 2009). Em conjunto, os resultados para lipoperoxidação e conteúdo de GSH demonstram que a biossíntese de GSH aumentada para tentar preservar as larvas de *D. rerio* do estresse oxidativo (Wang et al., 2020). Entretanto, os sistemas antioxidantes nesses animais não conseguiram remover completamente o excesso de ERO, o que acabou ocasionando a LPO. Deste modo, o equilíbrio dinâmico entre o nível de ERO e o sistema de defesa antioxidante foi prejudicado, gerando estresse oxidativo (Wang et al., 2019).

Embora a oxidação seja essencial para muitos organismos para a produção de energia para os processos biológicos, o estresse oxidativo pode danificar as moléculas biológicas (Güven; Güven; Gülmez, 2003). O aumento da lipoperoxidação associado ao aumento do conteúdo da GSH já foi observado por Wang et al. (2020), expondo embriões de *D. rerio* a mistura do piretroide beta-cipermetrina ( $2,64 \times 10^{-6}$  a  $6,03 \times 10^{-3}$  nM) com o neonicotinoide tiaclopride ( $2,97 \times 10^{-4}$  a  $2,86 \times 10^{-5}$  nM) ao longo de 96 hpf.

É importante ressaltar que as respostas dos organismos que foram expostos aos agrotóxicos individualmente diferem das respostas observadas nos organismos

que foram expostos à mistura dos dois agrotóxicos. Enquanto individualmente o IMI apresentou mais efeitos subletais que a do LC, a mistura dos dois agrotóxicos parece apresentar uma interação sinérgica, uma vez que apenas a mistura desencadeou a ocorrência de lipoperoxidação e aumento no conteúdo de GSH. Alguns estudos anteriores utilizando a combinação binária de diferentes agrotóxicos observaram um efeito sinérgico em *D. rerio* (Wang et al., 2015; Wang et al., 2022) e *Misgurnus anguillicaudatus* (Xia et al., 2016), ou seja, os efeitos da mistura são mais amplos dos que os observados nos compostos individualmente. A identificação destas interações entre diferentes compostos em uma mistura é de extrema importância na caracterização dos riscos para as espécies não-alvo, considerando que os agrotóxicos ocorrem em misturas complexas no ambiente natural (Vieira et al., 2016; Marchand et al., 2022).

Enzimas como SOD, CAT e GPx desempenham um papel fundamental na eliminação de ERO produzidas durante a biotransformação de contaminantes (Lushchak, 2016). Apesar desse conjunto representar a primeira linha de defesa contra ERO, nenhuma dessas três enzimas apresentaram alterações significativas nessa fase de desenvolvimento de *D. rerio*. Como o presente estudo utilizou concentrações ambientalmente relevantes de LC e IMI, os resultados representam informações importantes para a compreensão da dinâmica de ação dos compostos em organismos não-alvo quando em concentrações encontradas no ambiente natural.

## 5 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram diversos efeitos dos inseticidas LC e IMI, tanto isolados como em mistura, que elucidam como os primeiros estágios de vida do peixe *D. rerio* respondem a presença desses produtos no ambiente aquático. Além disso, pudemos observar que a fase embrionária do teleosteo *D. rerio* foi sensível ao efeito desses contaminantes. Notamos que o inseticida IMI apresentou mais efeitos subletais em relação à LC, já que promoveu danos genotóxicos e diminuição da taxa de eclosão desses animais já em 72 hpf. A mistura desses inseticidas se mostrou tóxica, visto que promoveu danos oxidativos em lipídios e aumento da concentração do antioxidante não-enzimático (GSH), respostas estas que diferem das observadas na exposição isolada a esses contaminantes. Desta forma, existe uma provável interação sinérgica entre LC e IMI. 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 crônica à LC e ao IMI, tanto isolados como em mistura.

## REFERÊNCIAS – CAPÍTULO II

- Affum, A. O., Acquah, S. O., Osa, S. D., Kwaansa-Ansah, E. E., 2018. 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. *Sci. Total Environ.*, 633, 630-640. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.129>.
- Agbohessi, P. T., Imorou Toko, I., Houndji, A., Gillardin, V., Mandiki, S. N. M., Kestemont, P., 2013. Acute toxicity of agricultural pesticides to embryo-larval and juvenile African catfish *Clarias gariepinus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 64(4), 692-700. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9871-3>.
- Alvim, T. T., Martinez, C. B. R., 2019. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 842, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.011>.
- Awoyemi, O. M., Kumar, N., Schmitt, C., Subbiah, S., Crago, J., 2019. Behavioral, molecular and physiological responses of embryo-larval zebrafish exposed to types I and II pyrethroids. *Chemosphere.*, 219, 526-537. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.026>.
- Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M. J., Cazenave, J., 2014. Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. *Ecological Indicators*, 36, 532-538. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.09.016>.
- Beutler, E., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61, 882-888.
- Beutler, E., 1975. Red cell metabolism. *A manual of biochemical methods*, 11-12.
- Bianchi, J., Cabral-de-Mello, D. C., Marin-Morales, M. A., 2015. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 120, 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.040>.
- Bijlsma, L., Pitarch, E., Hernández, F., Fonseca, E., Marín, J. M., Ibáñez, M., Portolés, T., Rico, A., 2021. Ecological risk assessment of pesticides in the Mijares River (eastern Spain) impacted by citrus production using wide-scope screening and target quantitative analysis. *J. Hazard. Mater.*, 412, 125277. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125277>.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In *Free radical and antioxidant protocols* (pp. 377-387). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:377>.
- Costa, J. R. M. A., Mela, M., de Assis, H. C. D. S., Pelletier, É., Randi, M. A. F., Oliveira Ribeiro, C. A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 67(1), 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.03.013>.
- Davis, E. E., Frangakis, S., Katsanis, N., 2014. Interpreting human genetic variation with in vivo zebrafish assays. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 1842(10), 1960-1970. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.024>.

- Deanovic, L. A., Stillway, M., Hammock, B. G., Fong, S., Werner, I., 2018. Tracking pyrethroid toxicity in surface water samples: exposure dynamics and toxicity identification tools for laboratory tests with *Hyalella azteca* (Amphipoda). *Environ. Toxicol. Chem.*, 37(2), 462-472. <https://doi.org/10.1002/etc.3979>.
- DeMicco, A., Cooper, K. R., Richardson, J. R., White, L. A., 2010. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides in zebrafish embryos. *Toxicol. Sci.*, 113(1), 177-186. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp258>.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Fai, P. B. A., Kinfaek, J. S. T., Towa, Y. J. T., 2017. Acute effects of binary mixtures of Type II pyrethroids and organophosphate insecticides on *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology.*, 26(7), 889-901. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1819-y>.
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J., 2015. Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.*, 63(6), 1856-1862. <https://doi.org/10.1021/jf504895h>.
- Giddings, J. M., Wirtz, J., Campana, D., Dobbs, M., 2019. Derivation of combined species sensitivity distributions for acute toxicity of pyrethroids to aquatic animals. *Ecotoxicology.*, 28(2), 242-250. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02018-0>.
- Golin, N., Barreto, L. S., Esquivel, L., Souza, T. L., Nazário, M. G., Oliveira, A. P., Martins, C. C., Ribeiro, C. A. O., 2022. Organic and inorganic pollutants in Jordão and Iguaçu rivers southern Brazil impact early phases of *Rhamdia quelen* and represent a risk for population. *Chemosphere*, 303 (1), 134989. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134989>.
- Güven, A., Güven, A., Gülmez, M., 2003. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *J. Vet. Med. Ser. B.*, 50(8), 412-416. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00693.x>.
- Hopkins, J., Tudhope, G. R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Br. J. Haematol.*, 25(5), 563-575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1973.tb01768.x>.
- Hunt, L., Bonetto, C., Resh, V. H., Buss, D. F., Fanelli, S., Marrochi, N., Lydy, M. J., 2016. Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South America. *Sci. Total Environ.*, 547, 114-124. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.140>.
- Islam, M. A., Hossen, M. S., Sumon, K. A., Rahman, M. M., 2019. Acute toxicity of imidacloprid on the developmental stages of common carp *Cyprinus carpio*. *Toxicol. Environ. Health Sci.*, 11(3), 244-251. <https://doi.org/10.1007/s13530-019-0410-8>.
- Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*, 251(20), 6183-6188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0).
- Khan, H. A. A., Akram, W., Shad, S. A., Lee, J. J., 2013. Insecticide mixtures could enhance the toxicity of insecticides in a resistant dairy population of *Musca domestica*. *L. PloS one.*, 8(4), e60929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060929>.

- Kuder, R. S., Gundala, H. P., 2018. Developmental toxicity of deltamethrin and 3-phenoxybenzoic acid in embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Mech. Methods*, 28(6), 415-422. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1439131>.
- Kundoo, A. A., Dar, S. A., Mushtaq, M., Bashir, Z., Dar, M. S., Gul, S., Ali, M. T., Gulzar, S., 2018. Role of neonicotinoids in insect pest management: A review. *J. Entomol. Zool. Stud.*, 6(1), 333-9.
- Lu, S. C., 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.*, 30(1-2), 42-59. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>.
- Lushchak, V. I., 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.*, 42(2), 711-747. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>.
- Ma, X., Li, H., Xiong, J., Mehler, W. T., You, J., 2019. Developmental toxicity of a neonicotinoid insecticide, acetamiprid to zebrafish embryos. *J. Agric. Food Chem.*, 67(9), 2429-2436. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05373>.
- Marchand, H., Barst, B. D., Boulanger, E., Vachon, N., Houde, M., Xia, J., Liu, P., Ewald, J. D., Bayen, S., Liu, L., Head, J. A., 2022. Exposure to Contaminated River Water is Associated with Early Hatching and Dysregulation of Gene Expression in Early Life Stages of the Endangered Copper Redhorse (*Moxostoma hubbsi*) *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(8), 1950-1966. <https://doi.org/10.1002/etc.5391>.
- McCord, J. M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244(22), 6049-6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5).
- Montagner, C. C., Sodr e, F. F., Acayaba, R. D., Vidal, C., Campestrini, I., Locatelli, M. A., Pescara, I. C., Albuquerque, A. F., Umbuzeiro, G. A., Jardim, W. F., 2019. Ten years-snapshot of the occurrence of emerging contaminants in drinking, surface and ground waters and wastewaters from São Paulo State, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, 30, 614-632. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180232>.
- Niki, E., 2009. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic. Biol. Med.*, 47(5), 469-484. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>.
- OECD 2013, *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>.
- Pandey, M. R., Guo, H., 2014. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and embryotoxicity of insecticide propoxur using flounder gill (FG) cells and zebrafish embryos. *Toxicol. in Vitro.*, 28(3), 340-353. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.11.010>.
- Papadakis, E. N., Tsaboula, A., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2015. Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.*, 536, 793-802. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.099>.
- Possavatz, J., Zeilhofer, P., Pinto, A. A., Tives, A. L., Dores, E. F. G. D. C., 2014. Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Ver. Ambient. E  gua.*, 9(1), 83-96. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1263>.
- Regan, K., Ordosch, D., Glover, K. D., Tilmon, K. J., Szczepaniec, A., 2017. Effects of a pyrethroid and two neonicotinoid insecticides on population dynamics of key pests of soybean and abundance of their natural enemies. *Crop Prot.*, 98, 24-

32. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.004>.
- Rocha, A. A., Monteiro, S. H., Andrade, G. C., Vilca, F. Z., Tornisielo, V. L., 2015. Monitoring of pesticide residues in surface and subsurface waters, sediments, and fish in center-pivot irrigation areas. *J. Braz. Chem. Soc.*, 26, 2269-2278. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150215>.
- Saxena, P. N., Chauhan, L. K. S., Gupta, S. K., 2005. Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology.*, 216(2-3), 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.08.008>.
- Shen, W., Lou, B., Xu, C., Yang, G., Yu, R., Wang, X., Li, X., Wang, Q., Wang, Y., 2020. Lethal toxicity and gene expression changes in embryonic zebrafish upon exposure to individual and mixture of malathion, chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin. *Chemosphere*, 239, 124802. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124802>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- Sposito, J. C., Montagner, C. C., Casado, M., Navarro-Martín, L., Solórzano, J. C. J., Piña, B., Grisolia, A. B., 2018. Emerging contaminants in Brazilian rivers: occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere.*, 209, 696-704. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.046>.
- Torre, D. C., Liberatori, G., Ghilardi, A., Del Giacco, L., Puccini, M., Ferraro, F., Vitolo, S., Corsi, I., 2022. The zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval contact assay combined with biochemical biomarkers and swimming performance in sewage sludge and hydrochar hazard assessment. *Environ. Pollut.*, 302, 119053. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119053>.
- Van Dijk, T. C., Van Staalduinen, M. A., Van der Sluijs, J. P., 2013. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PloS one.*, 8(5), e62374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062374>.
- 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., 2016. 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*, 542 (A), 44-56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.071>.
- Velki, M., Lackmann, C., Barranco, A., Ereno Artabe, A., Rainieri, S., Hollert, H., Seiler, T. B., 2019. Pesticides diazinon and diuron increase glutathione levels and affect multixenobiotic resistance activity and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Environ. Sci. Eur.*, 31(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0186-0>.
- Wang, X., Wei, L., Wang, Y., He, B., Kong, B., Zhu, J., Jin, W., Fu, Z., 2019. Evaluation of development, locomotor behavior, oxidative stress, immune responses and apoptosis in developing zebrafish (*Danio rerio*) exposed to TBCH (tetrabromoethylcyclohexane). *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Toxicol. Pharmacol.*, 217, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.12.004>.
- Wang, Y., Chen, C., Qian, Y., Zhao, X., Wang, Q., Kong, X., 2015. Toxicity of mixtures of  $\lambda$ -cyhalothrin, imidacloprid and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 111, 242-247. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.015>.

- Wang, Y., Lv, L., Xu, C., Wang, D., Yang, G., Wang, X., Weng, H., Wang, Q., 2021. Mixture toxicity of thiophanate-methyl and fenvalerate to embryonic zebrafish (*Danio rerio*) and its underlying mechanism. *Science of the Total Environment*, 756, 143754. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143754>
- Wang, Y., Chen, C., Yang, G., Wang, X., Wang, Q., Weng, H., Zhang, Z., Qian, Y., 2022. Combined lethal toxicity, biochemical responses, and gene expression variations induced by tebuconazole, bifenthrin and their mixture in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 230, 113116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113116>.
- Wang, Y., Li, X., Yang, G., Weng, H., Wang, X., Wang, Q., 2020. Changes of enzyme activity and gene expression in embryonic zebrafish co-exposed to beta-cypermethrin and thiacloprid. *Environ. Pollut.*, 256, 113437. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113437>.
- Watson, F. L., Schmidt, H., Turman, Z. K., Hole, N., Garcia, H., Gregg, J., Tilghman, J., Fradinger, E., 2014. Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 33(6), 1337-1345. <https://doi.org/10.1002/etc.2559>.
- Wu, S., Li, X., Liu, X., Yang, G., An, X., Wang, Q., Wang, Y., 2018. Joint toxic effects of triazophos and imidacloprid on zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Pollut.*, 235, 470-481. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.120>.
- Xia, X., Xia, X., Huo, W., Dong, H., Zhang, L., Chang, Z., 2016. Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 45, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.030>.
- Zanardi, O. Z., Bordini, G. P., Franco, A. A., de Moraes, M. R., Yamamoto, P. T., 2018. Spraying pyrethroid and neonicotinoid insecticides can induce outbreaks of *Panonychus citri* (Trombidiformes: Tetranychidae) in citrus groves. *Exp. Appl. Acarol.*, 76(3), 339-354. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0316-1>.
- Zhang, Q., Zhang, Y., Du, J., Zhao, M., 2017. Environmentally relevant levels of  $\lambda$ -cyhalothrin, fenvalerate, and permethrin cause developmental toxicity and disrupt endocrine system in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Chemosphere.*, 185,1173-1180. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.091>.
- Zhang, M., Liu, W., Qu, Q., Ke, M., Zhang, Z., Zhou, Z., Lu, T., Qian, H., 2020. Metabolomic modulations in a freshwater microbial community exposed to the fungicide azoxystrobin. *J. Environ. Sci.*, 97, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.04.013>.

### CAPÍTULO III

---

**Efeitos de inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina e imidacloprido, isolados e em mistura, em diferentes tecidos de *Danio rerio*: biomarcadores bioquímicos e genéticos**

Tiago Tomiama Alvim; Claudia Buenos dos Reis Martinez

**Manuscrito a ser submetido à revista Environmental Toxicology and Pharmacology**

Guia para autores: <https://www.elsevier.com/journals/environmental-toxicology-and-pharmacology/1382-6689/guide-for-authors>

Environmental Toxicology and Pharmacology

**Efeitos de inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina e imidacloprido, isolados e em mistura, em diferentes tecidos de *Danio rerio*: biomarcadores bioquímicos e genéticos**

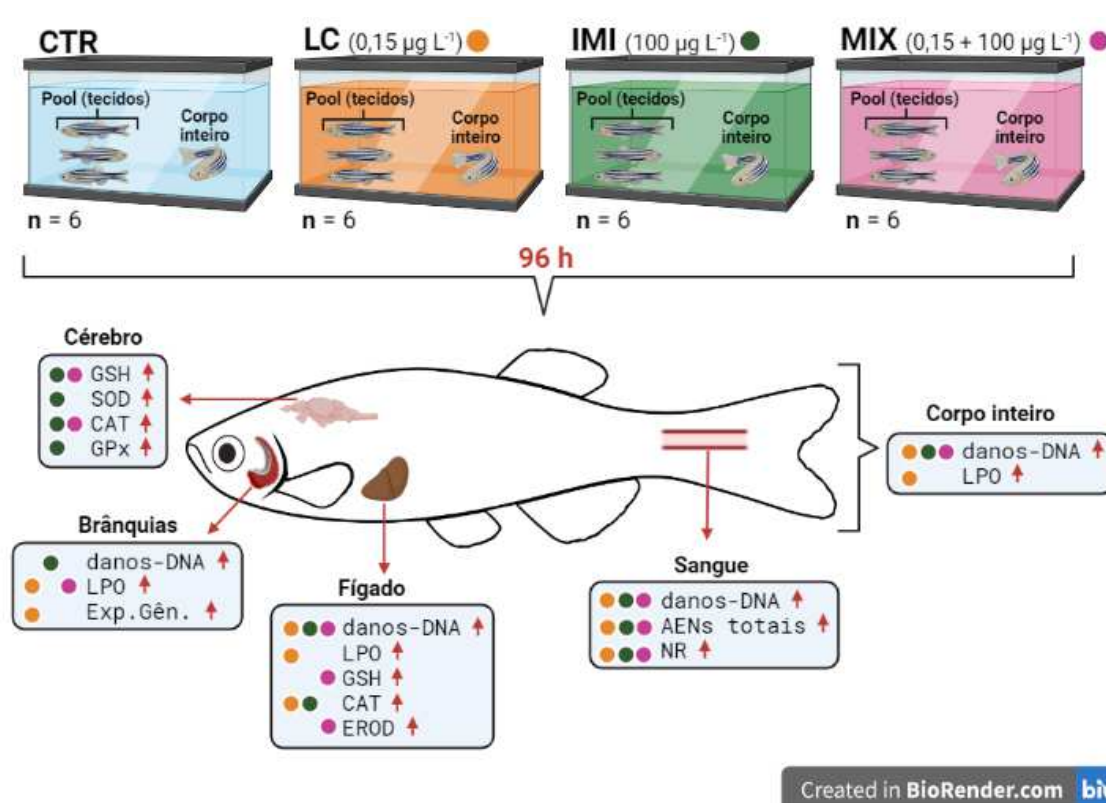
Tiago Tomiama Alvim, Claudia Bueno dos Reis Martinez\*

\*Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, Londrina, Paraná, 86057-970, Brasil.

Autor correspondente: Tel.: +55-43-33715146; E-mail: cbueno@uel.br

**DESTAQUES:**

- LC, IMI e MIX causaram danos no DNA e aumento de alterações eritrocíticas nucleares;
- LC causou lipoperoxidação e aumento da expressão gênica de *ogg1* (brânquias);
- IMI provocou alterações no sistema antioxidante, principalmente no cérebro;
- MIX induziu lipoperoxidação, alterações no sistema antioxidante e na EROD (fígado);
- O cérebro foi o único tecido que não apresentou danos no DNA e oxidativos.



## RESUMO

Para investigar os efeitos dos inseticidas  $\lambda$ -cialotrina (LC 0,15 $\mu$ g L<sup>-1</sup>) e imidacloprido (IMI 100 $\mu$ g L<sup>-1</sup>), isolados e em mistura (MIX), em diferentes tecidos de *Danio rerio*, foram avaliados biomarcadores genéticos e bioquímicos, após 96 h de exposição. LC, IMI e MIX causaram danos no DNA em diferentes tecidos e aumento de alterações eritrocíticas nucleares. LC promoveu lipoperoxidação em vários tecidos e aumentou a expressão gênica relativa de *ogg1* nas brânquias. Já o IMI ativou principalmente as defesas antioxidantes do cérebro (conteúdo de glutathiona e atividade da superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase). MIX causou lipoperoxidação nas brânquias, aumento de glutathiona, da atividade da catalase no cérebro e da fase I de biotransformação no fígado, caracterizando um possível efeito sinérgico. LC parece influenciar mais no efeito da MIX, porém ambos os inseticidas isolados e em mistura demonstraram ser prejudiciais para *D. rerio*.

**Palavras-chave:** piretroides; neonicotinoides; genotoxicidade; estresse oxidativo; biotransformação.

## 1 INTRODUÇÃO

Agrotóxicos são produtos químicos, naturais ou sintéticos que são utilizados nas culturas contra pragas ou doenças, com a intenção de garantir o rendimento da produção agrícola (Liu; et al., 2018; Merola et al., 2022). Em particular, a introdução da soja geneticamente modificada expandiu a agricultura nos países em desenvolvimento e aumentou o uso de agrotóxicos ao longo dos anos (Aca; Gonzales; Carriquiriborde, 2018). O uso descontrolado desses compostos pode ocasionar a contaminação de águas superficiais, principalmente pela deriva de pulverização. Assim, os organismos aquáticos estão expostos a uma multiplicidade de contaminantes com estrutura e toxicodinâmica diferentes (Bacchetta et al., 2014).

Dentre os agrotóxicos mundialmente utilizados estão o inseticida piretroide  $\lambda$ -cialotrina (LC) e o neonicotinoide imidacloprido (IMI), que apresentam grande importância no controle de um amplo espectro de insetos em diferentes sistemas agrícolas (Ahmed e Freed, 2019). Ambos já foram detectados em águas superficiais próximas a áreas agrícolas. O inseticida LC foi detectado em concentrações que variam de 0,02 a 50,92  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Papadakis et al., 2015; Affum et al., 2018; Rodríguez-Aguilar et al., 2022). Já o inseticida IMI foi detectado em concentrações que variam de 0,0016 a 320  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Van Dijk et al., 2013; Shukla et al., 2017).

A exposição de peixes a contaminantes presentes na água pode resultar em consequências bioquímicas subletais que incluem a produção direta de espécies reativas de oxigênio (ERO) e modificações nas defesas antioxidantes dos diferentes órgãos do animal, além do potencial de ocorrência de danos oxidativos e alterações na atividade de enzimas de biotransformação (Do Amaral et al., 2018; Vieira et al., 2018; Vieira e Martinez 2018). Além disso, a exposição a contaminantes pode causar ainda alterações genéticas, como danos no DNA e alterações na expressão gênica (Santos et al., 2018; Vieira et al., 2018; Vieira e Martinez 2018).

Alguns estudos relataram que múltiplas concentrações de LC: 0,005 a 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Vieira e Martinez, 2018) e IMI: 1,25 a 1250  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Vieira et al., 2018), causam danos no DNA em eritrócitos e estresse oxidativo em diferentes tecidos de uma espécie de peixe (*Prochilodus lineatus*), após exposição de 96 h a esses inseticidas. Os autores observaram que os órgãos mais afetados pela ação desses inseticidas foram as brânquias e o rim, alterando a maioria dos biomarcadores testados, e em contrapartida, os órgãos menos afetados foram o músculo e o cérebro. Deste modo,

diferentes órgãos de uma mesma espécie podem apresentar diferentes respostas aos contaminantes (Alvim e Martinez, 2019, Santos e Martinez, 2020). Assim, a análise de vários órgãos faz-se necessária para entender os mecanismos de resposta do organismo como um todo. Os agrotóxicos são comumente aplicados de forma combinada para aumentar a eficiência contra as pragas agrícolas. Porém, as misturas de agrotóxicos podem alterar a biodisponibilidade e a toxicidade destes no ambiente aquático. Desta forma, caracterização dos efeitos das misturas é de extrema importância para avaliar seus riscos ecológicos nos ecossistemas. Alvim e Martinez (2019), relataram que a mistura de LC ( $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e IMI ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), causou efeitos diferentes dos inseticidas isolados em *P. lineatus*, após exposição de 48 h, o que ressalta que a ocorrência de misturas de agrotóxicos pode influenciar as respostas biológicas.

Os inseticidas LC e IMI são capazes de causar alterações bioquímicas no interior da célula e induzir a ocorrência de danos no DNA e danos oxidativos. Diante disso, a utilização de biomarcadores de estresse oxidativo e de genotoxicidade é muito importante, pois, eles geralmente detectam sinais precoces de distúrbios da biota e podem demonstrar respostas integradas a misturas de contaminantes, mesmo em concentrações indetectáveis por métodos analíticos (Ghisi et al., 2014). Uma das consequências do estresse oxidativo é a formação de lesões no DNA, essas lesões podem ser reparadas por diferentes vias de reparo. Dentre elas, podemos citar a via de reparo por excisão de bases (BER), que atua principalmente no reparo sobre danos como alquilação, oxidação de bases e quebras de fitas simples (Costa et al., 2018).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi investigar a toxicidade aguda individual e conjunta de inseticidas formulados à base LC e de IMI em diferentes órgãos do teleósteo *Danio rerio* por meio de múltiplos biomarcadores. Os resultados desse estudo contribuem para compreensão dos mecanismos de ação da LC, do IMI e da mistura destes agrotóxicos. O peixe teleósteo *D. rerio* é um organismo modelo que tem sido amplamente utilizado em pesquisas no mundo todo na avaliação de efeitos de contaminantes em diferentes níveis de organização biológica e em diversas áreas de pesquisa, como, por exemplo: ecotoxicologia, genética, biologia celular e molecular, bioquímica, biotecnologia, entre outras (Velki et al., 2019; Canedo et al., 2022). Este animal tem sido muito utilizado para a avaliação de genotoxicidade devido à disponibilidade de seu genoma completo (Canedo e Rocha, 2021).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Produtos químicos

As concentrações utilizadas referem-se às concentrações nominais do ingrediente ativo nas formulações comerciais da  $\lambda$ -cialotrina (Karate Zeon® CS - 5% i.a. de  $\lambda$ -cialotrina, Syngenta S.A., Brasil) e do imidacloprido (48% i.a. – Nortox S.A. Brasil). Essas concentrações estão abaixo dos valores de  $CL_{50-96h}$  para a fase adulta de *D. rerio* para LC (Wang et al., 2007; He et al., 2008) e IMI (Gibbons; Morrissey; Mineau, 2015) e são concentrações subletais e ambientalmente relevantes (Van Dijk et al., 2013; Papadakis et al., 2015; Shukla et al., 2017; Affum et al., 2018; Rodríguez-Aguilar et al., 2022).

### 2.2 Desenho experimental

Para os testes de toxicidade, foram utilizados exemplares adultos de *D. rerio* ( $3,37 \pm 0,02$  cm;  $0,35 \pm 0,004$  g; média  $\pm$  EP, n = 384) comprados de uma piscicultura e transportados para o laboratório. Os animais foram aclimatados por, no mínimo sete dias, em aquários de 100 L, contendo água desclorada, aeração constante, filtro biológico e fotoperíodo de 14 h: 10 h (claro / escuro), com renovação de 80% da água a cada 48 h. Os peixes eram alimentados três vezes ao dia com ração comercial (Alcon Basic MEP 200 Complex) e artemias congeladas (Bio Artemia). A alimentação foi suspensa 24 h antes do início dos experimentos e durante as exposições.

Durante a aclimação e os experimentos, medidas de temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD), pH e condutividade da água foram feitas diariamente. As características físicas e químicas da água permaneceram estáveis e não foram detectadas diferenças significativas entre os aquários (T:  $26,81 \pm 0,32$  °C; pH:  $7,83 \pm 0,22$ ; OD:  $7,25 \pm 0,04$  mg L<sup>-1</sup>; condutividade:  $0,173 \pm 0,002$  mS cm<sup>-1</sup>).

Os organismos-teste foram divididos em quatro grupos de exposição: I) grupo controle (CTR), com animais expostos apenas à água desclorada; II) grupo LC, com animais expostos à água contendo  $0,15$   $\mu$ g L<sup>-1</sup> de  $\lambda$ -cialotrina; III) grupo IMI, com animais expostos à água contendo  $100$   $\mu$ g L<sup>-1</sup> de imidacloprido; IV) grupo MIX, com animais expostos à água contendo  $100$   $\mu$ g L<sup>-1</sup> de imidacloprido e  $0,15$   $\mu$ g L<sup>-1</sup> de  $\lambda$ -cialotrina durante 96 h. Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos aquários, selecionando-se preferencialmente machos. A proporção nos aquários durante os

experimentos foi de 76% machos e 24% de fêmeas distribuídos entre os grupos experimentais. Já a proporção de cada grupo experimental foi de 79% de machos e 21% de fêmeas para os grupos CTR e LC, 75% de machos e 25% de fêmeas para o grupo IMI e 71% de machos e 29% de fêmeas para o grupo MIX.

As exposições para os experimentos genéticos e bioquímicos foram realizadas em aquários de 10 L, contendo 4 animais por aquário, em sextuplicata ( $n = 6$  aquários) por grupo experimental, com renovação de 50% do meio experimental a cada 24 h. Após a exposição, os animais foram anestesiados em benzocaína ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) para a retirada do sangue pela veia caudal. Em seguida, foram mortos por secção medular para a retirada dos órgãos, que foram processados imediatamente ou armazenados a  $-75^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Para os tecidos, foram feitos pools de três animais e para as análises no corpo inteiro, foi utilizado um animal inteiro. Os experimentos genéticos e bioquímicos foram repetidos duas vezes cada um para completar todas as análises (1º experimento genético: cometa, MN e AENs; 2º experimento genético: expressão gênica; 1º experimento bioquímico: LPO, PCO, GSH, SOD, CAT e GPx; 2º experimento bioquímico: GST, EROD e AChE).

Os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 004.2020).

### 2.3 Biomarcador genotóxico

As amostras de corpo inteiro, brânquias, fígado e cérebro foram previamente dissociadas mecanicamente em soro bovino fetal (SBF), filtradas (malha de  $30 \mu\text{m}$ ) e armazenadas refrigeradas ( $4^{\circ}\text{C}$ ) até o momento da realização do ensaio. O ensaio alcalino do cometa foi realizado de acordo com Singh et al. (1988) com modificações de Alvim e Martinez (2019). Para as análises, as lâminas foram coradas com GelRed (Uniscience) e cobertas com lamínula. Foram analisados 100 nucleoides por lâmina ( $n = 6$  lâminas por grupo experimental) 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 danos 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 calculado pela fórmula:  $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$ , 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.

### 2.4 Expressão relativa do gene de reparo *ogg1*

Para análise da expressão do gene *ogg1* (8-oxoguanina DNA glicosilase) de reparo por excisão de base (BER), o RNA total de cada órgão (brânquias, fígado e cérebro) foi extraído utilizando o protocolo Trizol®, de acordo com as instruções do fabricante, com as modificações descritas em Santos et al. (2018). A concentração de RNA foi estimada em um BioDrop (Biochrom) a 260 nm. Os valores para 260/280 nm (Média  $\pm$  EP) para as brânquias foram:  $1,92 \pm 0,01$ ; para o fígado:  $2,05 \pm 0,03$ ; e para o cérebro:  $2,17 \pm 0,01$ . A síntese do cDNA de cada amostra foi realizada a partir do RNA total em Termociclador T100 (Bio-Rad) utilizando o cDNA High Capacity Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada nas seguintes condições: etapa 1 a 25 °C por 2 minutos, etapa 2 a 37 °C por 50 minutos, etapa 3 a 70 °C por 15 minutos e finalizada a 4 °C.

A qPCR foi realizada usando Platinum SYBR Green qPCR Supermix - UDG (Invitrogen - Life Technologies, EUA) ( $10 \mu\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de cada par de primers ( $20 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de água DEPC e 6  $\mu\text{L}$  de cDNA ( $250 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) de cada amostra, elevando o volume final da reação para 20  $\mu\text{L}$ . As reações de qPCR foram realizadas nas seguintes condições: 95 °C por 3 min e 45 ciclos (95 °C/ 20 s, 60 °C/ 30 s e 55 °C/ 10 s) no equipamento CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). A análise da curva de *melting* foi realizada no final de cada reação com um gradiente de temperatura que variou de 60 °C a 95 °C, com 5 s de leitura a cada 0,5 graus. As reações foram realizadas em duplicata. O software CFX Manager 3.1 (Bio-Rad) foi utilizado para acessar os dados. A qPCR avaliou o gene *ogg1* (8-oxoguanina DNA glicosilase) de reparo por excisão de base (BER) e o gene  $\beta$ -actina foi utilizado como referência. *Ogg1* primers: 5' – TCGGATTGTATTAGCCC – 3' (forward) e 5' – AAACCCAAAGATGGAGG – 3' (reverse).  $\beta$ -actina primers: 5' – CGAGCTGTCTTCCCATCCA – 3' (forward) e 5' – TCACCAACCTAGCTGTCTTTCTG – 3' (reverse). Os dados foram calculados usando

o método  $\Delta\Delta\text{CT}$  (Livak e Schmittgen, 2001).

### 2.5 Biomarcadores mutagênicos

O teste do micronúcleo (MN) foi realizado com eritrócitos dos peixes de acordo com a técnica descrita por Ueda et al. (1992). Também foi analisada a ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares (AENs) de acordo com Carrasco et al. (1990) e Canedo et al. (2021). Para as análises, as lâminas foram coradas com Laranja de Acridina (Sigma-Aldrich) a 0,003% em tampão de Sorenson ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHPO}_4$  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: a) micronúcleo (MN); b) núcleo segmentado (NS); c) núcleo lobulado (NL); e d) núcleo com constricção ou em “forma de rim” (NR), além da presença de células binucleadas (CB).

### 2.6 Biomarcadores Bioquímicos

As amostras de corpo inteiro, brânquias, fígado e cérebro de *D. rerio* foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M e pH 7,5), centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4°C) e o sobrenadante foi armazenado em ultrafreezer (-75 °C) até o momento das análises. Todas as análises bioquímicas foram realizadas por espectrofotometria e padronizadas pela concentração de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

A peroxidação lipídica foi estimada pelo ensaio TBARS, segundo Camejo; Wallin; Enojärvi (1998), com base na produção de malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica, após incubação das amostras com ácido tiobarbitúrico (ex/ em: 530/ 590 nm. Para a avaliação de danos oxidativos em proteínas (PCO), foi empregado o método descrito por Levine et al (1994). 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. 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.

A concentração de glutathiona (GSH) foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963), através da reação dos grupamentos -SH com o reagente de cor 5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzólico (DTNB), formando o tiolato (TNB) que foi quantificado em 412 nm. A atividade da superóxido-dismutase (SOD) foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido em espectrofotômetro, a 550 nm, de acordo com McCord; Fridovich (1969). A atividade da catalase (CAT) foi determinada através da velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio pela enzima (Beutler, 1975). O decréscimo de sua absorbância a 240 nm foi determinado durante 1 min. A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi estimada indiretamente através da oxidação do NADPH em presença de glutathiona redutase (GR) e o substrato glutathiona oxidada, produzida pela ação da GPx de acordo com Hopkins; Tudhope (1973). A cinética da reação foi analisada por 1 minuto em espectrofotômetro a 340 nm.

A atividade da CYP1A foi determinada por meio da atividade da Etoxiresorufina o-deetilase (EROD), estimada pela taxa de conversão da 7-Etoxiresorufina em resorufina, seguindo-se o protocolo de Eggens e Galgani (1992). O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medido a cada minuto, durante 30 minutos (ex/em: 530/590nm). A atividade da glutathiona S-transferase (GST) foi determinada pelo monitoramento da complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), de acordo com o método descrito por Keen; Habig; Jakoby (1976). O aumento de CDNB conjugado foi monitorado durante 1 minuto, em espectrofotômetro a 340 nm.

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) no corpo inteiro e cérebro foi estimada segundo o método descrito por Ellman et al. (1961) e adaptado por Costa et al. (2007), para leitura em espectrofotômetro de microplacas a 415 nm. O produto da degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE reage com o DTNB formando nitrobenzoato, que foi mensurado espectrofotometricamente a cada 3 minutos pelo tempo total de 6 minutos.

### 2.7 Análises estatísticas

Os resultados dos biomarcadores obtidos nos diferentes tratamentos, foram comparados entre si (CTR x LC x IMI x LC+IMI) por meio de testes paramétricos

(ANOVA) ou não-paramétricos (Kruskall-Wallis) pela análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), seguidos por testes de comparações múltiplas (Student-Newman-Keuls ou Dunn's) quando indicado, de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Foi utilizado o software SigmaPlot 11.0, considerando significativos valores de  $p < 0,05$ .

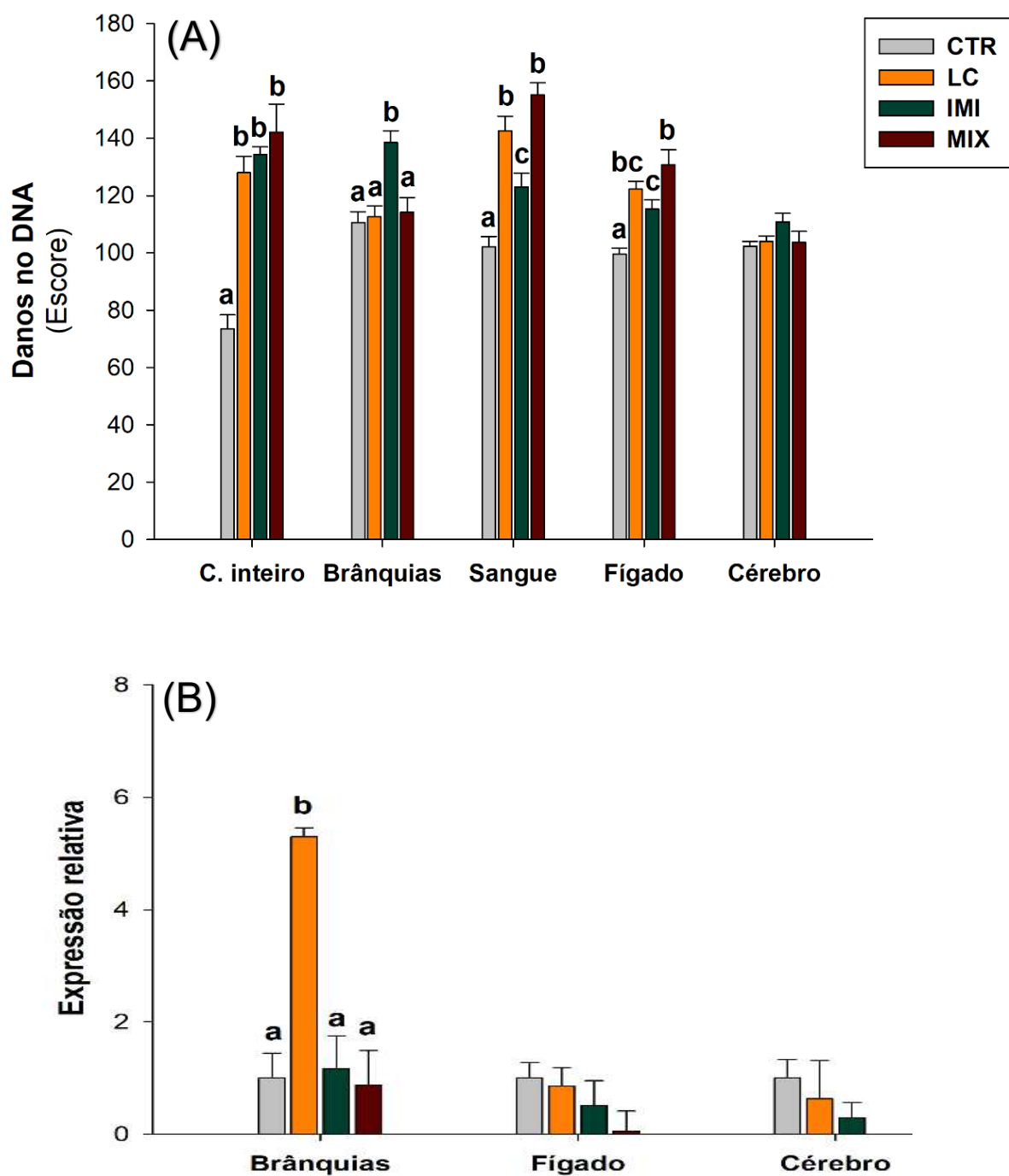
Além disso, os biomarcadores que apresentaram diferenças significativas foram analisados com uma Análise de Componentes Principais (PCA) e uma matriz de correlação foi criada para investigar as variáveis que explicaram a maior parte da variação e as correlações entre as variáveis. Usamos a função `facto_summarize` do pacote `factoextra` R para traçar uma escala de cores da contribuição de cada variável para a explicação de toda a variabilidade dos dados para a primeira (Dim1) e segunda (Dim2) componentes concomitantemente. A PCA foi realizada no ambiente R utilizando os pacotes `FactoMineR`, `factoextra` e `ggplot2`.

**3 RESULTADOS**

Em nossos resultados não observamos mortalidade nos experimentos genéticos e bioquímicos.

**3.1 Escore de danos no DNA e expressão gênica de *ogg1***

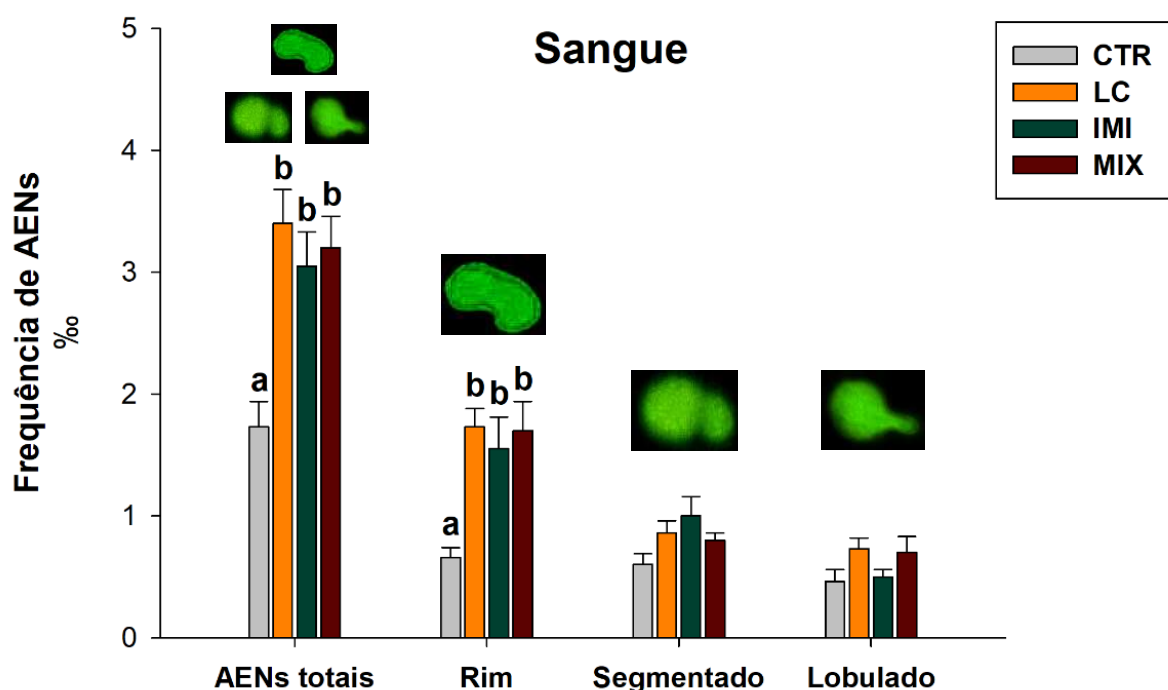
No corpo inteiro, sangue e fígado, os peixes dos grupos experimentais LC, IMI e MIX apresentaram escore de danos no DNA significativamente maiores que os animais do grupo CTR (Fig. 1A). Já nas brânquias, os animais do grupo IMI apresentaram escore de danos no DNA significativamente maior que os demais grupos experimentais (Fig. 1A). Não houve diferença significativa no escore de danos no DNA no cérebro entre os grupos experimentais (Fig. 1A). A expressão relativa de *ogg1* nas brânquias foi significativamente maior no grupo LC em comparação com os demais grupos experimentais (Fig. 1B). Nos demais tecidos não houve diferença significativa na expressão relativa de *ogg1* entre os grupos experimentais.



**Figura 1** – Escore de danos no DNA (A) no corpo inteiro, brânquias, sangue, fígado e cérebro; e expressão relativa do gene *ogg1* (B) nas brânquias, fígado e cérebro, em *Danio rerio* expostos a  $\lambda$ -cialotrina (LC: 0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI: 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 5 - 6). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

3.2 Frequência de AENs

Os animais dos grupos LC, IMI e MIX apresentaram um aumento significativo na frequência de alterações eritrocíticas nucleares totais (AENs totais) e núcleos em forma de rim (NR) com relação ao grupo CTR (Fig. 2). Não houve diferença significativa na frequência de núcleos segmentados e lobulados entre os grupos experimentais. Além disso, não foram encontrados micronúcleos e células binucleadas.

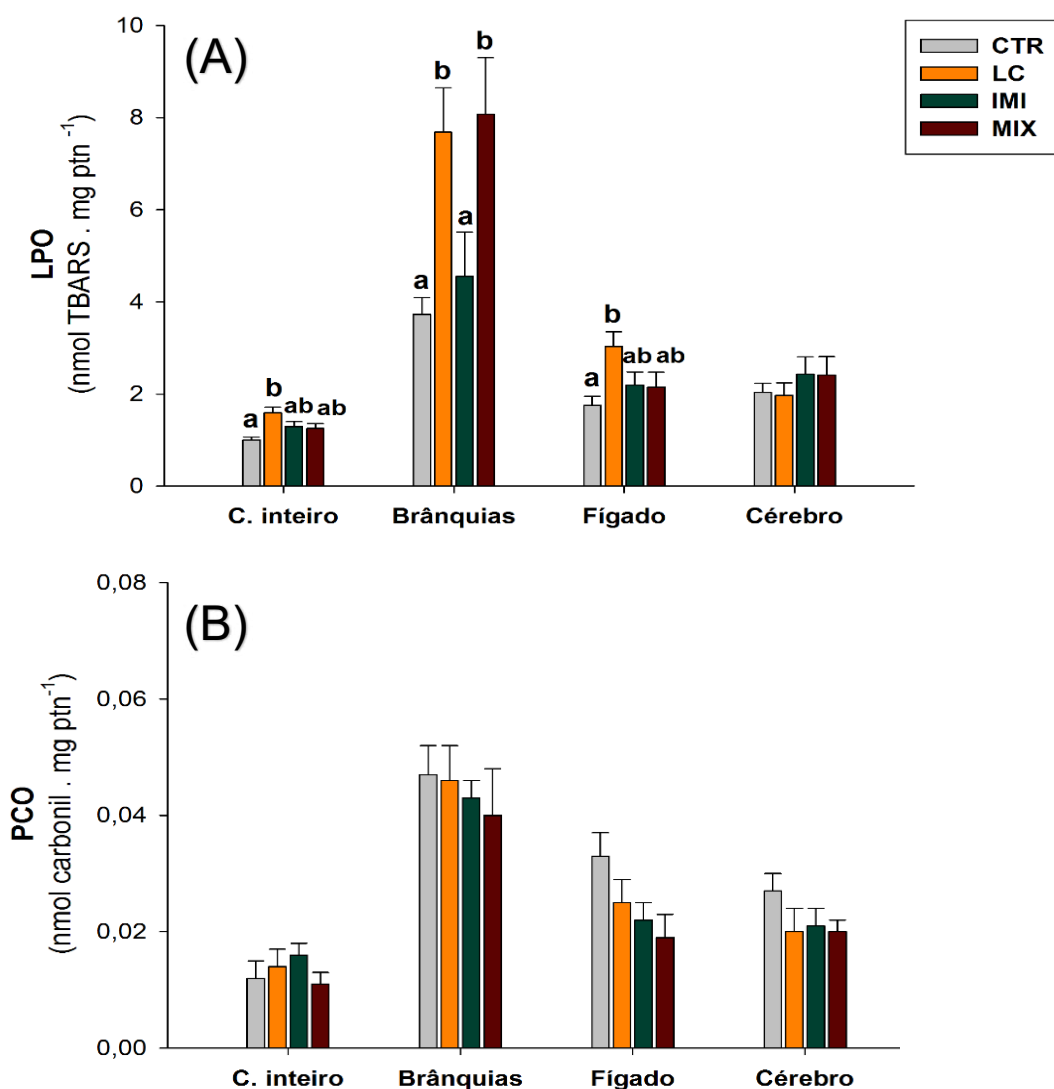


**Figura 2** –Frequência (%) de alterações eritrocíticas nucleares totais, núcleo em forma de rim, segmentado e lobulado, em *Danio rerio* expostos a  $\lambda$ -cicalotrina (LC:  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI:  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 5 - 6). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).

3.3 Danos oxidativos

No corpo inteiro e no fígado, os peixes expostos à LC apresentaram valores de lipoperoxidação (LPO) significativamente maiores em relação ao grupo CTR (Fig. 3A). Nas brânquias, os peixes expostos à LC e ao MIX apresentaram valores de lipoperoxidação significativamente maiores em relação ao grupo CTR e IMI (Fig. 3A). No cérebro, não houve diferença significativa nos valores de LPO entre os grupos experimentais (Fig. 3A).

Não houve diferença significativa nos valores de carbonilação de proteínas (PCO) entre os grupos experimentais em nenhum tecido analisado (Fig. 3B).



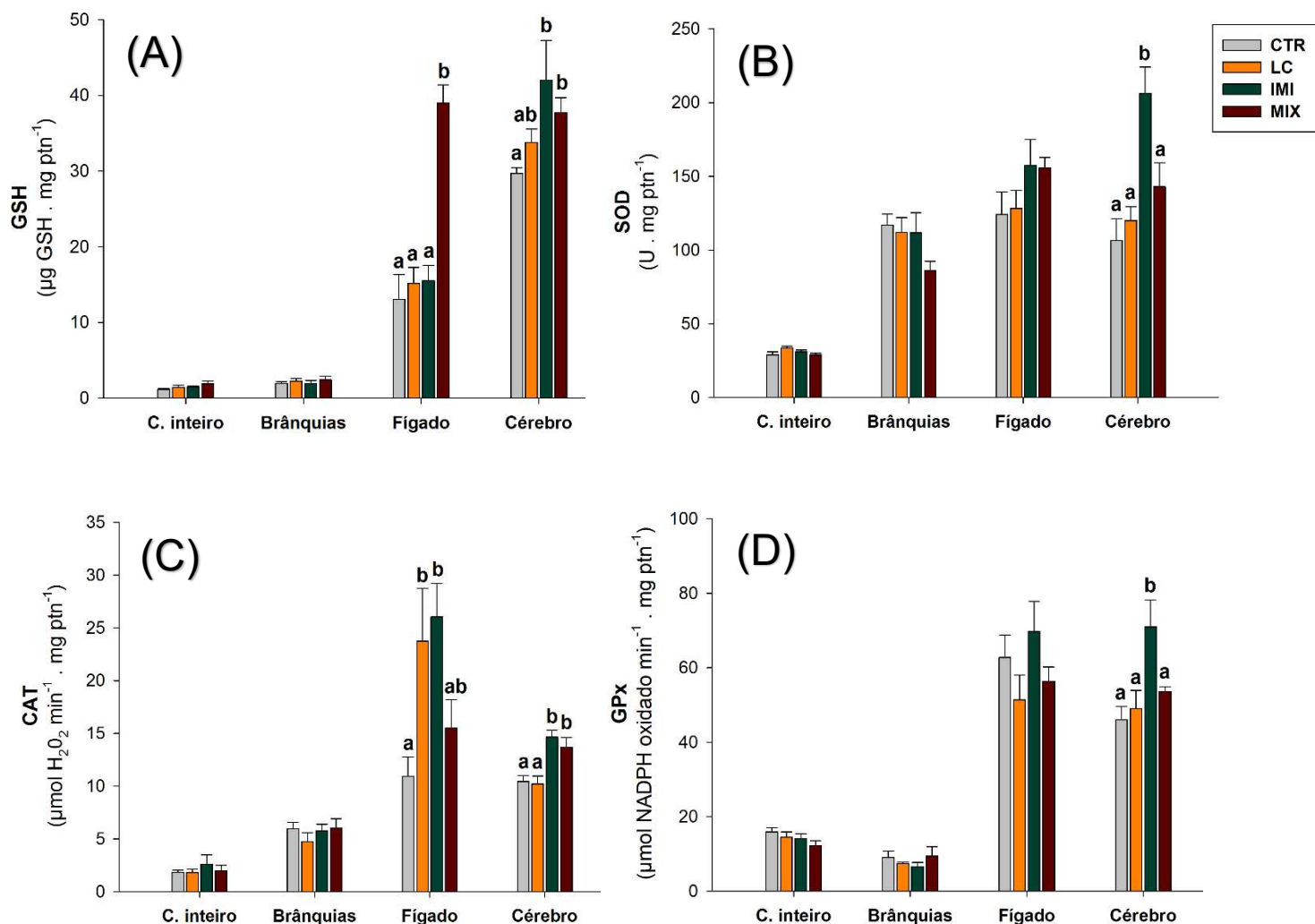
**Figura 3** – Lipoperoxidação (A) e carbonilação de proteínas (B) no corpo inteiro, brânquias, fígado e cérebro de *Danio rerio* expostos a  $\lambda$ -cialotrina (LC:  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI:  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 6). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 Defesas antioxidantes

No corpo inteiro e nas brânquias não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação a concentração de GSH (Fig. 4A) e nas atividades da SOD (Fig. 4B), CAT (Fig. 4C) e GPx (Fig. 4D).

No fígado, os peixes do grupo MIX apresentaram uma concentração de GSH significativamente maior que os animais dos demais grupos experimentais (Fig. 4A). Além disso, os peixes dos grupos LC e IMI apresentaram um aumento significativo na atividade da CAT em relação ao grupo CTR (Fig. 4C). Não houve diferença significativa nas atividades da SOD e GPx entre os grupos experimentais (Fig. 4B e 4D).

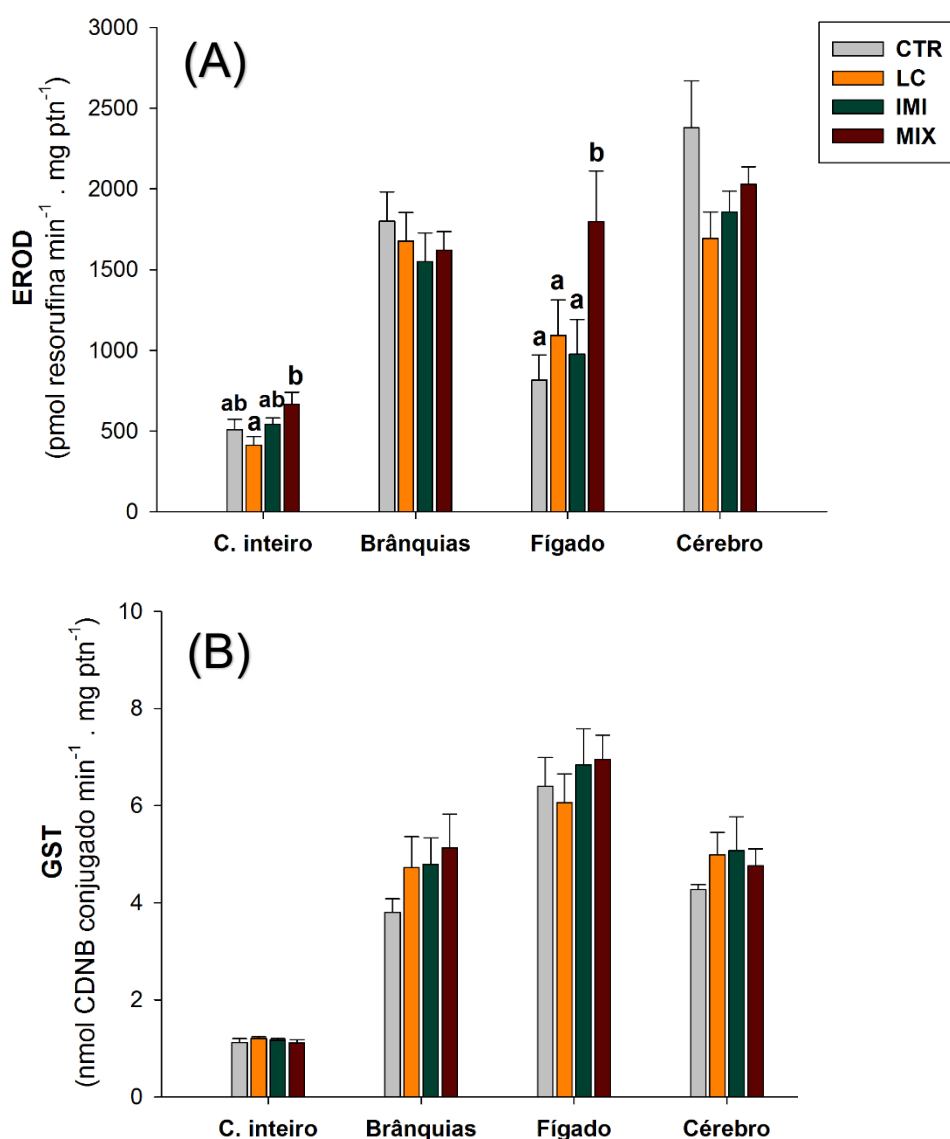
Em relação ao cérebro, os animais dos grupos IMI e MIX apresentaram um aumento significativo na concentração de GSH (Fig. 4A) e na atividade da CAT (Fig. 4C) com relação ao grupo CTR. Além disso, os peixes do grupo IMI apresentaram um aumento significativo nas atividades da SOD (Fig. 4B) e GPx (Fig. 4D), com relação aos demais grupos experimentais.



**Figura 4** – Concentração de glutatona – GSH (A); atividade das defesas antioxidantes: superóxido dismutase – SOD (B), catalase – CAT (C) e glutatona peroxidase – GPx (D) no corpo inteiro, brânquias, fígado e cérebro de *Danio rerio* expostos a  $\lambda$ -cialotrina (LC:  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI:  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 6). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).

3.5 Enzimas de biotransformação

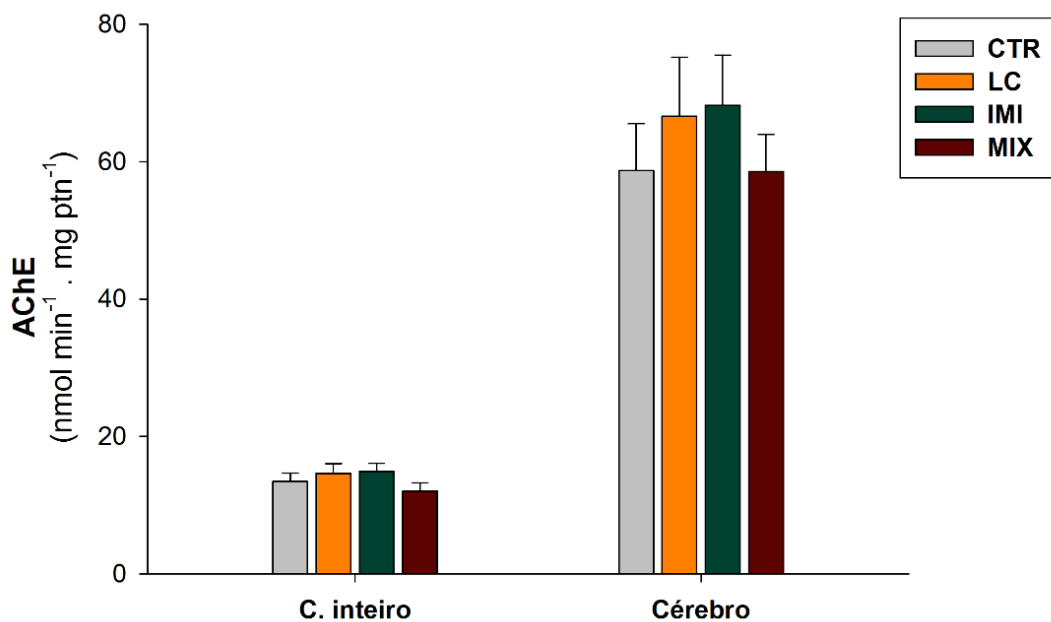
No corpo inteiro, os animais do grupo MIX apresentaram um aumento significativo da atividade da EROD em relação ao grupo LC (Fig. 5A). No fígado, os peixes do grupo MIX apresentaram um aumento significativo da atividade da EROD em relação aos demais grupos experimentais (Fig. 5A). Não houve diferença significativa na atividade da EROD entre os grupos experimentais nas brânquias e no cérebro (Fig. 5A). Além disso, não houve diferença significativa na atividade da enzima GST entre os grupos experimentais em nenhum tecido analisado (Fig. 5B).



**Figura 5** – Atividade das enzimas 7-etoxiresorufina o-deetilase – EROD (A) e glutiona s transferase – GST (B) no corpo inteiro, brânquias, fígado e cérebro de *Danio rerio* expostos a  $\lambda$ -cialotrina (LC: 0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI: 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP (n = 6).

## 3.6 Neurotoxicidade

Não houve diferença significativa na atividade da enzima AChE entre os grupos experimentais em nenhum tecido analisado (Fig. 6).

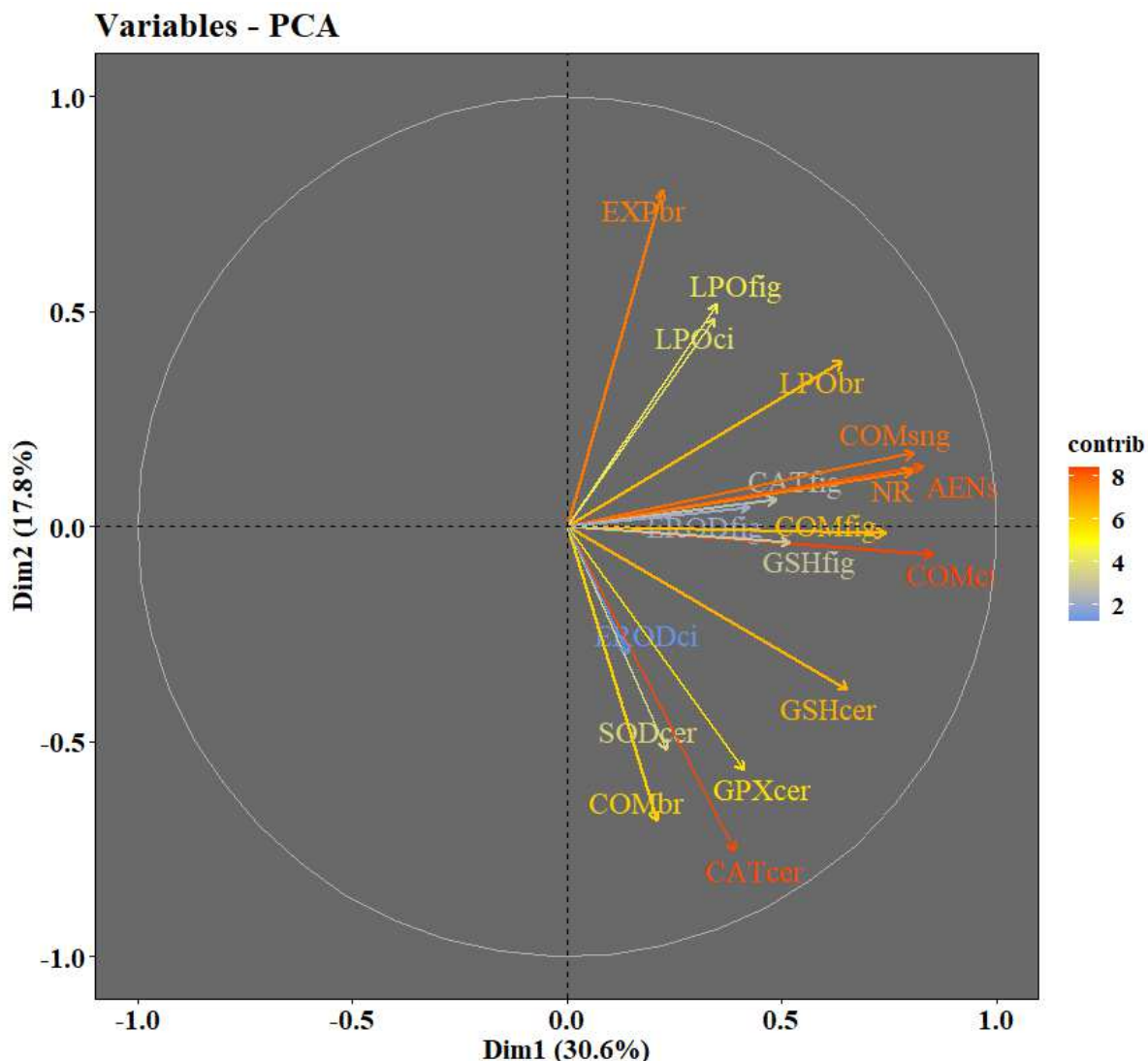


**Figura 6** – Atividade da enzima acetilcolinesterase – AChE no corpo inteiro e cérebro de *Danio rerio* expostos a  $\lambda$ -cialotrina (LC:  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI:  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP ( $n = 6$ ).

### 3.7 Análise de componentes principais (PCA)

A PCA mostrou que 48,4% da variabilidade dos dados pode ser explicada pela primeira (Dim1 = 30,6%) e segunda (Dim2 = 17,8%) componentes (Fig. 7). A primeira componente (Dim1) está fortemente associada aos biomarcadores genotóxicos e mutagênicos: COM (corpo inteiro, sangue e fígado), AENs totais e NR. Já a segunda componente (Dim2) está fortemente associada principalmente a expressão do gene de reparo *ogg1* e aos biomarcadores de estresse oxidativo: LPO (corpo inteiro e fígado), SOD (cérebro), CAT (cérebro) e GPx (cérebro).

Além disso, observamos que as variáveis COMci, COMsng, AENs e NR estão correlacionadas positivamente entre si. Assim como, LPOci vs LPOfig; e GSHcer vs GPXcer. Não foram encontradas correlações negativas entre os biomarcadores. Por fim, as variáveis que mais contribuíram para explicar a variabilidade dos dados para a Dim1 e Dim2 juntas foram: COMci (8,38%); CATcer (8,29%); e AENs (8,11%). A variável com a menor contribuição foi a ERODci (1,24%).



**Figura 7** – Análise de componentes principais (PCA) dos biomarcadores medidos no *Danio rerio* expostos a  $\lambda$ -cialotrina (LC:  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e imidacloprido (IMI:  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), isolados e em mistura (MIX), por 96 h. Os vetores representam os biomarcadores analisados que apresentaram diferenças significativas em cada tecido. Eles são apresentados pelas abreviações dos biomarcadores + abreviações dos tecidos. Biomarcadores: COM (cometa), AENs (alterações eritrocíticas nucleares totais), NR (núcleo em forma de rim), LPO (lipoperoxidação), GSH (conteúdo de glutatona), SOD (atividade da superóxido dismutase), CAT (atividade da catalase), GPX (atividade da glutatona peroxidase), EROD (7-etoxiresorufina o-deetilase). Tecidos: ci (corpo inteiro), br (brânquias), sng (sangue), fig (fígado) e cer (cérebro). As diferentes cores dos vetores estão relacionadas à contribuição de cada variável (biomarcador) para toda a variabilidade dos dados (contrib), no qual, um vetor vermelho é mais influente e um azul é menos influente.

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que inseticidas formulados à base de LC e IMI, isolados e em mistura, apresentaram toxicidade para o teleósteo *D. rerio* e as baixas concentrações utilizadas foram capazes de promover múltiplas alterações em vários biomarcadores e em diferentes tecidos do animal e até mesmo no corpo inteiro.

O potencial genotóxico do IMI foi demonstrado, pois observamos um aumento significativo no escore de danos no DNA no corpo inteiro, brânquias, sangue e fígado nos peixes do grupo IMI. Além disso, observamos um aumento na frequência de AENs totais e de núcleos em forma de rim, após a exposição ao IMI. Contaminantes que possuem radicais alquila, como é o caso do IMI, podem causar alquilação do DNA, induzindo danos no material genético (Ge et al., 2015). Além disso, o excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) gerado pela presença do xenobiótico pode causar danos às bases do material genético (cross-linking e ruptura da cadeia de DNA) e lipoperoxidação, sendo que a própria lipoperoxidação gera radicais superóxido e radicais alquila (Ge et al., 2015).

Já os animais expostos a LC apresentaram um aumento significativo no escore de danos no DNA no corpo inteiro, sangue e fígado. Assim como o IMI, a exposição a LC promoveu um aumento na frequência de AENs totais e núcleos em forma de rim. É possível que devido a hidrofobicidade dos piretroides, eles podem ter atravessado facilmente as membranas celulares e ter atingido o DNA, interagindo com o material genético por meio de sua porção ácida (Saxena; Chauhan; Gupta 2005). A ligação de piretroides com o DNA pode causar a desestabilização da estrutura do material genético e o desenrolamento da hélice do DNA, induzindo até mesmo danos cromossômicos (Saxena; Chauhan; Gupta 2005).

Em relação aos animais expostos a MIX, observamos um aumento no escore de danos no DNA no corpo inteiro, sangue e no fígado. Também observamos um aumento na frequência de AENs totais e núcleos em forma de rim, assim como visto na exposição aos inseticidas isolados. No sangue, podemos notar que a ocorrência de danos no DNA dos peixes do grupo MIX foi diferente quando comparada ao grupo IMI, mas apresentou valores similares ao grupo LC. Podemos sugerir neste caso que parte do efeito da MIX pode estar relacionado a presença da LC e que provavelmente nessa situação os contaminantes isolados não estejam interagindo entre si.

Além disso, observamos um aumento de lipoperoxidação no corpo inteiro,

brânquias e fígado nos animais expostos a LC. Notamos ainda, que a exposição a MIX causou também um aumento de lipoperoxidação nas brânquias. Como as brânquias estão em contato direto com a água, os contaminantes provavelmente são absorvidos pela superfície branquial e depois são distribuídos para outros tecidos pelo sangue. Isto torna as brânquias um órgão muito sensível a ação desses contaminantes. Além do mais, podemos sugerir que parte do efeito da MIX observado nesse tecido pode ser relacionado à LC, visto que o IMI não causou danos oxidativos.

Sabe-se que piretroides são capazes de causar estresse oxidativo em peixes, assim como os seus produtos da biotransformação (Slalinova et al., 2009). É possível que o dano ao material genético também possa ter sido afetado por outros processos bioquímicos. Desta forma, parte dos danos ao DNA observados nos diferentes tecidos de *D. rerio* podem se originar do acúmulo combinado ERO e produtos da lipoperoxidação, apoptose celular e ainda, dos efeitos diretos dos contaminantes (Ge et al., 2015).

O aumento de radicais livres além de intensificar danos ao DNA, pode até mesmo alterar a expressão gênica desses animais (Ge et al., 2015). Um dos produtos de oxidação mais comum do DNA é a lesão de base 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG), que é reparada pela via de reparo por excisão de base (BER), iniciada pela 8-oxoguanina DNA glicosilase (*ogg1*) (Wang et al., 2018). Após a exposição a LC notamos um aumento significativo na expressão relativa de *ogg1* nas brânquias, que conforme citado anteriormente, estão em contato direto com a água e os contaminantes dissolvidos. Entre os processos de reparo do DNA, o reparo de DNA por excisão de base (BER) é o principal mecanismo para reparar lesões na base do DNA e quebras de fita simples (Kienzler et al., 2013). Isto mostra que o sistema de reparo nesse tecido foi eficaz, visto que esse inseticida não promoveu um aumento no escore de danos no DNA. O sistema de reparo do DNA desempenha um papel vital na proteção contra o dano oxidativo, assim como, as enzimas antioxidantes (Shi et al., 2011).

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes. A GSH e outros peptídeos contendo tiol desempenham um papel importante na defesa celular contra a toxicidade dos contaminantes (Aoiadni et al., 2022). Além disso, enzimas como a SOD, GPx e CAT representam os principais sistemas enzimáticos de defesa antioxidante, os quais protegem as células contra a toxicidade dos radicais livres (Aoiadni et al., 2022). Em resposta ao estresse oxidativo,

os peixes podem ativar estes mecanismos de defesa, aumentando suas atividades antioxidantes para lidar com os radicais livres (Ullah et al., 2019).

Em nossos resultados, observamos que as defesas antioxidantes no corpo inteiro, brânquias e fígado não foram eficazes para evitar a lipoperoxidação promovida pela exposição a LC. Indicando que mesmo em baixas concentrações esse inseticida pode causar danos oxidativos nessa fase de desenvolvimento. Observamos essa ineficiência do sistema antioxidante novamente nas brânquias dos animais expostos a MIX, já que esse sistema foi incapaz de prevenir lipoperoxidação nesse órgão. No fígado, o aumento da GSH do grupo MIX e da atividade da CAT no grupo IMI, foram suficientes para evitar o estresse oxidativo nos animais expostos a esses grupos. Demonstrando ainda, uma possível interação sinérgica entre os inseticidas na GSH.

Dentre todos os tecidos estudados, o cérebro foi o único que não apresentou danos no DNA e danos oxidativos em proteínas e lipídios, apresentando apenas alterações no sistema antioxidante desse órgão. Isso pode ser explicado, visto que os contaminantes levam mais tempo para chegar ao cérebro do que outros tecidos, devido a presença da barreira hematoencefálica (BHE). Esses produtos serão transportados pelo sangue do trato gastrointestinal para o fígado e baço, depois para os rins e músculos e, posteriormente, para o cérebro, onde a bioacumulação é limitada devido BHE (Dang et al., 2016).

Os inseticidas piretroides e neonicotinoides possuem uma baixa penetração na BHE, porém, dependendo das concentrações utilizadas, esses contaminantes podem contribuir para potenciais impactos negativos no sistema nervoso central dos organismos não-alvo (Gupta; Agarwal; Shukla, 2000; Selvam; Srinivasam, 2019; Campbell et al., 2022). Apesar de não observarmos alterações na expressão relativa de *ogg1*, o cérebro possui uma alta 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 por exemplo (Walter et al., 2001).

Além disso, o sistema antioxidante do cérebro respondeu bem aos efeitos promovidos pelo IMI. O aumento da concentração de GSH juntamente com o aumento nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx foram suficientes para que esse inseticida não promovesse lipoperoxidação e carbonilação de proteínas nesse tecido, protegendo este órgão do estresse oxidativo. Podemos sugerir ainda que o aumento da atividade da CAT observada na MIX se deve ao efeito do IMI, já que neste tecido a LC na concentração testada não promoveu alterações significativas

no sistema antioxidante desse animal na fase de desenvolvimento analisada.

O processo de biotransformação desempenha um papel significativo nas diferenças de suscetibilidade entre as espécies. Espécies resistentes são capazes de desintoxicação, enquanto espécies mais suscetíveis tendem a biotransformar os compostos originais em produtos intermediários mais reativos que podem ser mais tóxicos (Schlenk, 2005). Em nossos resultados, observamos um aumento na atividade da EROD, que traduz a atividade das enzimas de fase I da biotransformação, no fígado dos animais expostos a MIX em relação aos demais grupos experimentais, indicando uma possível interação sinérgica entre os inseticidas. O fígado é o principal órgão de biotransformação, embora atividades extra-hepáticas também podem ser observadas em outros tecidos, como rins, intestino e brânquias de peixes (Schlenk, 2005). Na mistura de inseticidas neonicotinoides com piretroides, os ingredientes ativos de ambas as classes químicas podem se complementar (Moradi et al., 2019). Isso significa que a ação secundária de um produto pode estar interferindo na ação de outro contaminante, aumentando assim, o efeito da mistura (Jia et al., 2009). Já a atividade da GST não se alterou significativamente durante a exposição de 96 h. Uma possível explicação para esse fenômeno é que os produtos convertidos da fase I de biotransformação não conseguiram atingir níveis adequados para ativar a GST (Ge et al., 2015), ou não passam por esta via de conjugação.

Os inseticidas LC e IMI são neurotóxicos, pois afetam o sistema nervoso dos organismos-alvo (Burr; Ray, 2004; Gibbons; Morrissey; Mineau, 2015). Entretanto, para *D. rerio* não observamos alterações na atividade da AChE no corpo inteiro e no cérebro nas concentrações testadas. Entretanto, alguns autores já observaram que piretroides e neonicotinoides promovem alterações na atividade dessa enzima em peixes. Topal et al. (2017), após expor a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) por 21 dias ao imidacloprido nas concentrações de 5, 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>, observaram que esse inseticida causa a inibição da atividade da AChE nas concentrações de 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>. Porém, as concentrações utilizadas pelos autores são bem mais elevadas do que as concentrações utilizadas no presente estudo, que visa manter concentrações ecologicamente relevantes. Já Vieira e Martinez (2018), observaram que diferentes concentrações de LC (0,005 a 0,5 µg L<sup>-1</sup>), causam inibição da atividade da AChE em *Prochilodus lineatus*, após 96 h de exposição. Assim, é possível que o *D. rerio* seja mais tolerante que *P. lineatus*, e por isso não observamos efeitos na atividade da AChE ao expor esses animais a LC.

A integração de todos os biomarcadores na PCA demonstrou que a primeira componente (Dim1 – 30,6%) está mais relacionada aos biomarcadores genotóxicos e mutagênicos, que estão significativamente correlacionadas entre si. Isto indica o quanto esses métodos foram sensíveis à exposição desses contaminantes, demonstrando que são importantes ferramentas a serem utilizadas para estudos com múltiplos biomarcadores.

Já a segunda componente (Dim1 – 17,8%) está mais relacionada à expressão gênica do gene *ogg1* e aos biomarcadores de estresse oxidativo. Esses resultados indicam o quanto o sistema de reparo do DNA e as defesas antioxidantes são importantes para esse organismo, representando uma importante resposta antioxidante para o teleósteo *D. rerio*.

**5 CONCLUSÃO**

Nossos resultados mostram claramente que os inseticidas isolados e em mistura, mesmo em baixas concentrações, são capazes de promover alterações em biomarcadores genotóxicos e bioquímicos em diferentes tecidos e no corpo inteiro, após 96 h de exposição. Em algumas situações a LC parece influenciar mais no efeito da mistura (Danos no DNA em eritrócitos e LPO em brânquias). Já o IMI parece influenciar no efeito da mistura apenas na CAT do cérebro. Além disso, observamos uma possível interação sinérgica entre os inseticidas na atividade da EROD e no conteúdo de GSH no fígado. A PCA indicou que os biomarcadores que mais contribuíram para a variabilidade dos dados foram os relacionados aos danos no DNA e ao sistema antioxidante. O cérebro foi o único órgão que não sofreu danos no DNA e nem danos oxidativos, provavelmente devido a presença da BHE e do sistema antioxidante eficaz. Isso indica que cada órgão responde diferente devido as suas funções e características. Como os inseticidas estudados são constantemente utilizados na agricultura é provável que suas concentrações em águas superficiais aumentem ao longo dos anos, tornando-se prejudiciais aos peixes tanto na forma isolada quanto em mistura, o que destaca a necessidade de mais estudos para determinar seus níveis seguros para o ecossistema aquático.

## REFERÊNCIAS – CAPÍTULO III

- Aca, L. V., Gonzalez, P. V., Carriquiriborde, P., 2018. Lethal and sublethal responses in the fish, *Odontesthes bonariensis*, exposed to chlorpyrifos alone or under mixtures with endosulfán and lambda-cyhalothrin. *Ecotoxicol.*, 27(7),968-979. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1941-5>.
- Affum, A. O., Acquah, S. O., Osa, S. D., Kwaansa-Ansah, E. E., 2018. 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. *Sci. Total Environ.*, 633, 630-640. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.129>.
- Ahmed, R., Freed, S., 2021. Biochemical resistance mechanisms against chlorpyrifos, imidacloprid and lambda-cyhalothrin in *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). *Crop Prot.*, 143, 105568. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105568>.
- Alvim, T. T., Martinez, C. B. R., 2019. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 842, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.011>.
- Aoiadni, N., Chiab, N., Jdidi, H., Gargouri Bouzid, R., El Feki, A., Fetoui, H., Ghorbel Koubaa, F., 2022. The pyrethroid insecticide permethrin confers hepatotoxicity through DNA damage and mitochondria-associated apoptosis induction in rat: Palliative benefits of *Fumaria officinalis*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 36 (10), e23172. <https://doi.org/10.1002/jbt.23172>.
- Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M. J., Cazenave, J., 2014. Combined toxicological effects of pesticides: a fish multi-biomarker approach. *Ecological Indicators*, 36, 532-538. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.09.016>.
- Beutler, E., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61, 882-888.
- Beutler, E., 1975. Red cell metabolism. *A manual of biochemical methods*, 11-12.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Burr, S. A., Ray, D. E., 2004. Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicol. Sci.*, 77(2), 341-346. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh027>.
- Canedo, A., Rocha, T. L., 2021. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. *Sci. Total Environ.*, 762, 144084. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144084>.
- Canedo, A., Saiki, P., Santos, A. L., Carneiro, K. D. S., Souza, A. M. D., Qualhato, G., Brito, R. S., Mello-Andrade, F., Rocha, T. L., 2022. Zebrafish (*Danio rerio*) meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research. *Ciência Animal Brasileira*, 23. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-70884>.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In *Free radical and antioxidant protocols* (pp. 377-387). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:377>.
- Campbell, K. S., Keller, P. G., Heinzl, L. M., Golovko, S. A., Seeger, D. R., Golovko, M. Y., Kerby, J. L., 2022. Detection of imidacloprid and metabolites in Northern

- Leopard frog (*Rana pipiens*) brains. *Sci. Total Environ.*, 813, 152424. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152424>.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., Myers, M. S., 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat.*, 47(11), 2123-2136. <https://doi.org/10.1139/f90-237>.
- Costa, J. R. M. A., Mela, M., de Assis, H. C. D. S., Pelletier, É., Randi, M. A. F., Oliveira Ribeiro, C. A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 67 (1), 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.03.013>.
- Costa, S. R., Velasques, R. R., Rovani, M. T., Souza, M. M., Sandrini, J. Z., 2018. Comparison of the base excision repair activity in liver cell models of zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 15(2),107-111. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1507>.
- Dang, V. D., Kroll, K. J., Supowit, S. D., Halden, R. U., Denslow, N. D., 2016. Tissue distribution of organochlorine pesticides in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from laboratory exposure and a contaminated lake. *Environ. Pollut.*, 216, 877-883. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.061>.
- Do Amaral, A. M. B., Gomes, J. D. L. C., Weimer, G. H., Marins, A. T., Loro, V. L., Zanella, R., 2018. Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir. *Chemosphere*, 191,876-885. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.114>.
- Eggens, M. L., Galgani, F., 1992. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. *Mar. Environ. Res.*, 33 (3), 213-221. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(92\)90149-G](https://doi.org/10.1016/0141-1136(92)90149-G).
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J., 2015. Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.*, 63(6), 1856-1862. <https://doi.org/10.1021/jf504895h>.
- Ghisi, N. D. C., de Oliveira, E. C., Fávoro, L. F., Silva de Assis, H. C., Prioli, A. J., 2014. In situ assessment of a neotropical fish to evaluate pollution in a river receiving agricultural and urban wastewater. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 93(6),699-709. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1403-6>.
- Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P., 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22(1), 103-118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>.
- Gupta, A., Agarwal, A. K., Shukla, G. S., 2000. Effect of quinalphos and Cypermethrin exposure on developing blood-brain barrier: role of nitric oxide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 8(2), 73-78. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(99\)00034-4](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(99)00034-4).
- He, L. M., Troiano, J., Wang, A., Goh, K., 2008. Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of lambda-cyhalothrin. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 71-91. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-77030-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-77030-7_3).
- Hopkins, J., Tudhope, G. R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Br. J. Haematol.*, 25(5), 563-575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1973.tb01768.x>.
- Jia, J., Zhu, F., Ma, X., Cao, Z. W., Li, Y. X., Chen, Y. Z., 2009. Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nat. Rev. Drug*

- Discov., 8(2), 111-128. <https://doi.org/10.1038/nrd2683>.
- Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*, 251 (20), 6183-6188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0).
- Kienzler, A., Bony, S., Tronchère, X., Devaux, A., 2013. Assessment of base-excision repair activity in fish cell lines: toward a new biomarker of exposure to environmental contaminants?. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 753(2), 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.03.004>.
- Kienzler, A., Bony, S., Devaux, A., 2013. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: a review. *Aquat. Toxicol.*, 134, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.005>.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 233, pp. 346-357). Academic press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).
- Liu, Y., Zhang, H., He, F., Li, X., Tan, H., Zeng, D., 2018. Combined toxicity of chlorantraniliprole, lambda-cyhalothrin, and imidacloprid to the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25(23), 22598-22605. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2374-7>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using 18 real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- McCord, J. M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244(22), 6049-6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5).
- Merola, C., Fabrello, J., Matozzo, V., Faggio, C., Iannetta, A., Tinelli, A., Crescenzo, G., Amorena, M., Perugini, M., 2022. Dinitroaniline herbicide pendimethalin affects development and induces biochemical and histological alterations in zebrafish early-life stages. *Sci. Total Environ.*, 828, 154414. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154414>.
- Moradi, F. G., Hejazi, M. J., Hamishehkar, H., Enayati, A. A., 2019. Co-encapsulation of imidacloprid and lambda-cyhalothrin using biocompatible nanocarriers: characterization and application. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 175, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.092>.
- Papadakis, E. N., Tسابoula, A., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2015. Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.*, 536, 793-802. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.099>.
- Santos, C., Martinez, C. B. R., 2020. Biotransformation in the fish *Prochilodus lineatus*: an organ-specific approach to cyp1a gene expression and biochemical activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 80, 103467. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103467>.
- Santos, C., de Oliveira, M. T., de Syllos Cólus, I. M., Sofia, S. H., Martinez, C. B. R., 2018. Expression of cyp1a induced by benzo (A) pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 61, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.05.008>.
- Saxena, P. N., Chauhan, L. K. S., Gupta, S. K., 2005. Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*:

- spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology.*, 216(2-3),244-252. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.08.008>.
- Schlenk, D., 2005. Pesticide biotransformation in fish. In *Biochemistry and molecular biology of fishes* (Vol. 6, pp. 171-190). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(05\)80009-8](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(05)80009-8).
- Selvam, V., Srinivasan, S., 2019. Neonicotinoid poisoning and management. *Indian J. Crit. Care Med.: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 23(Suppl 4), S260. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-23308>.
- Shi, X., Gu, A., Ji, G., Li, Y., Di, J., Jin, J., Hu, F., Long, Y., Xia, Y., Lu, C., Song, L., Wang, S., Wang, X., 2011. Developmental toxicity of cypermethrin in embryolarval stages of zebrafish. *Chemosphere*, 85(6), 1010-1016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.024>.
- Shukla, S., Jhamtani, R. C., Dahiya, M. S., & Agarwal, R., 2017. Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. *Toxicol. Rep.*, 4, 240-244. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.05.002>.
- Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodova, Z., 2009. REVIEWS Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 30(1), 2. PMID: 20027135.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- Topal, A., Alak, G., Ozkaraca, M., Yeltekin, A. C., Comaklı, S., Acil, G., Kokturk, M., Atamanalp, M., 2017. 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*, 175,186-191. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.047>.
- Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., Sofuni, T., 1992. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Sci. Technol.*, 25(11), 235-240. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0297>.
- Ullah, S., Li, Z., Zuberi, A., Arifeen, M. Z. U., Baig, M. M. F. A., 2019. Biomarkers of pyrethroid toxicity in fish. *Environ. Chem. Lett.*, 17(2), 945-973. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-00852-y>.
- Van Dijk, T. C., Van Staalduinen, M. A., Van der Sluijs, J. P., 2013. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PloS one.*, 8(5), e62374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062374>.
- Velki, M., Lackmann, C., Barranco, A., Ereno Artabe, A., Rainieri, S., Hollert, H., Seiler, T. B., 2019. Pesticides diazinon and diuron increase glutathione levels and affect multixenobiotic resistance activity and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Environ. Sci. Eur.*, 31(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0186-0>.
- Vieira, C. E. D., Martinez, C. B. R., 2018. The pyrethroid  $\lambda$ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 210, 958-967. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.115>.
- Vieira, C. E. D., Pérez, M. R., Acayaba, R. D. A., Raimundo, C. C. M., Martinez, C. B.

- R., 2018. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 195,125-134. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.077>.
- Walter, R. B., Sung, H. M., Obermoeller, R. D., Mitchell, D. L., Intano, G. W., Walter, C. A., 2001. Relative base excision repair in Xiphophorus fish tissue extracts. *Mar. Biotechnol.*, 3(1), S50-S60. <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0027-0>.
- Wang, R., Li, C., Qiao, P., Xue, Y., Zheng, X., Chen, H., Zeng, X., Liu, W., Boldogh, I., Ba, X., 2018. OGG1-initiated base excision repair exacerbates oxidative stress-induced parthanatos. *Cell Death Dis.*, 9(6), 628. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0680-0>.
- Wang, W., Cai, D. J., Shan, Z. J., Chen, W. L., Poletika, N., Gao, X. W., 2007. Comparison of the acute toxicity for gamma-cyhalothrin and lambda-cyhalothrin to zebra fish and shrimp. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 47(2), 184-188. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.09.002>.

## CAPÍTULO IV

**CONCLUSÕES GERAIS**

O presente trabalho fornece informações relevantes sobre os efeitos dos inseticidas formulados à base de  $\lambda$ -cialotrina (LC) e imidacloprido (IMI), isolados e em mistura (MIX), nas fases embriolarval e adulta de *Danio rerio*, após 96 h de exposição. Em cada artigo, os resultados foram discutidos de forma individual para cada fase do desenvolvimento e a integração destes permite as seguintes conclusões:

1) Na fase embriolarval, os inseticidas formulados LC e IMI, isolados e em mistura, causaram aumento na taxa de mortalidade de embriões. Em contrapartida, esses contaminantes não promoveram mortalidade na fase adulta. Indicando que a fase embriolarval pode ser mais sensível que a fase adulta. Não confirmando a primeira hipótese. Além disso, a exposição a esses inseticidas promoveu diminuição na taxa de eclosão de larvas. Esses resultados indicam que esses contaminantes em concentrações ecologicamente relevantes podem afetar o desenvolvimento do teleósteo *D. rerio*. Confirmando assim, a nossa segunda hipótese.

2) A MIX em algumas situações na fase embriolarval (LPO e GSH) e adulta (GSH e EROD no fígado) demonstrou possíveis interações sinérgicas entre os inseticidas, o que confirma em parte na nossa terceira hipótese.

3) Na fase embriolarval, os danos genotóxicos não estão correlacionados com os danos oxidativos. Na fase adulta, podemos sugerir que parte dos danos no DNA observados no corpo inteiro e fígado podem ter sido causados pelas ERO, já que nessas situações observamos aumento de lipoperoxidação nos animais expostos a LC. Esses resultados corroboram em parte com nossa quarta hipótese.

4) A quinta e sexta hipóteses não foram confirmadas, a ação desses inseticidas não afetou negativamente as defesas antioxidantes e o sistema de reparo das fases embriolarval e adulta, pelo contrário, em algumas situações foram ativadas. Do mesmo modo, esses produtos não chegaram a inibir a atividade das enzimas de biotransformação nem da acetilcolinesterase nas concentrações testadas.

5) Na fase embriolarval, a LC não promoveu danos no DNA e LPO. Entretanto, na

fase adulta, esse inseticida causou danos no DNA (corpo inteiro, sangue e fígado) e LPO (corpo inteiro, brânquias e fígado). Esses resultados indicam que a fase adulta parece ser mais sensível a ação da LC em relação a fase embrionária. Em relação ao IMI, as larvas expostas a esse inseticida apresentaram aumento no escore de danos no DNA, assim como nos adultos (corpo inteiro, brânquias, sangue e fígado), entretanto, não observamos LPO em larvas e adultos, indicando que o IMI na concentração testada parece não causar danos oxidativos. Por fim, as larvas expostas a MIX não apresentaram danos no DNA, mas apresentaram LPO. Nos adultos, a MIX promoveu danos no DNA (corpo inteiro, sangue e fígado) e LPO nas brânquias)

6) Na fase embrionária, o IMI parece influenciar no efeito da MIX na taxa de eclosão em 72 hpf. Nos adultos, o IMI parece influenciar no efeito da MIX na atividade da CAT (cérebro). Em relação a LC, esse inseticida parece influenciar no efeito da MIX nos danos no DNA (fígado) e LPO (brânquias).

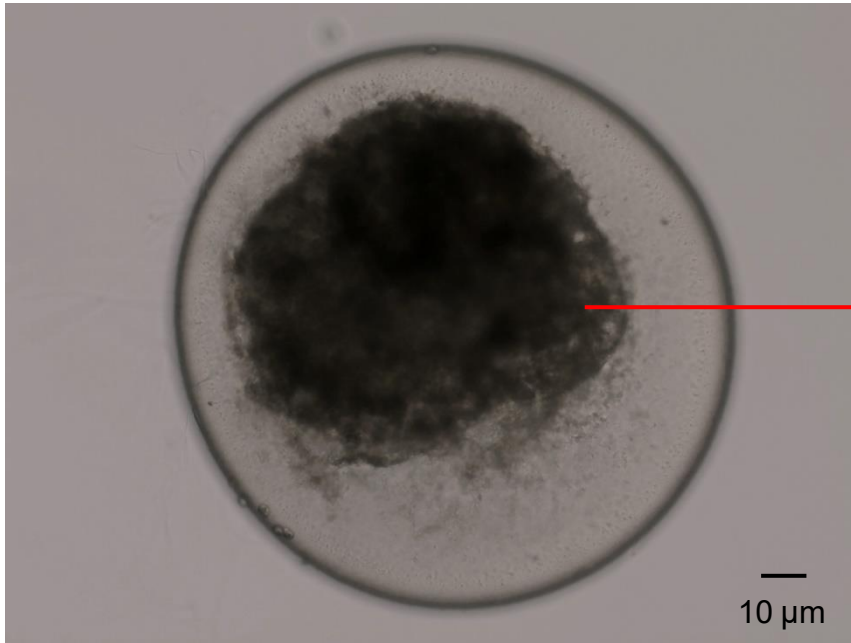
7) O cérebro foi o único órgão que não apresentou danos no DNA e danos oxidativos em lipídios e proteínas, provavelmente devido à presença da BHE que impede que os contaminantes cheguem facilmente nesse órgão. Além disso, o sistema antioxidante deste órgão demonstrou ser eficaz, evitando danos oxidativos nesse tecido.

8) A PCA aplicada nos resultados com os adultos demonstrou que os biomarcadores que mais contribuíram para a variabilidade dos dados foram: danos no DNA, AENs totais e CAT. Esses métodos foram sensíveis, demonstrando que são importantes ferramentas a serem utilizadas em testes agudos, podendo contribuir para o monitoramento de áreas contaminadas por inseticidas.

9) Os resultados em conjunto, demonstraram que ambos os inseticidas, isolados e em mistura e em concentrações ecologicamente relevantes, promovem efeitos deletérios em diferentes fases de desenvolvimento de *D. rerio*. O IMI parece promover mais efeitos subletais na fase embrionária do *D. rerio*, enquanto a LC apresenta mais efeitos subletais na fase adulta. A mistura de ambos os inseticidas causou diversos efeitos subletais para as duas fases de desenvolvimento, muitas vezes alterando biomarcadores que os inseticidas isolados não alteraram.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Imagens da fase embriolarval



→ Embrião coagulado  
(24 hpf)



→ Somitos (48 hpf)



Cauda descolada  
(48 hpf)



Larva eclodida (72 hpf)



Larva eclodida (96 hpf)

**APÊNDICE B – Classes de danos no DNA**



**APÊNDICE C – Alterações eritrocíticas nucleares**

