



Resultado de Pesquisa

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
GENOTÓXICO DO INSETICIDA FIPRONIL
SOBRE O PEIXE NEOTROPICAL
AMAZÔNICO TAMBAQUI (*Colossoma
macropomum*)

Raylander Nascimento Teles, UFNT,

Raylander.teles@uft.edu.br

Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino, UFNT,

biotuk@gmail.com



I. Apresentação e Justificativa

O Brasil é uma das grandes potências agrícolas do mundo, destacando-se por ser um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas do planeta (IBAMA, 2016; ZHANG, 2018). Os pesticidas são compostos químicos, físicos e biológicos aplicados na produção agrícola para o controle de organismos tidos como pragas (CASSAL et al., 2014), tais produtos são separados em classes dependendo do organismo alvo de seus princípios ativos (MARIANO et al., 2015). O uso indiscriminado de pesticidas em monoculturas brasileiras acarreta sérios problemas ambientais, dos quais, na maioria das vezes, são irreversíveis (SILVA, 2015).

Os organismos bioindicadores permitem relacionar os danos provocados por determinados fatores antrópicos ao ambiente natural. Na ecotoxicologia aquática, os peixes são considerados excelentes bioindicadores, pois estes apresentam sensibilidade a pequenas mudanças no habitat (NOGUEIRA; CASTRO; SÁ, 2008). Essa sensibilidade é observada por meio de técnicas consideradas biomarcadores, que permitem verificar alterações em parâmetros hematológicos, fisiológicos, estruturais em órgãos, tecidos e até mesmo comportamentais (CLEMZ, 2002, NOGUEIRA; CASTRO; SÁ, 2008).

O Fipronil [5-amino-1-(2,6-dicloro-R, R,-trifluoropropil)-4-(trifluorometil) sulfinil] pirazole-3-carbonitrilo] é um inseticida e acaricida pertencente à família dos fenilpirazóis e sua aplicação se dá principalmente via pulverização. A introdução deste composto no ambiente aquático, mesmo que em pequenas concentrações, acarreta a exposição de peixes e demais organismos. No caso da contaminação de peixes pelo fipronil, a exposição pode acontecer pela alimentação, contato dérmico ou por processos respiratórios, causando efeitos subletais como inibição do crescimento e desregulação endócrina, somado a redução do comportamento de natação e a inibição da atividade da AChE, o que demonstra sinais de neurotoxicidade (LI; YOU; WANG, 2018).

Neste sentido, este composto pode chegar a corrente sanguínea em função da alta vascularização e área de contato do tecido branquial, facilitado pelo



contato direto com a água (MORON et. al, 2020), podendo apresentar riscos a depender da capacidade clastogênica e aneugênica desta molécula.

Portanto, avaliar o potencial genotóxico do inseticida Fipronil ao peixe neotropical amazônico é de extrema importância para determinar os reais riscos que este inseticida pode causar no ambiente natural e as reservas naturais de organismo desta espécie. Este estudo busca descrever os possíveis danos que a contaminação de corpos hídricos pelo fipronil mesmo que em concentrações não letais causam ao tambaqui, através da análise de biomarcadores de genotoxicidade.

II. Objetivos

Objetivo Geral

- Avaliar o potencial citogenotóxico do inseticida fipronil em eritrócitos de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Objetivos específicos:

- Verificar a ocorrência de micronúcleos em eritrócitos de tambaqui após exposição aguda a diferentes concentrações de fipronil.
- Verificar a ocorrência de anormalidades nucleares (ANEs) em eritrócitos de tambaqui após exposição aguda sobre diferentes concentrações.

III. Metodologia

Aquisição dos animais e do contaminante

Exemplares de tambaqui (n=30, comprimento total $22,2 \pm 0,7$ cm e massa corporal = $201,6 \pm 18,2$ g) foram adquiridos no setor de piscicultura do Instituto Federal do Tocantins – Campus Araguaatins – TO. Os organismos foram transportados até o Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais, da Universidade Federal do Norte do Tocantins, Campus EMVZ em Araguaína, e aclimatados durante 30 dias em tanques de 3000 L com água, mantidos em fotoperíodo natural, temperatura controlada em $\pm 26^\circ\text{C}$, e parâmetros



físico-químicos (pH $6,5 \pm 0,5$, OD $6,2 \pm 2,3$) controlados, constante aeração artificial e alimentação diária com ração comercial com 40% de proteína.

O inseticida fipronil foi utilizado na formulação do Regente 800 WG®, adquirido comercialmente em loja agropecuária da cidade de Araguaína – TO.

Delineamento experimental e coleta de amostra

Os bioensaios ocorreram com o total de 30 animais, divididos em três grupos (n=10), sendo um controle (GC), um exposto a $40 \mu\text{g L}^{-1}$ do composto (F40) (EPA, 2020); e um exposto a concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ (F160). Após a aclimação, os peixes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=10) e colocados em caixas d'água com volume total 300 litros. As concentrações de exposição foram: grupo controle (GC), livre do contaminante; um exposto a $40 \mu\text{g L}^{-1}$ do composto (F40) (EPA, 2020); e um exposto a concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ (F160).

A exposição ocorreu de modo agudo por 96 horas, em sistema estático, com alimentação suspensa durante esse período. Após exposição, os animais foram anestesiados (benzocaína $0,1 \text{ g L}^{-1}$) e, utilizando seringas heparinizadas serão coletadas amostras de sangue para análise da frequência de ANE's e Micronúcleo para verificação da genotoxicidade sobre o organismo.

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins e aprovado pelo CEUA 23.101.001.315/22-35.

Teste de micronúcleo (MN) e anomalias nucleares eritrocitárias (ANEs).

A metodologia seguida foi a de Carrasco et al. (1990), com adaptações de Cavalcante (2008). Lâminas de extensões sanguíneas foram fixadas e coradas utilizando um kit panótico rápido. A avaliação da presença de micronúcleo foi estabelecida na contagem de 3000 células sanguíneas por indivíduo, em microscópio óptico, no aumento de 1000x. Para definir os micronúcleos, alguns critérios serão estabelecidos, como: ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal; ter tamanho de até 1/3 do núcleo; não apresentar refringência e apresentar mesma coloração que o núcleo principal. As principais classificações consideradas quanto à morfologia das ANEs, são: núcleo reniforme, indentado,



lobulado, segmentado, vacuolado e binucleado. Todas as análises de ANE's foram feitas em 3000 células utilizando um microscópio óptico (Leica DM500) sob magnificação 1000x.

Análise Estatística

Os resultados serão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os dados serão submetidos ao teste de normalidade (D'agostino & Pearson) e as diferenças entre o grupo controle e os grupos tratados serão detectadas por análise de variância (ANOVA) One-way, seguido de pós-teste de Bonferroni ($n \geq 8$) e seu correspondente não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns. Todos os testes estatísticos serão realizados utilizando software GraphPad Prism 5.0, considerando significância de $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

IV. Resultados

Após o período de exposição, não houveram alterações no número de células micronucleadas sobre as diferentes concentrações, o que pode estar relacionado à ação do composto e ao ciclo mitótico dessas células, que variam a depender da espécie. Contudo, observou-se um comportamento anormal na ocorrência de anormalidades nucleares em eritrócitos (ANEs) apresentando um decréscimo no número de células lobuladas dos dois grupos tratados em relação ao grupo controle (GC) na Tabela 1. Para as demais ANE's não houveram alterações significativas.

Tabela 1 - Valores médios (\pm E.P.M) dos parâmetros micronucleares e ANE's em eritrócitos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após exposição aguda de 96 h ao fipronil.

Parâmetros	GENOTOXICIDADE		
	Controle	F40 μ L	F160 μ L
Micronúcleo	0,017 \pm 0,007	0,733 \pm 0,467	0,503 \pm 0,223
ANES			
Binucleada (%)	0,090 \pm 0,026	0,053 \pm 0,026	0,107 \pm 0,056
Reniforme (%)	3,093 \pm 0,282	2,477 \pm 0,138	2,483 \pm 0,204
Segmentada (%)	0,080 \pm 0,015	0,073 \pm 0,024	0,060 \pm 0,014



Indentada (%)	0,127±0,020	0,077±0,021	0,110±0,015
Lobulada (%)	3,743±0,272	2,927±0,195*	2,363±0,145*
Vacuolada (%)	0,010±0,005	0,000±0,000	0,000±0,000

(*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. ANES = Anomalias Nucleares Eritrocitárias.

A baixa frequência de MN e ANE já é uma resposta evidenciada em outros trabalhos, o que não significa que o composto não provoque danos aos organismos (PANTALEÃO et al., 2006; FERRARO, 2009; ROCHA et al, 2011; MELO et al, 2013). Em organismos saudáveis há ocorrência de células micronucleadas, entretanto, a frequência espontânea (basal) de MN em peixes é normalmente muito baixa (PANTALEÃO et al., 2006).

Um organismo saudável é capaz de produzir e destruir as células sanguíneas de forma equilibrada, mantendo a quantidade e qualidade das células em circulação, este processo evita infecções, sangramento e garante um fornecimento adequado de oxigênio para as células (ROSENFELD, 2012). Todavia, agentes químicos exógenos de forma geral provocam estresse que resultam na interrupção da eritropoiese, e, portanto, a produção de eritrócitos micronucleados e de ANE's também é inibida, mascarando os resultados e auxiliando na indução de um falso negativo ainda que o composto seja potencialmente citogenotóxico.

De acordo com a classificação de toxicidade aguda para organismos aquáticos proposta por Helfrich et al. (1996), quanto menor a concentração referente a CL50, mais tóxico é considerado o composto, não foram encontrados relatos da CL50 para *C. Macropomum* para indivíduos nesta fase de desenvolvimento, mas levando em consideração a diminuição de ANEs paralela ao aumento da concentração de exposição do composto, o resultado vai de encontro a proposta de Helfrich.

A causa da diminuição no número de células lobuladas ainda requer uma investigação aprofundada, considerando características endógenas e exógenas ao animal, uma vez que estudos sobre o efeito deste químico sobre outras vias de ação não elucidem a raiz da alteração observada.

V. Considerações Finais



Diferentes concentrações do fipronil Regente 800 WG® por 96 horas não geraram alterações que indiquem efeitos citotóxicos e genotóxicos em *C. macropomum*.

VI. Referências Bibliográficas

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

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 47, p. 2123-2136, 1990.

CASSAL, V. B. et al. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET**, v. 18, n. 1, p. 437-445, 2014.

CAVALCANTE, D., MARTINEZ, C., & SOFIA, S. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 655, p. 41-46, 2008.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos**. 189p. Tese de doutorado (Ciências Biológicas) pela Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.

IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 2016. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/#sobreosrelatorios>>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

LI, H.; YOU, J.; WANG, W. Multi-compartmental toxicokinetic modeling of fipronil in tilapia: Accumulation, biotransformation and elimination. **Journal of hazardous materials**, v. 360, p. 420-427, 2018.

MARIANO, W. S. et al. Impactos de pesticidas e biopesticidas na aquicultura. In: TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W. S. (Ed.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. p. 625-644.

MELO, K. M.; ALVES, I. R.; PIECZARKA, J. C.; DAVID, J. A. O.; NAGAMACHI, C. Y.; GRISOLIA, C. K. Profile of micronuclei frequencies and nuclear abnormalities in different species of electric fishes (*Gymnotiformes*) from the Eastern Amazon. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 3, p. 425-429, 2013.



MORON, S. E. et al. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, v. 298, n. 2, p. 93-104, 2003.

NOGUEIRA, D. J.; CASTRO, S. C.; SÁ, O. R. Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas – MG. **Revista Brasileira de Zootecias**. v. 11, n. 3, p. 227-232, 2009.

PANTALEÃO, M. S.; ALCANTARA, A. V.; ALVES, J. P. H.; SPANO, M. A. The Piscine Micronucleus Test to Assess the Impact of Pollution on the Japaratuba River in Brazil. **Environmental and Molecular Mutagenesi**, v. 47, p. 219-224, 2006.

ROCHA, C. A. M.; DA CUNHA, L. A.; DA SILVA, P. R. H.; DE OLIVEIRA, B. M.; BURBANO, R. M. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of *Colossoma macropomum* exposed to methylmercury. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 4, p. 694-697, 2011

SILVA, D. C. V. R. A.; POMPÊO, M.; PAIVA, T. C. B. Ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. In: POMPÊO, M.; MOSCHINI-CARLOS, V.; NISHIMURA.; P.U SILVA, S.CDOVAL, J.C.L. **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, p. 460, 2015

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Office of chemical safety and pollution prevention**, 2020. Acesso em: 05 de março de 2022.

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

VII. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Capes – Brasil, através do financiamento da pesquisa da mestrandia Ducilene do Carmo da Silva (Bolsista) que se inclui dentro do projeto “Respostas integradas do peixe neotropical (*Colossoma macropomum*) à toxicidade aguda do inseticida fipronil.”.