

NÉDIA DE CASTILHOS GHISI

**Avaliação Genotóxica em *Rhamdia quelen*
após Contaminação Sub-Crônica com Fipronil**



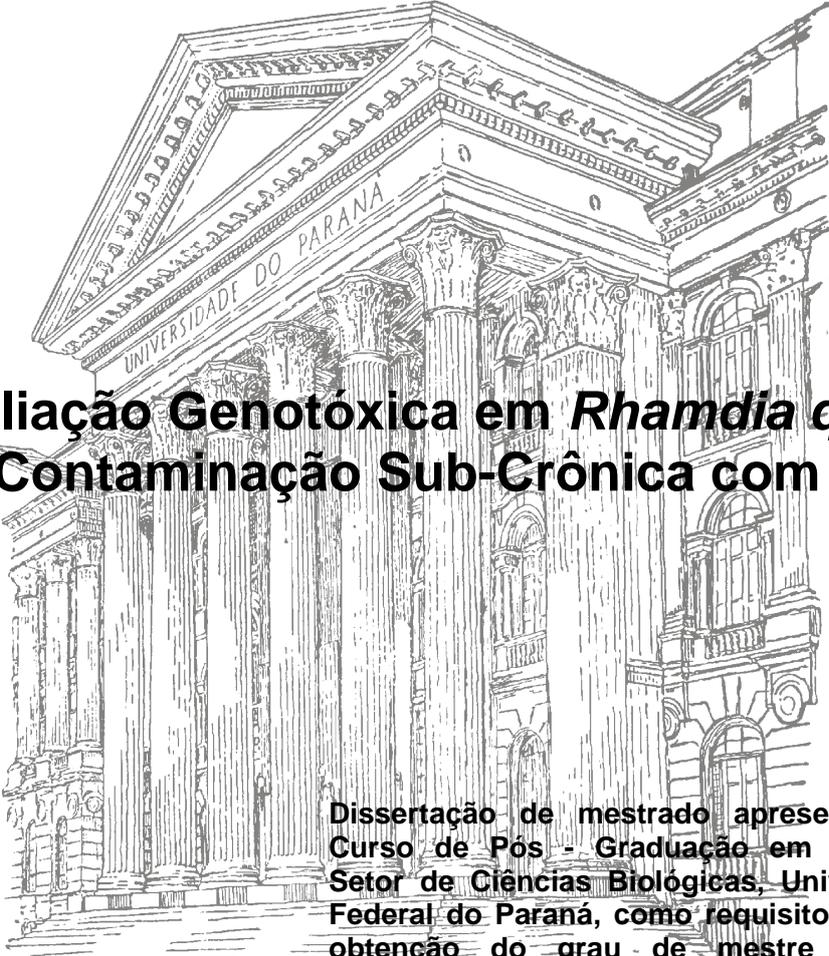
**CURITIBA
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

NÉDIA DE CASTILHOS GHISI



**Avaliação Genotóxica em *Rhamdia quelen*
após Contaminação Sub-Crônica com Fipronil**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Curso de Pós - Graduação em Genética,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à
obtenção do grau de mestre Ciências
biológicas, área de concentração Genética.
Orientadora: Prof^a Dr^a Marta Margarete
Cestari
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinícius
Mocellin Ferraro

CURITIBA
2010



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **NÉDIA DE CASTILHOS GHISI** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito **“B”**.

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 28 de janeiro de 2010.

Professora Doutora Marta Margarete Cestari
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Professora Doutora Marina Isabel Mateus de Almeida - Depto. de Genética, UFPR
Membro Titular

Professor Doutor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, UFPR
Membro Titular

Visto:

Profª Drª Maria Luiza Petzl-Erler
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

Dedico este trabalho ao meu pai, cujo único erro foi ter deixado este mundo muito cedo, antes de colher as sementes que plantou, antes de ter seu merecido galardão...

“O que aconteceu com o nascer do sol? E a chuva?
 O que aconteceu com tudo Que você disse que iríamos ganhar?
 E os campos de extermínio? Vamos ter um descanso?
 E o que vai acontecer com tudo Que você disse que era meu e teu?
 Você já parou pra pensar Sobre todo o sangue derramado?
 Já parou pra pensar Que a Terra, os mares estão chorando?

O que fizemos com o mundo? Olhe o que fizemos
 E a paz Que você prometeu a seu único filho?
 O que aconteceu aos campos floridos? Vamos ter um descanso?
 O que aconteceu com todos os sonhos Que você disse serem teus e meus?
 Você já parou pra pensar Sobre todas as crianças mortas com a guerra?
 Você já parou para a notícia que a Terra está chorando, a sua terra chorando

Eu costumava sonhar
 Costumava viajar além das estrelas
 Agora já não sei onde estamos
 Embora saiba que fomos longe demais

O que vai ser do passado? (E de nós?)
 E os mares? (E de nós?)
 O céu está caindo/ Não consigo nem respirar
 E a terra sangrando? Não conseguimos sentir as feridas?
 E o valor da natureza? É o ventre do nosso planeta
 E os animais? Fizemos de reinados, poeira
 E os elefantes? Perdemos a confiança deles?
 E as baleias chorando? Estamos destruindo os mares
 E as florestas? Queimadas, apesar dos apelos
 E a terra prometida? Rasgada ao meio pelos dogmas
 E o homem comum? Não podemos libertá-lo?
 E as crianças chorando? Não consegue ouvi-las chorar?
 O que fizemos de errado? Alguém me fale o porquê
 E os bebês? E os dias?
 E toda a alegria? E o homem?
 O homem chorando? E Abraão?
 E a morte de novo?
 A gente se importa?”

---- Michael Jackson (Earth Song)

Agradecimentos

A minha orientadora Prof^a Margarete, pela oportunidade que me concedeu.

Ao meu co-orientador Prof. Marcos Vinícius, pelos ensinamentos de todos esses anos, desde que entrei no laboratório.

Um especial à Wanessa, que me cedeu parte do seu material quando tive que mudar meu projeto de mestrado, além de vários bons ensinamentos e dicas. Espero não tê-la decepcionado.

A todos os meus colegas de laboratório, pelo convívio, amizade e apoio quando necessário. Aos professores do Departamento de Genética da UFPR pela paciência e competência na transmissão de seus conhecimentos.

Ao Prof. Ciro e alunos do laboratório de Toxicologia Celular – Dpto Biologia Celular, por sempre estarem por perto prontos para compartilhar informações e projetos importantes. Ao grupo Aquatóxi, por sempre ser unido e proporcionar uma vasta troca de experiências e conhecimentos.

A Prof^a Marina, pelas correções e dicas, que não valerão somente para a dissertação, mas para toda a minha vida acadêmica.

O agradecimento que segue é para pessoas muito especiais, às quais, devo imensa gratidão. As palavras, que encontro para agradecer-lhes, são muito pequenas diante de tudo que eles representam na minha vida.

A minha mãe e minha irmã, que sempre acreditaram em mim, mesmo longe sempre me deram o maior apoio.

Ao meu marido, Elton, que me auxiliou em muitas partes de minha dissertação, bem como de minha vida, desde que nos conhecemos.

Aos meus amigos e amigas de graduação, que serão amizades para toda a vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO.....	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO GERAL	x
GENERAL ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
I. SUSTENTABILIDADE E O CRESCIMENTO DA POPULAÇÃO HUMANA	1
II. SUSTENTABILIDADE DA ÁGUA COMO UM RECURSO	2
III. ECOTOXICOLOGIA	6
IV. AGROTÓXICOS	8
i. <i>Fipronil</i>	10
V. BIOMONITORAMENTO DE POLUIÇÃO AMBIENTAL, BIOENSAIO E BIOMARCADORES	13
VI. <i>RHAMDIA QUELEN</i>	18
2. OBJETIVOS GERAIS	19
I. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. JUSTIFICATIVA.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
CAPÍTULO I.....	21
Avaliação de genotoxicidade em <i>Rhamdia quelen</i> após Contaminação com sub-Crônica com Fipronil.....	21
ANEXO 2 – METODOLOGIA COMPLETA	38
I. ESPÉCIE UTILIZADA.....	38
II. MÉTODOS	38
i. <i>Teste do Micronúcleo Písceo</i>	38
ii. <i>Ensaio Cometa</i>	39
iii. <i>Histopatologia de brânquia</i>	43
ANEXO 3.....	48
TESTE DE METODOLOGIA PARA MICRONÚCLEO E ALTERÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES: QUAL O NÚMERO IDEAL DE CÉLULAS A SER CONTADO?	48
RESULTADO	50
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	53
ANEXO 4.....	54
PADRONIZAÇÃO DA PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS COM A FINALIDADE DE USO NO ENSAIO COMETA.....	54
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

ANOVA – Análise de Variância
CCT1 – Grupo contaminado com 0,05 µg/L de Fipronil;
CCT2 – Grupo contaminado com 0,10 µg/L de Fipronil;
CCT3 – Grupo contaminado com 0,23 µg/L de Fipronil;
CEE – Comunidade Econômica Européia
CSB – Tampão Soro Bovino Fetal
CTF – Tampão Fosfato Salino
CTR – Tampão Tris
DDT – Diclorodifeniltricloroetano
DNA – Ácido Desoxiribonucléico
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA - Estados Unidos da América
GABA - Ácido γ-Aminobutírico
LMP- Low Melting Point (baixo ponto de fusão)
LSD - Mínimas Diferenças Significantes De Fisher
MNP – Micronúcleos Píscios
PAHs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PBS – Tampão Fosfato Salino
pH – Potencial de Hidrogênio Iônico
Sec. – Século
U.S. EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
% - Percentual
g – Grama
mg - Miligrama
µg- Micrograma
ng – Nanograma
L - Litro
ml – Mililitro
µl – Microlitro
µm – Micrometro
m³ – Metro Cúbico
m³s⁻¹ – Metro Cúbico por Segundo
km³ – Kilômetro Cúbico
US\$ - Dólar
t_{1/2} – Meia Vida
® - Marca Registrada
°C - Graus Celsius
HCl – Ácido Clorídrico
HCl_{conc} – Ácido Clorídrico Concentrado
V - Volts
mA – Miliampére
Σ – Somatória
LC₅₀ – Dose Letal 50%
ppb – Parte Por Bilhão
ppt – Parte Por Trilhão
mM – Milimolar
µM – Micromolar
~ - Aproximadamente

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CRESCIMENTO POPULACIONAL MUNDIAL ENTRE OS ANOS DE 1980 E 2050 (PREVISÃO) E O NÚMERO DE ANOS QUE LEVA PARA ADICIONAR CADA BILHÃO DE HABITANTES A TERRA.....	2
FIGURA 2. COMO E POR QUEM A ÁGUA DOCE DO MUNDO É UTILIZADA NO MUNDO.	6
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DO FIPRONIL, 5-AMINO-1-[2,6-DICHLORO-4-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL]-4-[(1-R,S)(TRIFLUOROMETHYL)SULFINYL]-1HPYRAZOLE- 3-CARBONITRILE.	10
FIGURA 4. A BIOTRANSFORMAÇÃO DO FIPRONIL EM PEIXES.	13
FIGURA 5. (A) ORIGEM DO MICRONÚCLEO A PARTIR DE UM FRAGMENTO CROMOSSÔMICO ACÊNTRICO OU DE UM CROMOSSOMO INTEIRO. (B) FORMAÇÃO DE UMA PONTE CITOPLASMÁTICA E DE UM MICRONÚCLEO A PARTIR DE UM FRAGMENTO CROMOSSÔMICO ACÊNTRICO.....	15
FIGURA 6. FOTO DE UM EXEMPLAR DE <i>Rhamdia quelen</i>	18
FIGURA 7. FOTOS MOSTRANDO AS CINCO DIFERENTES TAXAS DE DANO NO ENSAIO COMETA COM LENTE DE IMERSÃO. A. DANO ZERO; B. DANO UM; C. DANO DOIS; D. DANO TRÊS; E. DANO QUATRO (POSSIVELMENTE EM APOPTOSE).....	42
FIGURA 8. FOTO DAS BRÂNQUIAS DE <i>Rhamdia quelen</i> , NO MOMENTO QUE FORAM RETIRADAS DO ANIMAL PARA SEREM SUBMETIDAS ÀS PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS.	45
FIGURA 9. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE SEIS LAMELAS RESPIRATÓRIAS, MOSTRANDO AS LESÕES BRANQUIAIS MAIS COMUNS, INDUZIDAS POR IRRITANTES. A MORFOLOGIA NORMAL; B. DESLOCAMENTO EPITELIAL; C. NECROSE; D. HIPERPLASIA; E. ANEURISMA; F. PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE CLORETO. ((LB) LÂMINA BASAL; (CC) CÉLULA DE CLORETO; (UM) CÉLULA MUCOSA; (PI) CÉLULA PILAR; (CE) CÉLULA EPITELIAL LAMELAR; (SVL) SEIO VENOSO LAMELAR; (CSM) CANAL SANGUÍNEO MARGINAL (MODIFICADO DE MALLAT, 1985).	46
FIGURA 10. PADRÃO DE DIFERENÇA NÃO SIGNIFICANTE ENCONTRADA PARA AS CONTAGENS DE MIL CÉLULAS, DUAS MIL CÉLULAS, TRÊS MIL CÉLULAS E QUATRO MIL CÉLULAS. ESTE MODELO SE REPETIU PARA TODOS OS GRUPOS DE CONTAMINAÇÃO E GRUPO CONTROLE.	51
FIGURA 11. GRÁFICO MOSTANDO O RESULTADO GERAL DOS DIFERENTES TRATAMENTOS PARA TODAS AS CONTAGENS. CTR= CONTROLE; CCT1= GRUPO CONTAMINADO COM 0,05 µg/L DE FIPRONIL; CCT2=GRUPOS CONTAMINADO COM 0,10 µg/L; CCT3= GRUPO CONTAMINADO COM 0,23 µg/L.	53
FIGURA 12. COMPARAÇÃO GERAL DOS TRÊS TAMPÕES COM RELAÇÃO À TAXA DE DANDO, INDEPENDENTE DO TEMPO. CSB=SORO BOVINO FETAL; CTR= TRIS; CTF= TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS). OS DADOS SÃO APRESENTADOS EM RAÍZ QUADRADA.	58

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

- ILUSTRAÇÃO 1.** COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS – MNT. H= RESULTADO PARA O KRUSKAL-WALLIS; CTR= GRUPO CONTROLE; CCT1= GRUPO CONTAMINADO COM 0,05 $\mu\text{G/L}$ DE FIPRONIL; CCT2= GRUPO CONTAMINADO COM 0,10 $\mu\text{G/L}$; CCT3= GRUPO CONTAMINADO COM 0,23 $\mu\text{G/L}$ 34
- ILUSTRAÇÃO 2.** ALGUMAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS EM *RHAMDIA* QUELEN EXPOSTO AO FIPRONIL. A. NÚCLEO NORMAL. TODOS OS DE MAIS APRESENTAM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES..... 35
- ILUSTRAÇÃO 3.** RESULTADO PARA O ENSAIO COMETA. H= RESULTADO PARA O KRUSKAL-WALLIS CCT1= GRUPO CONTAMINADO COM 0,05 $\mu\text{G/L}$ DE FIPRONIL; CCT2= GRUPO CONTAMINADO COM 0,10 $\mu\text{G/L}$; CCT3= GRUPO CONTAMINADO COM 0,23 $\mu\text{G/L}$ 36
- ILUSTRAÇÃO 4.** FOTOMICROGRAFIA DE TECIDO BRANQUIAL. (A) E (B) LAMELAS NORMAIS, OBJETIVA DE 40 VEZES. (C) HIPERPLASIA PARCIAL DAS LAMELAS, OBJETIVA DE 40 VEZES. (D) FUSÃO TOTAL DAS LAMELAS, OBJETIVA DE 10 VEZES. (E) E (F) ANEURISMAS EM OBJETIVAS DE 10 E 40 VEZES, RESPECTIVAMENTE. 37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS OBSERVADAS E SEUS RESPECTIVOS FATORES DE IMPORTÂNCIA.....	47
TABELA 2. BIBLIOGRAFIA ATUAL MOSTRANDO COMO SÃO ANALISADAS AS CÉLULAS DE MICRONÚCLEO: QUANTAS CÉLULAS POR LÂMINA.....	49
TABELA 3. COMPARAÇÃO DA CONTAGEM DE MIL, DUAS MIL, TRÊS MIL E QUATRO MIL CÉLULAS DENTRO DE CADA GRUPO DE TRATAMENTO. H= RESULTADO PARA O KRUSKAL-WALLIS.....	51
TABELA 4. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA CADA CONTAGEM X GRUPOS DE TRATAMENTO. H= RESULTADO DO KRUSKAL-WALLIS; * RESULTADO SIGNIFICANTE ($p<0,05$); CTR= GRUPO CONTROLE; CCT1= GRUPO CONTAMINADO COM 0,05 $\mu\text{g/L}$ DE FIPRONIL; CCT2= GRUPOS CONTAMINADO COM 0,10 $\mu\text{g/L}$; CCT3= GRUPO CONTAMINADO COM 0,23 $\mu\text{g/L}$	52
TABELA 5. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DAS TAXAS DE DANO NO ENSAIO COMETA DAS DIFERENTES SOLUÇÕES TAMPÃO DENTRO DE CADA TRATAMENTO DOSE DE CONTAMINAÇÃO. F= RESULTADO PARA ANOVA BIFATORIAL; LSD= MÍNIMAS DIFERENÇAS SIGNIFICANTES DE FISHER; * RESULTADO SIGNIFICANTE ($p<0,05$); CTR= GRUPO CONTROLE; CCT1= GRUPO CONTAMINADO COM 0,05 $\mu\text{g/L}$ DE FIPRONIL; CCT2= GRUPOS CONTAMINADO COM 0,10 $\mu\text{g/L}$; CCT3= GRUPO CONTAMINADO COM 0,23 $\mu\text{g/L}$. CSB=SORO BOVINO FETAL; CTR= TRIS; CTF= TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS).....	58
TABELA 6. COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS/DOSES DE CONTAMINAÇÃO X TAMPÃO DE DILUIÇÃO X TEMPO DE CONSERVAÇÃO. F= RESULTADO PARA ANOVA BIFATORIAL; LSD= MÍNIMAS DIFERENÇAS SIGNIFICANTES DE FISHER; * RESULTADO SIGNIFICANTE ($p<0,05$); n.s. = RESULTADO NÃO SIGNIFICATIVO; CTR= GRUPO CONTROLE; CCT1= GRUPO CONTAMINADO COM 0,05 $\mu\text{g/L}$ DE FIPRONIL; CCT2= GRUPOS CONTAMINADO COM 0,10 $\mu\text{g/L}$; CCT3= GRUPO CONTAMINADO COM 0,23 $\mu\text{g/L}$. CSB=SORO BOVINO FETAL; CTR= TRIS; CTF= TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS).....	59

RESUMO GERAL

A população humana mundial em 1950 era de 2,5 bilhões. Em 2000 já havia mais de seis bilhões de pessoas no planeta. O crescimento populacional apresenta-se como um fator negativo frente à disponibilidade dos recursos naturais. A água se constitui atualmente um fator limitante para o desenvolvimento agrícola, urbano e industrial. Rios, lagos e oceanos são frequentemente usados como esgotos a céu aberto, sendo os últimos recipientes de toda a poluição. Agrotóxicos, derramamento de óleo, metais pesados, detergentes e lixos industriais podem prejudicar e matar organismos que vivem em ambientes aquáticos. Surge assim a necessidade de se avaliar os efeitos que essas substâncias podem causar nestes organismos, bem como a necessidade de padronizar as metodologias de avaliação dos danos causados por tais substâncias. Neste trabalho pesquisou-se os efeitos que uma exposição subcrônica de 60 dias ao agrotóxico Fipronil, nas concentrações de 0,05µg/L, 0,10µg/L e 0,23µg/L, pode causar no peixe *Rhamdia quelen* através do teste do Micronúcleo Píscico, do Ensaio Cometa com brânquia e de análise histopatológicas das brânquias. Os resultados para o Ensaio Cometa e para lesões histopatológicas branquiais não mostraram diferença entre o controle negativo e os grupos contaminados. Para o teste do Micronúcleo Píscico, a menor concentração de Fipronil mostrou-se igual ao grupo controle, e as demais concentrações, acima do controle, com relação a taxa de dano ao DNA. Esses resultados indicam que as concentrações testadas de Fipronil não foram suficientes para se detectar grandes alterações no DNA de *Rhamdia quelen* com os testes escolhidos. Talvez a aplicação de novos testes, mais precisos podem revelar alguma alteração. Durante o experimento foram feitas duas padronizações de metodologia: uma para o Teste do Micronúcleo Píscico, que concluiu que a contagem de somente mil células é suficiente para se obter resultados confiáveis; e outra para o Ensaio Cometa, onde se padronizou o soro bovino fetal como a melhor solução de estoque para até 48 horas.

GENERAL ABSTRACT

In 1950 the human population in the world was around 2.5 billion people. In 2000 there were over six billion on the planet. Population growth is a negative factor against the availability of natural resources. The water is currently a limiting factor for agricultural, urban and industrial development. Rivers, lakes and oceans are often used as sewers, and the ultimate recipient of all pollution. Pesticides, waste and oil spills, metals, urban and industrial waste can harm and kill organisms living in aquatic environments. These situations create the need to evaluate the effects these substances can cause to these organisms. This study therefore investigated, through the Piscine Micronucleus test, the Comet Assay with gill and histopathological analysis of the gills, the effects of the insecticide Fipronil in concentrations of 0.05 $\mu\text{g} / \text{L}$, 0.10 $\mu\text{g} / \text{L}$ and 0.23 $\mu\text{g} / \text{L}$, on fish *Rhamdia quelen*. The results for the Comet test and histopathological gill lesions showed no difference between the negative control and contaminated groups. For the micronucleus piscine test, the lower concentration of Fipronil was equivalent to the control group and the other concentrations, above the control, when compared with the rate of DNA damage. These results indicate that concentrations of fipronil tested were not sufficient to detect a change in the DNA of *Rhamdia quelen* with the chosen tests; perhaps more accurate new tests could reveal any changes. During the experiment were done two standardization methods: one for the piscine micronucleus test, which concluded that the counting of only a thousand cells is sufficient to obtain reliable results, and other for the Comet assay, where standardized fetal bovine serum as the best solution for stock up to 48 hours.

1. INTRODUÇÃO GERAL

I. SUSTENTABILIDADE E O CRESCIMENTO DA POPULAÇÃO HUMANA

Chamar uma atividade de “sustentável” significa que ela pode ser continuada e repetida em um futuro previsível. Portanto a preocupação surge porque grande parte das atividades humanas são nitidamente insustentáveis. A população humana global não poderá continuar aumentando de tamanho; não poderemos continuar a retirar peixes do mar mais rápido do que a capacidade de repor os cardumes perdidos, se quisermos ter peixes para alimentar as gerações futuras. Não podemos continuar a explorar culturas agrícolas em florestas se a qualidade e a quantidade do solo se deteriora e os recursos hídricos se tornam impróprios para uso de qualquer ser vivo; não podemos continuar a usar os mesmos agrotóxicos se um número crescente de pragas se tornarem resistentes a eles; não poderemos manter a diversidade da natureza se continuarmos a provocar extinção das espécies (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2006).

A raiz de muitos problemas ambientais, para não dizer de todos, nos coloca diante do “problema” dos efeitos de uma grande população de humanos em crescimento (Figura 1). Mais pessoas significa um aumento na demanda por energia, um maior consumo de recursos não-renováveis como petróleo e minerais, mais pressão sobre recursos renováveis como peixes e floresta, mais necessidade de produção de alimentos pela agricultura e assim por diante. O debate é, sem dúvida, o da sustentabilidade: as coisas não podem continuar como estão (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2006). A tudo isto se acrescenta ainda o aumento na poluição ambiental como consequência.

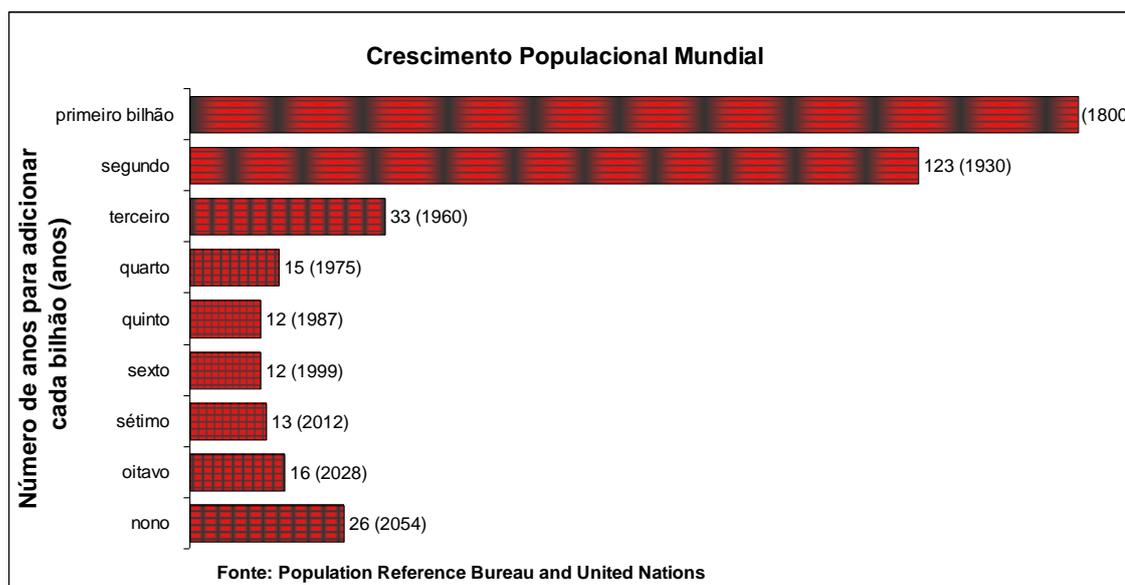


FIGURA 1. CRESCIMENTO POPULACIONAL MUNDIAL ENTRE OS ANOS DE 1800 E 2050 (PREVISÃO) E O NÚMERO DE ANOS QUE LEVA PARA ADICIONAR CADA BILHÃO DE HABITANTES A TERRA.

FONTE: <http://wapedia.mobi/pt/Crescimento_populacional?t=2>

Por sua vez, enquanto a população atual do mundo (quase sete bilhões de habitantes) duplicou na última década, a demanda total de água cresceu seis vezes, para uso doméstico, industrial e principalmente agrícola, segundo dados das Nações Unidas (2000). Este processo agravou sobremaneira os problemas gerados pela falta de sintonia entre a distribuição das águas na Terra e a sua população. Desta forma, a alternativa mais barata e viável para abastecer a crescente população mundial é aprender a usar a água disponível de forma cada vez mais eficiente. Vale salientar que a demanda de água no mundo aumenta mais rapidamente do que a população, sob a pressão das mudanças dos hábitos de higiene e da necessidade de se alcançar uma produtividade cada vez maior de alimentos e sobretudo produtos industriais (REBOUÇAS, 2001).

II. SUSTENTABILIDADE DA ÁGUA COMO UM RECURSO

A água se constitui, atualmente, no fator limitante para o desenvolvimento agrícola, urbano e industrial, tendo em vista que a disponibilidade *per capita* de água doce vem sendo reduzida rapidamente, face

ao aumento gradativo da demanda para seus múltiplos usos e à contínua poluição dos mananciais ainda disponíveis (SAUTCHUK *et al.* 2005).

A escassez de água não pode mais ser considerada como atributo exclusivo de regiões áridas e semi-áridas. Muitas áreas com recursos hídricos abundantes, mas insuficientes para atender a demandas excessivamente elevadas, também experimentam conflitos de usos e sofrem restrições de consumo que afetam o desenvolvimento econômico e a qualidade de vida. (SAUTCHUK *et al.* 2005).

A poluição da água pode ser originada por diversos fatores: esgoto industrial e doméstico, fertilizantes e agrotóxicos, entre outros. A água que é contaminada é um bem especialmente valioso. Sua contaminação é muito fácil, mas o mesmo não se pode dizer de sua descontaminação, a qual muitas vezes é dispendiosa e em alguns casos impossível de ser executada (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2006).

No novo paradigma da globalização, porém, a disponibilidade de água doce torna-se cada vez mais um negócio e fator econômico competitivo do mercado. A falta de consideração ou de conhecimento desta perspectiva vem colocando a América Latina, em geral, e o Brasil, em particular – cujos potenciais de água doce são os maiores do mundo – na vala comum dos países desenvolvidos e periféricos que, efetivamente, já enfrentam problemas de escassez de água (REBOUÇAS, 2001).

Os mananciais para abastecimento público no Brasil têm apresentado uma progressiva deterioração quanto à qualidade de suas águas. Estudos realizados em diferentes regiões do país (ANDREOLI *et al.* 1999; REBOUÇAS, 1999) dão conta de que a demanda do consumo de água tem aumentado significativamente e a disponibilidade hídrica em condição de utilização para fornecimento à população não tem crescido na mesma proporção (ANDREOLI; CARNEIRO, 2005).

A demanda por um suplemento limpo e seguro de água para beber, para agricultura e recreação tem aumentado rapidamente nos últimos anos. Águas receptoras, como lagos, rios e áreas costeiras marinhas são receptáculo de enormes quantias de descartes derivados diretamente de indústrias, agricultura e estabelecimentos urbanos ou indiretamente da deposição atmosférica de emissões transportadas por via aérea. Presente nesta água

está uma mistura complexa de substâncias tóxicas com um crescente número de contaminantes que representam uma ameaça tanto a ecossistemas aquáticos quanto a saúde e bem-estar das populações humanas (POLLACK; CUNNINGHAM; ROSENKRANTZ, 2003).

Segundo Barros, Silva e Sosa (2005) as principais causas da deterioração das bacias hidrográficas e, conseqüentemente, dos mananciais, são: desmatamentos, falta de conservação dos solos nas pastagens, lavouras e estradas, assoreamento, introdução de descargas de agrotóxicos, poluição por esgotos e lixos domésticos e hospitalares, esgotos industriais e da agricultura (por agrotóxicos e suas embalagens) e a expansão urbana, com a ocupação desordenada do solo, sem planejamento ambiental ou urbano adequado. O crescimento físico das cidades em direção aos mananciais tem causado sérios transtornos, muitas vezes exigindo seu deslocamento para outras áreas. Inúmeros mananciais vêm sofrendo grande pressão e outros tantos estão sendo degradados a ponto de serem extintos, principalmente nas proximidades das grandes cidades ou metrópoles.

Estes fatores e seus efeitos não ocorrem de forma isolada, havendo uma inter-relação dos fatores urbanos, industriais e rurais na degradação dos mananciais e conseqüentemente na qualidade da água (BARROS; SILVA; SOSA, 2005).

Os rios, os lagos e os oceanos são frequentemente usados como esgotos a céu aberto para os descartes industriais e residenciais. Agrotóxicos, derramamento de óleo, metais pesados, detergentes e lixos industriais podem prejudicar e matar organismos que vivem em ambientes aquáticos. Em contraste com o lixo jogado no ambiente terrestre, que tem basicamente efeitos locais, o lixo tóxico em ambientes aquáticos pode ser transportado por correntes e disperso em uma grande área. Esses poluentes, mesmo em níveis baixos, podem ser concentrados em níveis letais pelos organismos aquáticos filtradores ou topo de cadeia (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

Grande parte dos centros urbanos utiliza represas de forma direta ou indireta para captação da água. Esses reservatórios são ambientes lacustres resultantes do barramento artificial de rios, criados normalmente com o objetivo de contenção de cheias e armazenamento de água, regularizando a vazão e a disponibilidade de água nos rios próximos aos centros urbanos (VON

SPERLING, 1999). Normalmente localizam-se em áreas que vêm sendo pressionadas de forma crescente pela expansão urbana irregular, falta de infraestrutura básica (saneamento e lixo) e degradação do solo em suas bacias hidrográficas (ANDREOLI; CARNEIRO, 2005).

Esses fatores associados às características intrínsecas destes novos ambientes têm induzido problemas crescentes na qualidade da água para abastecimento público, com o acúmulo de poluentes e desenvolvimento de organismos como algas, que são potencialmente produtores de toxinas (ANDREOLI; CARNEIRO, 2005).

Durante as três últimas décadas têm aumentado o interesse da comunidade científica e das agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle sobre os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003). Este interesse foi intensificado em razão do constante crescimento populacional e o conseqüente aumento da industrialização, bem como a utilização inadequada de recursos naturais.

A demanda total de água no mundo é de apenas cerca de 11% da vazão média dos rios, 70% utilizados pelas atividades agrícolas, 20% pelas indústrias e 10% referentes à demanda do consumo doméstico e uso consumptivo municipal (Figura 2) (REBOUÇAS, 2001). Uso consumptivo da água é considerado aquela água que após sua utilização não é devolvida a bacia onde a mesma está localizada (THOMAZ, 2001).

Desta forma, a crise atual de abastecimento de água resulta fundamentalmente da má distribuição dos potenciais de água doce disponíveis, a qual vem sendo sensivelmente agravada pelo crescimento desordenado das demandas locais e, sobretudo, pelo fato de a degradação da sua qualidade ter atingido níveis não previstos, tanto no meio urbano quanto no rural (REBOUÇAS, 2001).

No Brasil, o meio rural vem sofrendo severamente os impactos das atividades desenvolvidas tradicionalmente nas cidades, à medida que são lançados cerca de 90% dos esgotos domésticos não-tratados nos rios, os quais degradam a qualidade das águas que fluem por centenas de quilômetros rio abaixo (REBOUÇAS, 2001).

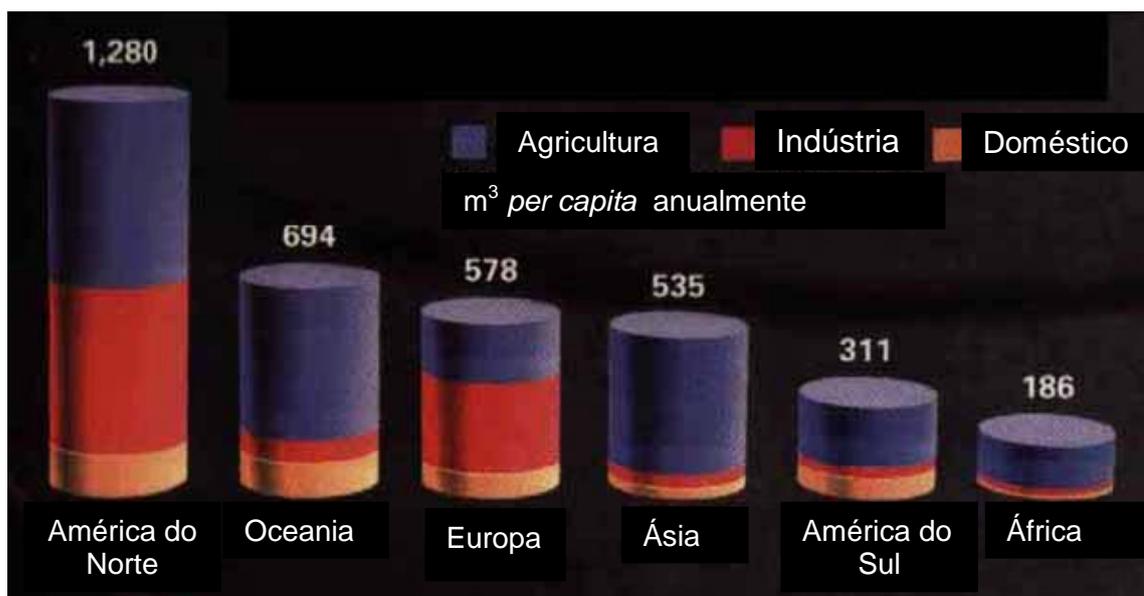


FIGURA 2. COMO E POR QUEM A ÁGUA DOCE DO MUNDO É UTILIZADA NO MUNDO.
 FONTE: NATIONAL GEOGRAPHIC, 2001.

III. ECOTOXICOLOGIA

O termo ecotoxicologia foi introduzido por Truhaut em 1969 e foi derivado das palavras ecologia e toxicologia. A introdução deste termo refletiu um interesse crescente sobre os efeitos dos poluentes ambientais sobre outras espécies além da humana. A toxicologia ambiental, em seu senso amplo compreende os efeitos dos químicos sobre o ecossistema como um todo. E a ecotoxicologia é uma disciplina dentro do grande campo da toxicologia ambiental. Truhaut definiu ecotoxicologia como “o ramo da toxicologia preocupado com o estudo de efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos, sobre quaisquer constituintes dos ecossistemas: animais (incluindo seres humanos), vegetais ou microorganismos, em um contexto integral (WALKER *et al.* 2006).

Poluentes ambientais são considerados substâncias que existem em níveis julgados estar acima daqueles que normalmente ocorreriam em um componente particular do ambiente. Isto imediatamente origina a questão de “o que é considerado natural?”. Com a maioria dos poluentes orgânicos produzidos pelo homem, tal como agrotóxicos, a situação é simples – nenhum nível detectável é normal, pois o composto não existe no ambiente até que seja liberado pelo homem. Por outro lado, poluentes como os metais, dióxido de

enxofre, óxido de nitrogênio, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), e metilmercúrio são de ocorrência natural e estavam presentes no ambiente antes do aparecimento do ser humano. Naturalmente, há uma variação na concentração desses contaminantes de um lugar a outro, de tempos em tempos. Isso complica o julgamento da escala daquilo que é natural (WALKER *et al.* 2006). Além disso, a ocorrência natural de uma substância no meio depende da sua origem, da sua concentração e biodisponibilidade.

O termo poluente indica que a substância se descreve por causar prejuízo ambiental real, enquanto o termo contaminante implica que a substância não é necessariamente prejudicial. Ainda assim há dificuldades com essa distinção. Primeiro, há o princípio toxicológico geral onde a toxicidade é relacionada a dose. Assim, uma substância pode responder a descrição de poluente em uma situação, mas não em outra. Segundo, não há acordo geral sobre o que constitui prejuízo ambiental ou dano. Alguns cientistas consideram mudanças bioquímicas deletérias em organismos individuais como prejudiciais; outros reservam o termo para decréscimos de população. Terceiro, os efeitos dos níveis medidos de substâncias em organismos vivos – ou em seus ambientes – são frequentemente conhecidos, ainda que o termo poluente seja frequentemente aplicado a eles. Julgamentos deste assunto são mais difíceis pela possibilidade que haja potenciação de toxicidade quando os organismos são expostos a misturas de substâncias (WALKER *et al.* 2006).

Para minimizar esses problemas de terminologia usa-se o termo poluente para substâncias químicas ambientais que excedem os níveis normais e causam dano. Dano inclui mudanças bioquímicas e fisiológicas que adversamente afetam organismos individuais, nascimento, crescimento, taxas de mortalidade (WALKER *et al.* 2006) e reprodução.

Se o contaminante é um poluente também depende de seu nível no ambiente, do organismo considerado, e se o organismo é danificado. Assim, um composto pode responder a descrição de poluente para um organismo, mas não para outro (WALKER *et al.* 2006).

Uma característica empolgante da ecotoxicologia é que ela representa uma abordagem de molécula a ecossistema que se relaciona a uma abordagem de gene a fisiologia. Assim, poluição por metal, chuva ácida, e aplicação de agrotóxicos tem afetado ecossistemas inteiros, às vezes com

consequências dramáticas para as populações dentro deles (WALKER *et al.* 2006).

IV. AGROTÓXICOS

Vários produtos químicos são utilizados para minimizar a ação danosa de insetos, doenças e ervas daninhas de modo a reduzir as perdas na produção agrícolas. Mas estes também são utilizados no ambiente urbano para fins domésticos, industriais e de saúde pública, entre outros (ECOBICHOM, 2000).

Atualmente a agricultura é extremamente dependente do uso dos agrotóxicos, e o abandono ou redução do uso destes causaria queda na produção agrícola, aumento nos custos de produção, elevação dos preços e, em alguns locais, fome e desnutrição (KNUTSON, 1999).

Os perigos relacionados a estes compostos começaram a chamar a atenção do mundo em 1962, com o famoso livro *Primavera Silenciosa* de Rachel Carson. Ela descreveu o processo conhecido como biomagnificação, onde o DDT (diclorodifeniltricloroetano) e outros inseticidas organoclorados se tornavam mais concentrados nos níveis mais altos da cadeia alimentar (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

O estudo de impacto ao ambiente por agrotóxicos ganhou interesse a partir de 1979, inspirado por descobertas de nematicidas em aquíferos de vários estados norte-americanos. A partir desse fato, muitos outros casos de contaminação de solo, recursos hídricos, animais e, mais crítico, de seres humanos por agrotóxicos foram diagnosticados nas regiões temperadas, mas pouco investigados em regiões tropicais (RIBEIRO *et al.* 2007).

Outro assunto que começou a ganhar atenção a partir de 1980 foi a poluição de águas subterrâneas por agrotóxicos, sendo o íon nitrato considerado como o contaminante mais importante para o problema da poluição dessas águas relacionado com práticas agrícolas (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Muitos produtos químicos manufaturados usados para matar pragas tornaram-se importantes poluentes ambientais. Esses agrotóxicos são pulverizados ou liberados sobre as áreas onde as pragas vivem, mas somente uma porção muito pequena atinge o alvo - a maior parte cai sobre a plantação

(residente) ou sobre o solo nu. Tais agrotóxicos são, portanto usados em quantidades muito maiores do que as necessárias. (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2006).

De acordo com a Comunidade Européia, o limite para cada agrotóxico estabelecido, incluindo inseticidas, é de 0,10 µg/L para águas superficiais (CEE, 1980).

Os recursos hídricos agem como integradores dos processos biogeoquímicos de qualquer região. Sendo assim, quando agrotóxicos são aplicados, os recursos hídricos são o destino final destes (RIBEIRO *et al.* 2007).

Agrotóxicos são um dos mais persistentes e penetrantes distúrbios antropogênicos a comunidades biológicas. Apesar do aumento da consciência pública e da sustentação para programas destinados a reduzir o uso do inseticida e contaminação desde a publicação em 1962 do marco de Rachel Carson, o controle químico de pragas permanece essencial no mundo desenvolvido e em desenvolvimento (BANKS *et al.* 2008).

Globalmente, os agrotóxicos movem US\$ 32 bilhões na indústria por ano, sendo que 11 bilhões deste montante ficam no mercado dos EUA. Apesar da queda nos anos de 1980, o uso de agrotóxicos está mais uma vez em alta. O uso de herbicidas e inseticidas por acre no milho americano, por instância, tem crescido na ordem de magnitude desde o começo dos anos 60. Evidências recentes dos efeitos negativos de herbicidas nos anfíbios continuam a elucidar o fato que nós ainda estamos descobrindo a extensão que as populações podem ser afetadas pelo atual uso de agrotóxicos. (BANKS *et al.* 2008).

Assim, agrotóxicos, incluindo herbicidas, inseticidas e fungicidas são usados amplamente para melhorar a produção agrícola e, como resultado, acumulam-se no ambiente (VAN DER WERF, 1996). Com muitas dessas substâncias chegando ao ambiente, em especial ao aquático, onde via de regra mais se concentram, é natural pensar que algumas delas possam estar se fixando nos indivíduos que compõem as cadeias alimentares (FERRARO, 2003). Devido a sua atividade biológica, o uso de agrotóxicos pode causar efeitos danosos à saúde humana. Por conseguinte, a indução de danos ao DNA pode levar a reações reprodutivas adversas, a indução de câncer e muitas outras doenças crônicas (DIMITROV *et al.* 2006).

i. Fipronil

Hoje os mais eficientes métodos para controle da população de carrapatos e insetos são pelo uso de agrotóxicos. Novas fórmulas foram lançadas no mercado, tal como o Fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil) fenil]-4- [(trifluorometil) sulfinil]-1 H- pirazol-3-caronitril), um produto do pirazol que pertence ao grupo químico do fenil (Figura 3) (OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008).

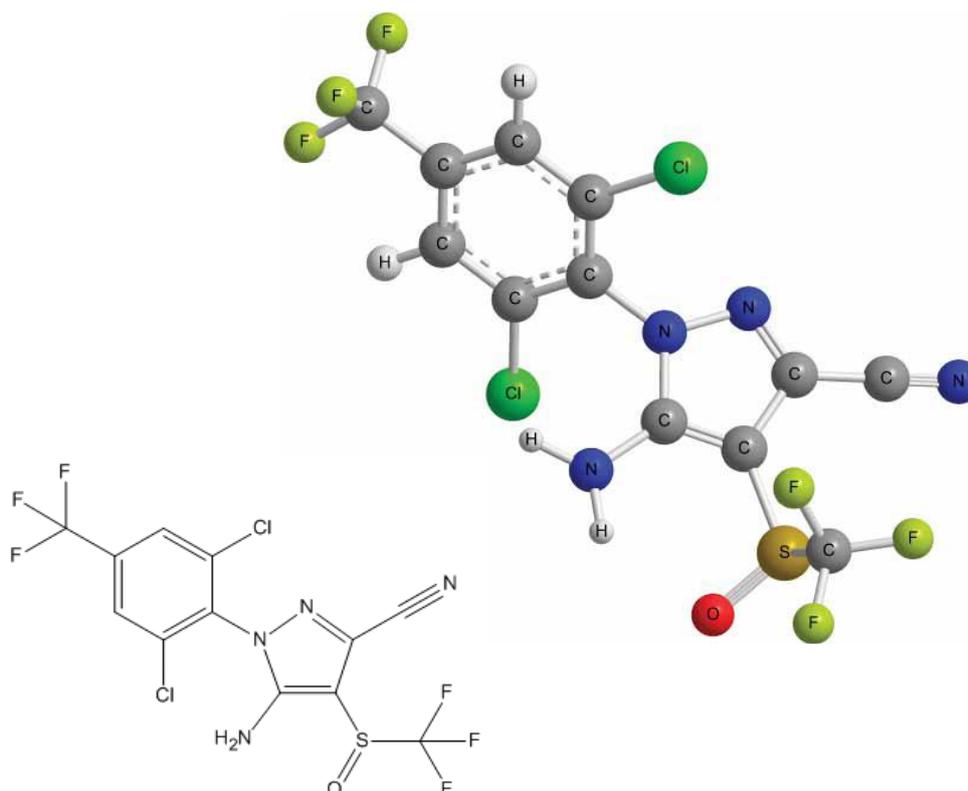


FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DO FIPRONIL, 5-AMINO-1-[2,6-DICHLORO-4-(TRIFLUOROMETIL)PHENYL]-4-[(1-R,S)(TRIFLUOROMETIL)SULFINYL]-1HPYRAZOLE-3-CARBONITRILE.

FONTE: <http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>, acessado em 26/28/2009.

O Fipronil foi elaborado por Rhône-Poulenc Arg Company (atualmente Bayer CropScience) em 1987 e introduzido em 1993 e registrado em 1996 nos EUA (GUNASEKARA; TROUNG, 2007).

O Fipronil é um inseticida e acaricida de amplo espectro que tem sido usado em plantações de arroz, milho e algodão. Pode ser encontrado também em diversas formas que variam de iscas para o controle de formigas e “spray” para controle de carrapatos e pulgas, contudo seus efeitos nos ectoparasitas,

bem como nos hospedeiros não são ainda bem conhecidos. A toxicologia do Fipronil apresenta evidências contraditórias. Alguns experimentos têm mostrado que essa droga apresenta efeitos prejudiciais em humanos (OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008).

Ngim e Crosby (2001) descobriram que o produto granular do Fipronil era a mais persistente das formulações na água, meia vida ($t_{1/2}$) foi de 125 horas, e no solo $t_{1/2}$ foi de 438 horas. O Fipronil é o ingrediente ativo dos inseticidas Frontline®, Termidor®, e Top Spot®. O inseticida é classificado como um pesticida quiral e desprende-se ao ambiente como uma mistura racêmica. O Fipronil é de baixa a moderada solubilidade na água, prefere matrizes lipofílicas (orgânicas) tal com lipídeos, óleos, proteínas e solventes orgânicos, e é estável a temperatura ambiente (GUNASEKARA; TROUNG, 2007).

A degradação dos produtos do Fipronil gera como subprodutos o Fipronil sulfídio, Fipronil sulfona, e desulfinilfipronil, sendo estes metabólitos mais tóxicos a organismos aquáticos que o composto parental. A sulfona de Fipronil e Fipronil sulfídio são 6, 6 e 1,9 vezes mais tóxicos a invertebrados de água doce que o Fipronil em si (U. S. EPA, 1996).

O Fipronil é um inseticida de nova geração, que não segue a rota bioquímica comum dos piretróides (bloquear os canais de sódio), organofosforados e carbamatos (inibidor de colinesterase), que são as rotas clássicas dos inseticidas que alguns insetos desenvolveram resistência. O Fipronil interfere com os canais de ligação a ácido γ -aminobutírico (GABA), interrompendo a transmissão normal do influxo nervoso (por exemplo, passagem dos íons de cloro), por atingir o canal clorídrico ligado ao GABA e em doses suficientes, causa excitação nervosa excessiva, paralisia severa e morte do inseto (GUNASEKARA; TROUNG, 2007).

Em um trabalho de bioacumulação, trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram alimentados com ração contaminada com Fipronil a concentração de 10 μ g/g de alimento. Como resultado, obteve-se que a exposição ao Fipronil não apresentou influência à saúde da truta arco-íris. Não houve mortalidade, a coloração e o comportamento dos peixes tratados com Fipronil foram consistentes com os dos peixes controles. Com relação a

bioacumulação, o Fipronil foi rapidamente eliminado do peixe e não mais detectado depois do 34º dia de depuração (KONWICK *et al.* 2004).

A dose letal 50% para o Fipronil (LC₅₀) é 0,246 mg/L para a truta arco-íris, 0,083mg/L para o peixe “bluegill”, e 0,130 mg/L para “sheepshead minnows” (*Cyprinodon variegatus variegatus*) (U. S. EPA, 1996).

Por instância, níveis ppt (ng/L) de Fipronil afetam camarões “Mysid” e níveis ppb (µg/L) afetaram *Daphnia* de água doce e o peixe “Bluegill sunfish” (GUNASEKARA; TROUNG, 2007).

Segundo Faouder *et al.* (2007) o Fipronil é pode afetar insetos não alvo, como as abelhas melíferas. Sugere também que ambientes não alvo podem ser afetado, como o leite de vacas alimentadas diariamente com silagem de milho tratado com Fipronil. Neste demonstrou uma transferência do Fipronil do alimento para o leite sob sua forma de sulfona.

Em um trabalho de monitoramento de agrotóxico em dois mananciais no Rio Grande do Sul, o Fipronil representa 16% das análises de resíduos de agrotóxicos, testados por Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD). Neste mesmo trabalho, o inseticida Fipronil foi detectado apenas na primeira data das sete coletas, no entanto, neste momento foram encontrados resíduos em todos os pontos de coleta. A máxima concentração encontrada para este inseticida foi cerca de 380 vezes superior ao limite de detecção (1,14 µg/Kg), que corresponde a 0,003 µg/Kg (GRÜTZMACHER *et al.* 2008).

Em ratos, o Fipronil em concentrações de 70, 140 e 280 mg/kg, pode perturbar a função da tireóide pelo decréscimo das concentrações do plasma da tiroxina total (T4), provavelmente através do aumento da desobstrução do T4 e aumenta as concentrações de TSH plasmáticas, além de diminuir as concentrações de T3 total e TH livre no plasma. (LEGHAIT *et al.* 2009). O Fipronil também alterou o funcionamento normal do sistema endócrino e causou efeitos reprodutivos adversos em fêmeas de rato “Winstar” (OHI *et al.* 2004).

Na sua biotransformação em peixes, o Fipronil que é um sulfóxido, foi oxigenado a sulfona, reduzido ao sulfídeo e hidrolizado em um peixe não identificado exposto a 900ng/L por 35 dias (Figura 4).

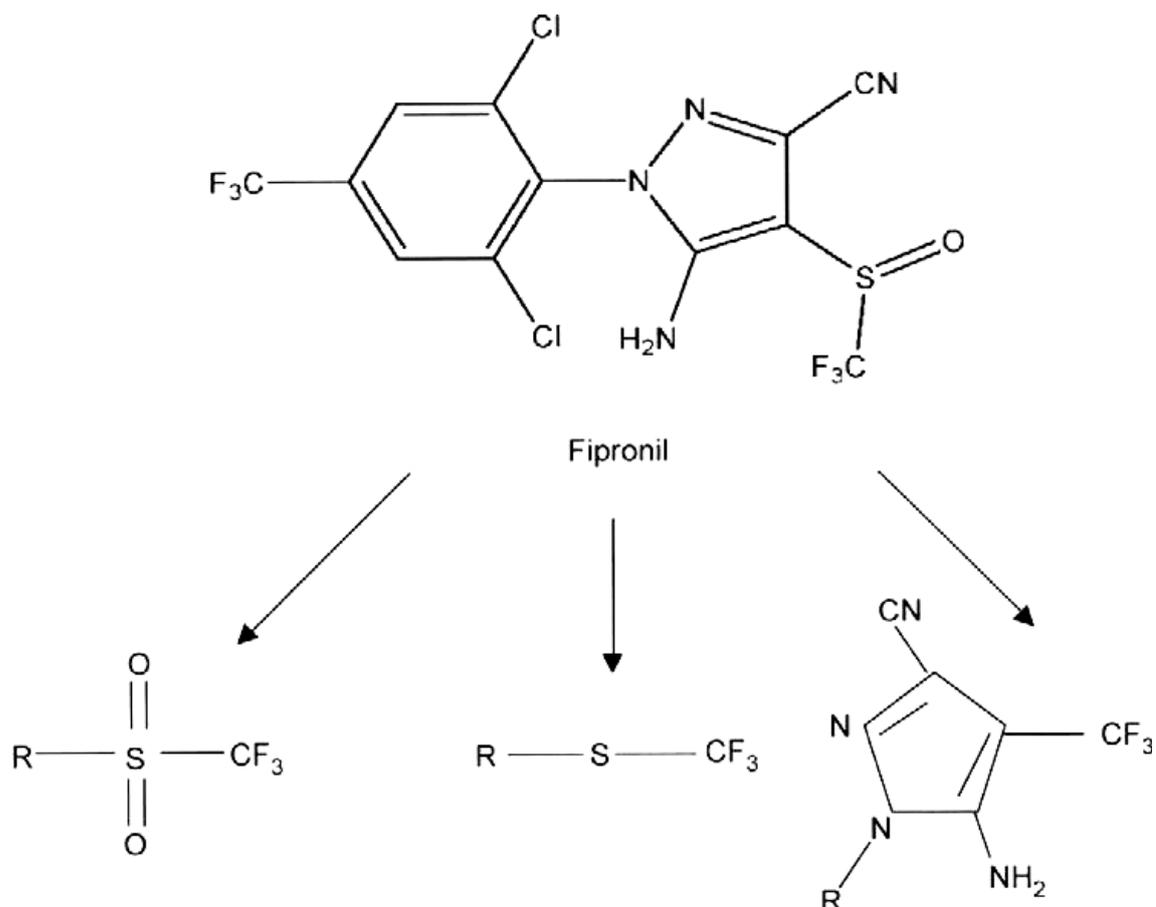


FIGURA 4. A BIOTRANSFORMAÇÃO DO FIPRONIL EM PEIXES.
 FONTE: SCHLENK, 2005.

V. BIOMONITORAMENTO DE POLUIÇÃO AMBIENTAL, BIOENSAIO E BIOMARCADORES

Para se entender melhor a ação tóxica de contaminantes, pode-se trabalhar com experimentos laboratoriais, chamados *bioensaios*, ou através de estudos diretos no campo, os *biomonitoramentos*. Apesar de no bioensaio serem gerados dados complementares, deve-se atentar para o fato de que nem sempre os dados gerados sob condições experimentais podem ser intimamente relacionados com o ambiente natural.

Para Van Gastel e Van Brummellen (1996), o termo *biomarcador* não deve ser confundido com *bioindicador* e com *indicador ecológico*. O primeiro seria qualquer resposta biológica para uma substância química presente no ambiente, possível de ser medida dentro do organismo ou em seus produtos (pêlos, urina, fezes, etc.), indicando um desvio da normalidade encontrada naqueles organismos não expostos ao elemento/substância. O segundo seria o

organismo do qual se está obtendo as informações das condições ambientais do seu habitat. O terceiro seria um parâmetro ecológico que descreve a estrutura e o funcionamento do ecossistema.

Os peixes são bons bioindicadores para bioensaios e biomonitoramentos, assim como mamíferos, pois podem sofrer bioacumulação, estão aptos a responder a agentes mutagênicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450, um sistema de enzimas monoxigenases com o grupo heme e com diferentes especificidades por substrato. Estas enzimas desempenham um papel fundamental no metabolismo de substâncias xenobióticas e de compostos endógenos (GOKSOYR *et al.* 1991).

Muitos biomarcadores têm sido utilizados como ferramentas para a detecção de exposição e para avaliação dos efeitos de poluição genotóxica. Esses biomarcadores consistem em testes como a avaliação de aberrações cromossômicas, adutos e quebras no DNA e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (BOMBAIL *et al.* 2001), além dos testes histopatológicos e o Ensaio Cometa.

Teste do Micronúcleo Písceo

O Teste do Micronúcleo Písceo é um biomarcador bastante utilizado em análises ambientais, tendo em vista que estudos de genotoxicidade usando análises citogenéticas em peixes demonstram a sensibilidade destes organismos (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Como o teste do micronúcleo é capaz de detectar tanto efeitos aneugênicos como clastogênicos, a genotoxicidade de uma grande variedade de compostos pode ser testada através dessa técnica (HEDDLE *et al.* 1991).

O princípio do teste do Micronúcleo baseia-se no fato de que, durante o processo de divisão celular, principalmente na anáfase, as cromátides e os fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para os pólos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômero sim. Após a telófase, os cromossomos sem dano são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas. No entanto, alguns elementos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nos núcleos formados e permanecem no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como micronúcleos (SCHMID, 1975) (Figura 5). Evidencia-se que o teste só pode ser realizado

com populações de células que tenham a capacidade de entrarem em divisão e preferencialmente que a análise seja feita após um único ciclo de divisão celular, pois existe a incerteza da permanência destas estruturas por mais de um ciclo de divisão (FENECH, 2000).

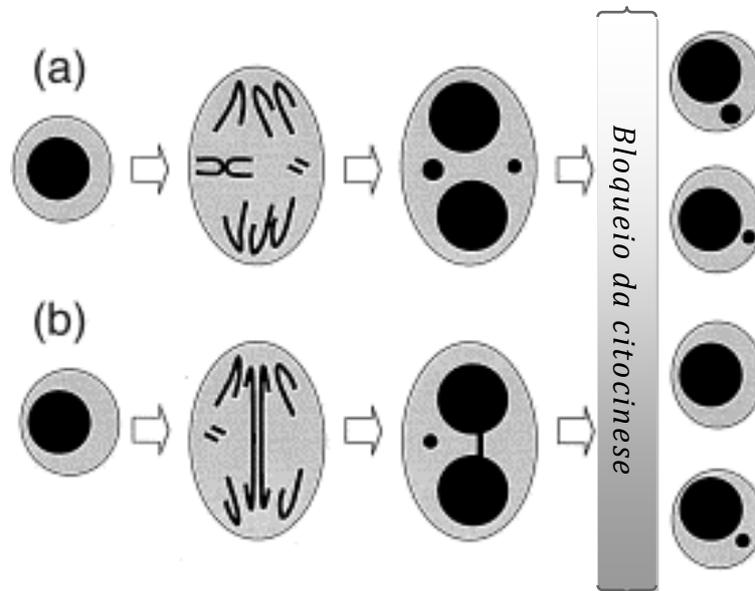


FIGURA 5. (A) ORIGEM DO MICRÔNÚCLEO A PARTIR DE UM FRAGMENTO CROMOSSÔMICO ACÊNTRICO OU DE UM CROMOSSOMO INTEIRO. (B) FORMAÇÃO DE UMA PONTE CITOPASMÁTICA E DE UM MICRÔNÚCLEO A PARTIR DE UM FRAGMENTO CROMOSSÔMICO ACÊNTRICO.

FONTE: ADAPTADO DE FENECH, 2000.

Alterações Morfológicas Nucleares

As alterações morfológicas nucleares têm sido interpretadas como lesões nucleares análogas aos micronúcleos. Os resultados de AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2000) mostraram que essas anomalias são induzidas por compostos genotóxicos bem-conhecidos, mesmo quando os micronúcleos não foram induzidos.

O DNA eucarioto está sequestrado no núcleo. Este é delimitado pelo envelope nuclear, formado por duas membranas concêntricas. O envelope nuclear é sustentado por duas redes de filamentos intermediários: uma, chamada de *lâmina nuclear* (Figura 6), forma um envoltório fino, subjacente à face interna da membrana nuclear; a outra, menor regularmente organizado, envolve a membrana nuclear externa. Acredita-se que a lâmina nuclear confere forma e estabilidade ao envelope nuclear, e está ancorada a complexos de poros nucleares e à membrana nuclear interna. Acredita-se

também que a cromatina interage diretamente com a lâmina nuclear, fornecendo ligação estrutural entre o DNA e o envelope nuclear (ALBERTS *et al.* 1997). Diante disto, pode-se concluir que as alterações na forma do núcleo se devem a problemas que afetem a lâmina nuclear.

Durante a mitose, o núcleo precisa ser desmontado, então a lâmina nuclear despolimeriza pelo menos em parte. Essa despolimerização da lâmina nuclear é provavelmente um pré-requisito para que o envelope nuclear seja quebrado em vesículas de membrana, que junto com o conteúdo nuclear são dispersos no citosol. A remontagem do núcleo ocorre quando as lâminas nucleares são desfosforiladas e se repolimerizam na superfície dos cromossomos. A lâmina remontada se liga as vesículas da membrana do envelope nuclear, que se fundem para novamente formar o envoltório íntegro (ALBERTS *et al.* 1997).

Conseqüentemente, sugere-se que problemas com a lâmina nuclear podem levar a problemas na mitose ou na meiose.

No caso dos humanos, já foi descoberto em crianças com a doença chamada progeria, que um gene defeituoso afeta a lâmina nuclear. Normalmente o núcleo tem uma estrutura circular, regular, por causa desse defeito genético, o núcleo forma bolhas, que causam a instabilidade e levam à morte das células (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa é uma técnica rápida e quantitativa na qual evidências visuais de dano ao DNA em células eucarióticas podem ser mensuradas. É baseado na quantificação de fragmentos de DNA desnaturado migrantes para fora do núcleo das células durante a eletroforese. Esse método tem ganhado amplo uso em várias áreas incluindo bimonitoramento, genotoxicidade, monitoramento ecológico e como uma ferramenta para pesquisa no dano ao DNA ou reparo em diferentes tipos de células em resposta a uma variedade de agentes danosos ao DNA (LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009). O Ensaio Cometa com tecido branquial pode ser relacionado com análises histopatológicas deste mesmo tecido.

Este teste parte do seguinte princípio: o comportamento do DNA em células individualizadas leva em conta sua organização dentro do núcleo. Para

ser compactado, após seu enovelamento com proteínas histônicas, o DNA forma alças de 5-200 Kpb as quais são aderidas a uma rede protéica ou matriz nuclear. Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes, e suas proteínas nucleares (inclui histonas) extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, maior e mais pesado que o restante dos componentes ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda a célula, permanecendo retido numa estrutura residual semelhante ao núcleo, designada nucleóide. Dentre as poucas proteínas que resistem a esta extração, estão as proteínas da matriz nuclear. Portanto, por definição, o nucleóide é uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual do tamanho do núcleo da célula. Caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofre mudanças, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um halo (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Análise Histopatológicas

Lesões histopatológicas e alterações genéticas, como aberrações nucleares, são também efeitos relatados em estudos prévios em organismos aquáticos em áreas impactadas (AKAISHI *et al.* 2004; MOUCHET *et al.* 2006).

Sobre as lesões histopatológicas Fent (1996) relata que os efeitos nas estruturas das células e tecidos constituem um importante parâmetro a ser considerado na avaliação do potencial tóxico de contaminantes sobre os organismos vivos. Este biomarcador tem sido utilizado em trabalhos de toxicologia, já que permitem avaliar possíveis efeitos de xenobiontes em órgãos e tecidos alvos.

A histopatologia permite, ainda, diferenciar lesões promovidas por doenças daquelas induzidas por outros fatores ambientais como a exposição a poluentes (SCHWAIGER *et al.* 1997).

A organização geral das brânquias de teleósteos baseia-se em um sistema de subdivisões sucessivas, e o seu epitélio é constituído por diversos tipos celulares, em particular, por células pavimentosas de revestimento, células de cloro e mucosas (MONTEIRO *et al.* 2004). As brânquias são órgãos envolvidos nas trocas gasosas, no balanço ácido-base, no transporte e excreção de compostos azotados (PERRY, 1997). A sua multifuncionalidade, a

vasta área de superfície que ocupa e a sua localização relativa ao meio externo fazem das brânquias um órgão chave para a ação dos poluentes existentes no meio aquático. Nesse sentido, as alterações histológicas da brânquia são reconhecidas como um método rápido e válido para determinar os danos causados pela exposição a diferentes poluentes nos peixes (ARELLANO *et al.* 1999).

Alterações morfológicas em brânquias podem representar estratégias adaptativas para conservação de algumas funções fisiológicas, podendo indicar respostas aos efeitos de agentes tóxicos presentes na água e sedimentos, sendo assim um eficiente indicador de qualidade de água (TKATCHEVA *et al.* 2003).

VI. *RHAMDIA QUELEN*

Rhamdia quelen (jundiá) (Figura 6) é um peixe de couro que tem distribuição desde o centro da Argentina até o sul do México. É uma espécie nativa no Brasil e adaptada a diversos ambientes, pois apresenta bons resultados com relação à criação, principalmente nas regiões mais frias. É uma espécie rústica, de rápido crescimento nos períodos mais quentes e que suporta bem as baixas temperaturas no sul do país. É resistente a variações de temperatura e salinidade e apresenta boa produtividade; sua carne é bastante apreciada para consumo (BARCELLOS *et al.* 2001a).



FIGURA 6. FOTO DE UM EXEMPLAR DE *Rhamdia quelen*.

FONTE: http://www.planetcatfish.com/cotm/cotm.php?article_id=279

2. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a toxicidade de três dosagens do inseticida/carrapaticida Fipronil utilizando o teste do micronúcleo Písceo, o Ensaio Cometa e análise histopatológica para aferir as taxas de danos em células branquiais e no DNA do peixe neotropical *Rhamdia quelen*.

I. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a frequência de micronúcleos em *Rhamdia quelen* exposto às concentrações de Fipronil 0,05 µg/L, 0,10 µg/L e 0,23 µg/L e com o grupo controle (não exposto a Fipronil).

- Comparar a frequência de dano no DNA branquial nas concentrações 0,5 µg/L, 0,10 µg/L e 0,23 µg/L de Fipronil e grupo controle.

- Avaliar a morfologia das brânquias entre os diferentes tratamentos de Fipronil (grupo controle, 0,5 µg/L, 0,10 µg/L e 0,23 µg/L).

3. JUSTIFICATIVA

O meio aquático é o último e principal recipiente de praticamente todos os resíduos das ações humanas. Diariamente, chegam às águas, milhares de toneladas de substâncias, da qual a maioria não se tem estudos adequados sobre seu impacto as comunidades aquáticas e que dela dependem. Diante da precariedade de estudos sobre o assunto, neste trabalho testamos a toxicidade do pesticida Fipronil e para isso usamos os peixes como organismos bioindicadores, que se destacam por apresentar uma confiável resposta ecotoxicológica aos contaminantes. A concentração máxima permitida pela legislação da Comunidade Européia é 0,10 µg/L para todos os agrotóxicos individualmente, em águas para consumo humano. Aqui, as concentrações testadas são esta (0,10 µg/L), metade desta(0,05 µg/L) e uma acima desta (0,23 µg/L) .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados em capítulos sob a forma de artigos que posteriormente serão submetidos aos periódicos citados na primeira página de cada capítulo.

CAPÍTULO I

Avaliação de genotoxicidade em *Rhamdia quelen* após Contaminação com sub-Crônica com Fipronil

Nédia de Castilhos Ghisi¹, Wanessa Algarte Ramsdorf¹, Marcos Vinícius Mocellin Ferraro², Marta Margarete Cestari¹.

¹ *Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR*

² *Colégio de Aplicação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.*

Nédia de Castilhos Ghisi

Departamento de Genética, Setor de Ciências biológicas, Jardim das Américas, UFPR, Centro Politécnico, CEP: 81531-990, Caixa Postal: 19071, Curitiba, Brazil

Email: nediaghisi@gmail.com

Este artigo será submetido para o periódico Environmental Monitoring and Assessment

Abstract

Diversos biomarcadores genéticos tem sido usados para avaliar os efeitos da poluição de agentes mutagênicos, tal qual metais e pesticidas, bem como uma grande variedade de substâncias químicas derivadas das atividades humanas. Este trabalho, portanto pesquisou os efeitos que uma exposição de 60 dias ao inseticida Fipronil, nas concentrações de 0,05µg/L, 0,10µg/L e 0,23µg/L, pode causar no peixe *Rhamdia quelen* através do Ensaio Cometa com brânquia e de análise histopatológicas de brânquias e do teste do Micronúcleo Písceo juntamente com Alterações Morfológicas Nucleares. Os resultados para o Ensaio Cometa e para lesões histopatológicas branquiais não mostraram diferença entre o grupo controle e os grupos contaminados. Para o teste do Micronúcleo Písceo, a menor concentração de Fipronil mostrou-se igual ao grupo controle, e as demais concentrações, acima do controle, com relação à taxa de dano ao DNA. Esses resultados sugerem que as concentrações testadas de Fipronil não foram suficientes para se detectar grandes alterações no DNA de *Rhamdia quelen* com os testes escolhidos, visto que outros trabalhos indicam que somente concentrações em ppm afetam peixes. A aplicação de testes com outras concentrações, outros tecidos e outros tempos de exposição fica como sugestão para trabalhos futuros.

Palavras chave: pesticidas, mutagênese, Ensaio Cometa, Teste do Micronúcleo Písceo.

Introdução

Vários produtos químicos são utilizados para minimizar a ação danosa de insetos, doenças e plantas daninhas de modo a reduzir as perdas na produção agrícolas (Ecobichom 2000). Atualmente a agricultura é extremamente dependente do uso dos agrotóxicos, e o abandono ou redução do uso destes causaria queda na produção agrícola, aumento nos custos de produção, elevação dos preços e, em alguns locais, fome e desnutrição (Knutson 1999). No entanto, esses pesticidas são usados em quantidades muito maiores que as necessárias, se tornando importantes poluentes ambientais (Townsend et al. 2006). De acordo com a Comunidade Européia, o limite para cada agrotóxico estabelecido é de 0,10 µg/L para águas superficiais (CEE, 1980). Entre estes pesticidas está o Fipronil, um inseticida e acaricida de amplo espectro. Sua degradação gera como subprodutos o Fipronil sulfídio, Fipronil sulfona, e desulfínifipronil, sendo estes metabólitos mais tóxicos a organismos aquáticos que o composto parental (U. S. EPA, 1996). Segundo Faouder et al. (2007) o Fipronil pode afetar insetos não alvo, como as abelhas melíferas. Por esta razão a França proibiu a comercialização do Fipronil desde 1999. Outros três países já proibiram a aplicação do Fipronil desde então: a Itália, a Alemanha e a Eslovênia. Sugere-se também que ambientes não-alvo podem ser afetado, como o leite de vacas alimentadas com milho tratado com Fipronil. O Fipronil do alimento foi transferido para o leite sob sua forma de sulfona (Faouder et al. 2007).

O impacto de materiais tóxicos na integridade e funcionamento do DNA tem sido investigado de diversas maneiras sob diferentes condições (McCarthy and Shugart 1990). O uso de biomarcadores como uma medida de respostas biológicas em organismos afetados é muito importante para simplificar e diminuir os custos do monitoramento biológico, especialmente em ambientes aquáticos. Esses biomarcadores consistem em adutos de DNA, aberrações cromossômicas, quebra de DNA, frequências de micronúcleos e outras anormalidades nucleares (Bombail et al. 2001). Peixes são um dos organismos mais indicados para o monitoramento de ambientes aquáticos (Van der Oost et al. 2003), contudo, há poucos estudos de toxicidade realizados na América do Sul com peixes de água doce atualmente (Akaishi et al. 2004; Rabitto et al. 2005).

Um método particularmente bem estabelecido que se faz útil na avaliação de efeitos genotóxicos de uma ampla escala de compostos, tanto em peixes (Al-Sabti e Metcalfe 1995) como em outras espécies (Grisolia et al. 2004), é o ensaio de indução de Micronúcleo (Schmid 1975). Para Hose et al. (1987) este teste revelou grandes potencialidades por ser de rápida execução, não dispendioso e um excelente indicador da contaminação química dos peixes.

Micronúcleos são pequenas massas de cromatina citoplasmática, presentes fora do núcleo principal nas células, que podem se originar tanto de uma quebra cromossômica ou da disfunção do aparelho do fuso mitótico (Heddle et al. 1991), ou seja, são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular (Bombail et al. 2001).

Embora haja um nível basal de formação de micronúcleos espontâneos mensurável na maioria das espécies de peixes (Al-Sabti e Metcalfe 1995), a exposição a larga escala de clastógenos tanto em

laboratório como no campo (Bombail et al. 2001; Grisolia e Starling 2001; Rodrigues-zea et al. 2003) tem mostrado elevar a frequência de micronúcleos.

O Ensaio Cometa, por sua vez, foi primeiramente aplicado para ecotoxicologia cerca de 15 anos atrás, e tornou-se um dos mais populares testes para detecção de quebras de fita em animais aquáticos tanto em exposições *in vitro*, *in vivo* e *in situ* (Ohe et al. 2004).

As vantagens do Ensaio Cometa incluem: (a) o dano genotóxico é detectado a nível de célula individual; (b) a maioria dos tipos celulares eucariotos são apropriados ao Ensaio Cometa; (c) somente um pequeno número de células são requeridas; (d) é geralmente mais fácil de conduzir e mais sensível que outros métodos disponíveis para a avaliação de quebras de fita; (e) quebras de fita de DNA formam-se rapidamente após exposição genotóxica, permitindo uma avaliação precoce da resposta na biota (Frenzilli et al. 2008).

Lesões histopatológicas juntamente com alterações genéticas, como aberrações nucleares, são também efeitos relatados em estudos prévios em organismos aquáticos em áreas impactadas (Akaishi et al. 2004; Mouchet et al. 2006). Efeitos nas estruturas das células e tecidos constituem um importante parâmetro a ser considerado na avaliação do potencial tóxico de contaminantes sobre os organismos vivos. Este biomarcador tem sido utilizado em trabalhos de toxicologia, já que permitem avaliar possíveis efeitos de xenobiontes em órgãos e tecidos alvos. (Fent 1996).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do pesticida Fipronil, num exposição de 60 dias ao peixe neotropical *Rhamdia quelen*, nas concentrações de 0,05µg/L, 0,10µg/L e 0,23µg/L, através do teste do Micronúcleo Písceo e alterações morfológicas nucleares, do ensaio Cometa de brânquia e do teste histopatológico com brânquia.

Material e Métodos

Desenho Experimental

O peixe escolhido como modelo para o bioensaio foi *Rhamdia quelen*, um peixe neotropical. Nós usamos 15 animais para cada grupo, um grupo sendo exposto a 0,05 µg/L, outro a 0,10 µg/L e outro a 0,23 µg/L de Fipronil. Além disso, um grupo foi mantido sem exposição, como grupo controle. Cada grupo foi mantido em um aquário separado e aclimatado em tanques aerados em temperatura constante (22°C) sob um fotoperíodo de 12 horas de luz/escuridão.

Depois de 60 dias de exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína 20% para evitar sofrimento dos animais.

Teste do Micronúcleo Písceo

Para o teste do Micronúcleo Písceo nos usamos o protocolo de Heddle (1973) e Schmid (1975), com modificações de Ferraro et al (2004). Para cada peixe 1000 eritrócitos foram examinados sob uma magnificação de 1000X e escorados pela presença de micronúcleos típicos e alterações morfológicas nucleares, manifestadas como uma mudança na forma normal elíptica do núcleo (Ayllon e Garcia-Vazquez 2000). Ambas as características foram consideradas como anomalias nucleares e contadas juntas.

Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa com brânquias foi feito de acordo com Speit and Hartmann (1999), com modificações de Ferraro et al. (2004) e Cestari et al. (2004). As células branquiais utilizadas para o ensaio cometa, foram homogeneizadas (homogenizador Potter type a 1500 rpm) em soro bovino fetal. Da solução, 15 µL foi misturado com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP – 0,5%). A suspensão foi espalhada sobre lâminas previamente cobertas com uma camada de agarose normal. As lâminas foram colocadas em solução de lise (lise estoque: NaCl, 2,5M; EDTA, 100 mM; Tris, 10 mM; NaOH, 0,8%; N-lauryl-sarcosinate, 1%; solução de lise para trabalho: 1 ml Triton X100; 10 ml DMSO; e 89 ml de solução de lise estoque) por 24 horas a 4°C. Num próximo passo, as lâminas foram submetidas a eletroforese, sendo primeiramente imersas em NaOH e 200mM EDTA, pH>13. As lamínas permaneceram submersas por 20 min, para efeito de desnaturação, e após seguiu-se a eletroforese a 300mA e 25V. Seguiu-se a neutralização em 0,4M Tris, pH 7.5 e fixação em etanol por 10 min. Após, as lamínas foram coradas com 20 µL de uma solução de 10 µL/mL de brometo de etídeo. Os cometas foram escorados usando um microscópio de epifluorescência Leica. Para cada peixe, 100 nucleóides foram analisados (Kobayashi et al. 1995), utilizando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA do núcleo, nas classes 0 (sem dano visível), classe 1 (pequeno dano), classe 2 (dano médio), classe 3 (dano extenso), e classe 4 (dano máximo). O escore foi calculado pela multiplicação do número de núcleos encontrados em uma determinada classe pelo número da classe.

Histopatologia

Amostras de brânquias foram preservadas em solução fixadora de Alfac por 16 horas (85mL de etanol 80% ; 10mL de formalina 40%; e 5mL de ácido acético glacial para 100mL de solução), desidratadas em séries graduais de banhos de etanol, e embebidas em resida Paraplast-Plus (Sigma). Secções (5mm de espessura) foram coradas com Hematoxilina/Eosina e observadas sob um fotomicroscópio Leica. Lesões morfológicas foram analisadas de acordo com o índice de injúria descrito por Bernet et al. (1999) e classificadas sob 3 fatores de severidade (mínimo, moderado e de notável importância patológica). A partir deste fator de severidades fez-se uma análise qualitativa.

Análise dos dados

A avaliação da frequência de micronúcleos e outras alterações morfológicas nucleares, bem como o ensaio cometa comparando grupos controle negativo e contaminados através do teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney. Resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

No teste do micronúcleo písceo não houveram micronúcleos, somente alterações morfológicas nucleares. No teste do micronúcleo písceo obteve-se que o grupo controle apresentou taxa de dano semelhante ao grupo contaminado com 0,05 µg/L. Os dois grupos contaminados nas concentrações maiores tem uma taxa de dano significativamente maior que a do controle (Ilustração 1). Algumas alterações morfológicas nucleares encontradas neste trabalho estão na Ilustração 2.

O resultado para o Ensaio Cometa não revelou diferença na comparação entre nenhum dos tratamentos com relação à taxa de dano ao DNA. Isto é, nenhum dos grupos contaminados mostrou-se diferente do grupo controle negativo (Ilustração 3).

Entre as alterações histopatológicas encontradas nas brânquias, destacam-se aneurismas e fusão lamelar (Ilustração 4) para todos os grupos avaliados, inclusive o controle. Estas são alterações de estágio (w) I e algumas de estágio II, ambas sendo das classes menos severas, apesar de promoverem o comprometimento até moderado da função branquial. Através de análise qualitativa, não se constatou diferença entre o grupo controle e os diferentes tratamentos contaminados, quando se refere à análise histológica de brânquias, corroborando o resultado para o Ensaio Cometa deste mesmo tecido.

Discussão e Conclusões

No presente trabalho, o teste do Micronúcleo Písceo revelou que os grupos contaminados às concentrações de 0,10 e 0,23 µg/L de Fipronil tiveram maior taxa de dano no DNA quando comparado com o grupo de controle negativo e com a concentração menor. No entanto, não revelou diferença entre o grupo controle e a concentração mais baixa de Fipronil. Sugere-se por este teste que o Fipronil em concentrações maiores pode induzir algum dano ao DNA de *Rhamdia quelen*.

Já para o Ensaio Cometa de brânquias obteve-se que todos os grupos contaminados tiveram dano similar ao grupo de controle, o que foi corroborado pelas análises histopatológicas deste mesmo tecido.

Nas análises histopatológicas, foram encontradas algumas alterações nas brânquias de *Rhamdia quelen*, principalmente aneurismas, hiperplasia e fusão lamelar. Essas alterações foram observadas igualmente em todos os tratamentos, inclusive no grupo controle. Além disso, a maioria dessas lesões é considerada de baixa gravidade e regressão possível, se a fonte estressora for eliminada.

Pode-se assim relacionar estes resultados com as baixas concentrações de contaminante utilizadas e com o tempo sub-crônico de duração do ensaio; pois a presença de lesões nas brânquias de peixes pode ser interpretada como resultado de efeitos agudos de xenobiontes (Zodrow et al. 2004).

Alguns autores demonstraram que em exposições prolongadas, a frequência de micronúcleos em eritrócitos de peixes mostra um decréscimo depois de 15 e 21 dias de exposição (Campana et al. 1999; De Lemos et al. 2001). Essas diferenças parecem estar associadas à cinética de remoção das células (Cavas and Ergene-Gozukara 2003) ou ao desenvolvimento de mecanismos adaptativos de tolerância ao estresse causado por químicos tóxicos que promovem um aumento na taxa de substituição de células mortas ou danificadas para manter condições fisiológicas normais (Mersch et al. 1996).

Al-sabti and Metcalfe (1995) ainda demonstram que a indução máxima de micronúcleos ocorre normalmente de um a cinco dias após a exposição.

A comunidade européia estabelece um limite de 0,10 µg/L de cada agrotóxico individualmente para águas superficiais de consumo humano (CEE 1980). Neste trabalho, utilizamos esta concentração limite, além da outras duas: 0,05 e 0,23 µg/L de Fipronil. Isto pode justificar o fato que, de modo geral, nossos testes não revelaram taxa de dano aumentada dos grupos contaminados com relação ao grupo controle. Isto é, o limite estabelecido pela comunidade européia é um limite seguro.

Portanto, a dose 0,10 µg/L de Fipronil aceita pela comunidade européia, quando testada com os biomarcadores usados neste trabalho, não revelou taxa de dano alterada; a dose 0,05µg/L está abaixo

desta dose padrão estabelecida, e talvez 0,23 µg/L não seja uma concentração maior suficiente para elevar significativamente a taxa de dano ao DNA no Ensaio Cometa. São necessários estudos adicionais, com concentrações variando entre casas decimais (por exemplo: 0,1 µg/L; 1µg/L e 10 µg/L) e não somente na mesma casa decimal, para se obter um resultado mais demonstrativo neste peixe.

Para suportar esta hipótese, tem-se, por exemplo, que para o Fipronil a dose letal 50% (LC₅₀) é 0,246 mg/L para a truta arco-íris, 0,083mg/L para o peixe “bluegill”, e 0,130 mg/L para “sheepshead minnows” (*Cyprinodon variegatus variegatus*) (U. S. EPA 1996). Estas doses estão bem acima das doses aqui testadas.

Wirth et al. (2004) analisou os impactos do Fipronil em uma réplica de mesocosmo e encontrou que não houve efeito associado com o Fipronil em mariscos (*Mercenaria mercenaria*) nem em ostras (*Crassostrea virginica*), nem peixes (*Cyprinodon variegatus*). Neste trabalho, o Fipronil só afetou camarões (*Palaemonetes pugio*). A maior concentração usada por Wirth et al. (2004) foi 5µg/L, isto é, 21 vezes maior que a maior das concentrações utilizada no presente trabalho. Estes estudos supracitados corroboram a hipótese de que as concentrações aqui estudadas mostraram-se insuficientes para uma resposta perceptível.

O Fipronil é um inseticida/ acaricida de ‘nova geração’ e é altamente tóxico a muitas espécies aquáticas (U.S. EPA 1996) podendo se bioacumular em algumas. Em um trabalho de bioacumulação, trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram alimentados com ração contaminada com Fipronil na concentração de 10µg/g de alimento. Como resultado, obteve-se que a exposição ao Fipronil não apresentou influência a saúde da truta arco-íris. Não houve mortalidade, o comportamento e a coloração dos peixes tratados com Fipronil foram similares aos dos peixes controles. Com relação a bioacumulação, neste trabalho, o Fipronil foi rapidamente eliminado do peixe e não mais detectado depois do 34º dia de depuração (Konwick et al. 2004).

Em contrapartida, um trabalho mais recente, de Miranda et al. (2008) observou a presença de Fipronil no músculo e fígado do peixe *Hoplias malabaricus* do Lago de Ponta Grossa, no Paraná. Em ambos os tecidos, encontrou-se este agrotóxico em 30% dos indivíduos, com concentrações máximas de 42,3 ng.g⁻¹ e 58,6 ng.g⁻¹ de peso seco, respectivamente. Além disso, houve uma forte correlação de Pearson entre a concentração de lipídeos e o Fipronil.

Fipronil é uma classe de inseticidas conhecido como fenilpirazol que são reconhecidos como um disruptor dos canais de cloro ligados com ácido γ-aminobutírico (GABA) nas células nervosas, levando a hiper-excitação e eventual mortalidade dos insetos (Gant et al. 1998). Este é muito mais tóxico em invertebrados que vertebrados devido a suas diferentes afinidades de ligação do receptor GABA (Hainzl et al. 1998).

Neste sentido, testes laboratoriais do Fipronil e seus produtos de degradação têm revelado toxicidade letal aguda em concentrações consideradas “muito baixas” (LC₅₀) de <0,5µg/L para macroinvertebrados aquáticos selecionados (Mize et al. 2008). Isto significa que a concentração usada no presente trabalho é menor do que LC₅₀ para macroinvertebrados aquáticos, que são animais mais sensíveis que peixes, considerando-se que o Fipronil é mais tóxico em invertebrados por sua especificidade aos canais GABA destes (Hainzl et al. 1998).

Chandler et al. (2004) reportou que a fertilidade, reprodução e desenvolvimento de um copépodo estuarino foi afetada pelo Fipronil na concentração de 0,22 µg/L.

Se o contaminante é um poluente também depende de seu nível no ambiente, do organismo considerado, e se o organismo é danificado. Assim, um composto pode responder a descrição de poluente para um organismo, mas não para outro (Walker et al. 2006).

Por instância, níveis ppt (ng/L) de Fipronil afetam camarões “Mysid” e níveis ppb (µg/L) afetaram *Daphnia* de água doce e o peixe “Bluegill sunfish” (Gunasekara and Troung, 2007). No presente trabalho foi usada a concentração em níveis de ppt (ng/L), ou seja, as concentrações testadas correspondem, respectivamente, a 50 ng/L, 100 ng/L e 230 ng/L, suportando a idéia de que baixas concentrações deste poluente acusam respostas apenas de invertebrados, mais sensíveis que peixes devido a especificidade do Fipronil.

Rhamdia quelen é uma espécie rústica, que se adapta a vários ambientes, com resistência a variações de a temperatura e salinidade (Barcellos et al. 2001a). Além disso, trabalhos prévios têm documentado respostas fisiológicas e bioquímicas nos estudos de exposição a agrotóxicos, como por exemplo, herbicidas (Miron et al. 2005; Crestani et al. 2006; Gluszczak et al. 2007); esses estudos mostram que vários parâmetros são alterados, tal como glicogênio, lactato e níveis de glicose nos tecidos e atividade da acetilcolinesterase no cérebro.

Com relação às análises histopatológicas, Thophon et al. (2003) também afirma que a *exposição aguda* a algum poluente presente no ambiente afeta o funcionamento das brânquias e pode levar o peixe a morte. Os efeitos dos contaminantes ambientais sobre as brânquias dos peixes podem ser particularmente graves, já que as brânquias servem como o principal órgão para a respiração e regulação osmótica e iônica.

A hiperplasia, encontrada neste estudo nas brânquias de *Rhamdia quelen*, caracteriza-se pelo aumento na proliferação das células, podendo levar à fusão das lamelas e, mais raramente, dos filamentos (Heath 1987). A fusão lamelar é um mecanismo natural de defesa para proteger o epitélio da lamela do contato direto dos agentes tóxicos (Heath 1987; Ojha 1999).

Também foram vistos aneurismas. O aneurisma normalmente resulta do colapso do sistema de células pilares, que prejudica a integridade vascular com a liberação de grande quantidade de sangue que empurra o epitélio lamelar para fora (Heath 1987).

O Fipronil, vendido no Brasil como Regent® é usado para controlar pragas, em amplo espectro no campo, podendo afetar também insetos não alvo, sendo considerado um dos inimigos mais implacáveis das abelhas melíferas (Faouder et al. 2007), importantes na polinização. Por esta razão a França proibiu a comercialização do Fipronil, desde 1999. Outros três países já proibiram a aplicação do Fipronil: a Itália, a Alemanha e a Eslovênia.

Faouder et al. (2007) ainda sugere que ambientes não alvo, como o leite produzido por vacas alimentadas diariamente com silagem de milho feita de grãos tratados com Fipronil, pode ser afetado. Esse trabalho mostra uma transferência do Fipronil do alimento para o leite sob sua forma de sulfona. Além do mais, traços de resíduos de Fipronil no milho e soja, trigo e palha mostram uma contaminação difusa deste pesticida no ambiente.

Em um trabalho de monitoramento de agrotóxico em dois mananciais no Rio Grande do Sul, o Fipronil representa 16% das análises de resíduos de agrotóxicos, testados por Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD). Neste mesmo trabalho, o inseticida Fipronil foi detectado apenas na primeira data das sete coletas, no entanto, neste momento foram encontrados resíduos em todos os pontos de coleta. A máxima concentração encontrada para este inseticida foi cerca de 380 vezes superior ao limite de detecção (1,14 µg/Kg), que corresponde a 0,003 µg/Kg (Grützmacher et al. 2008). Esta concentração citada acima (1,14 µg/Kg) corresponde a quase cinco vezes a maior concentração testada nesta dissertação (0,23 µg/L) e mais de onze vezes o limite permitido pela comunidade europeia (0,10 µg/L).

Em ratos, o Fipronil (em concentrações de 70, 140 e 280 mg/kg) pode perturbar a função da tireóide pelo decréscimo das concentrações do plasma da tiroxina total (T4), provavelmente através do aumento da desobstrução do T4 e aumenta as concentrações de TSH plasmáticas. Além de diminuir as concentrações de T3 total e TH livre no plasma. (Leghait et al. 2009). Além disso, o Fipronil alterou o funcionamento normal do sistema endócrino e causou efeitos reprodutivos adversos em fêmeas de rato “Winstar” (Ohi et al. 2004).

Os metabólitos da degradação do Fipronil (sulfídio de Fipronil, sulfona de Fipronil e desulfínifipronil) são mais tóxicos a organismos aquáticos que o composto parental. Por exemplo, o desulfínifipronil, uma forma fotodegradada do Fipronil é extremamente estável e é mais tóxica que o composto do qual é derivado (U. S. EPA 1998).

No estudo sobre a degradação do Fipronil no sedimento, a meia-vida do Fipronil foi mais curta em concentrações mais altas, o contrário do que ocorre a maioria dos agrotóxicos. Enquanto inicialmente parece vantajoso que o Fipronil tenha uma meia-vida mais curta nos sedimentos, essa degradação é insignificante, dado que o Fipronil degrada-se em fipronil-sulfídio e fipronil-sulfona, que são similares em potencial tóxico ao Fipronil, e exibem maior estabilidade ambiental sob as condições testadas (Brennan et al. 2009).

Tan et al. (2008) examinaram a degradação microbiológica da mistura racêmica das formas quirais do Fipronil, os enantiopuros Fipronil-R e -S, em ambiente aeróbico e solos de várzea inundado. Seus resultados sugerem que diferentes tipos de degradação de enantiômeros de Fipronil, bem como a formação de diferentes metabólitos tóxicos sob condições aeróbicas e inundadas, deveriam ser considerados para avaliações precisas tanto de riscos ambiental quanto ecológico para os agrotóxicos quirais.

Estudos recentes demonstram o potencial dos agrotóxicos para inibir ou induzir enzimas que metabolizam xenobiontes em humanos. Exposição de hepatócitos humanos a doses de Fipronil de 0,1 a 25 µM resultaram em um aumento dependente da dose na expressão do RNAm CYP1A1 como medido pelo método de “DNA branched”, além de induzir formação de isoformas CYP e citotoxicidade nos hepatócitos humanos (Das et al. 2006).

A agência de proteção ambiental dos USA diz que o Fipronil é altamente tóxico a peixes, invertebrados aquáticos e pássaros voadores, mas relativamente menos tóxico a mamíferos, galinhas d'água, e outras espécies de pássaros (U. S. EPA, 1996).

Por fim, conclui-se que a concentração testada do contaminante Fipronil não foi suficiente para detectar-se uma alteração no DNA de *Rhamdia quelen* com os biomarcadores utilizados, após uma exposição semi-estática de 60 dias. Estudos posteriores com concentrações mais altas, outros tempos de exposição, outros tecidos e testes mais sensíveis são sugeridos.

References

Akaishi, F. M., Silva de Assis, H. C., Jakobi, S. C. G., Stjean, S., Couternay, S. C., Lima, E., Wagner, A. L. R., Scofield, A., Oliveira Ribeiro, C. A. (2004). Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46, 244-253.

Al-Sabti, K., Metcalfe, C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343, 121-135.

Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E. (2000). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research*, 467, 177-186.

Barcellos, L. J. G., Wassermann, G. F., Scott, A. P., Woehl, V. M., Quevedo, R. M., Itzes, I., Krieger, M. H., Lulhier, F. (2001a). Steroid profiles in cultured female jundia, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 121, 325-332.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22, 25-34.

Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., Batty, J. (2001). Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, 44, 383-392.

Brennan, A. A., Harwood, A. D., You, J., Landrum, P. F., Lydy, M. J. (2009). Degradation of Fipronil in anaerobic sediments and the effect on porewater concentrations. *Chemosphere*, 77, 22-28.

Campana, M. A., Panzeri, A. M., Moreno, V. J., Dulout, F. N. (1999). Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutation Research*, 438, 155-161.

Çavas, T., Ergene-Gozukara, S. (2003). Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538(1), 81-91.

CEE – Comunidade Econômica Européia. Directiva 80/778/CEE relativa à qualidade de águas destinadas ao consumo humano. **Jornal Oficial da Comunidade Européia**, n.L299, 20p. (1980).
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31980L0778:PT:HTML>
Accessed 10 December 2009.

Cestari, M. M., Lemos, P. M. M., Oliveira - Ribeiro, C. A., Costa, J. R. M. A., Pelletier, E., Ferraro, M. V. M., et al. (2004). Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genetics and Molecular Biology*, 27(2), 270-274.

- Chandler, G. T., Cary, T. L., Volz, D. C., Walse, S. S., Ferry, J. L., KLOSTERHAUS, S. L. (2004). Fipronil effects on copepod development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 117-124.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D. S., Lazzari, R., Duarte, M. F., Morsch, V. M., Pippi, A. L., Vieira, V. P. (2006). Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 65, 48-55.
- Das, P. C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E., Rose, L. R. (2006). Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 164, 200-214.
- De Lemos, C. T., Rodel, P. M., Terra, N. R., Erdtmann, B. (2001). Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environmental Toxicology Chemistry*, 20, 1320-1324.
- Ecobichon, D. J. (2000). Our changing perspectives on benefit and risks of pesticides: a historical overview. *Neuro Toxicology*, 21, 211-218.
- Faouder, J. Le, Bichon, E., Brunshwig, P., Landelle, R., Andre, F., Bizec, B. Le. (2007). Transfer assessment of Fipronil residues from feed to cow Milk. *Talanta*, 73, 710-717.
- Fent, K. (1996). Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 26(1), 3-10.
- Ferraro, M. V., Fenocchio, A. S., Mantovani, M. S., Cestari, M. M., Ribeiro, C. A. O. (2004). Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the Comet Assay, Piscine Micronucleous and Chromosome Aberrations tests. *Genetics and Molecular Biology*, 27(1), 103-107.
- Frenzilli, G., Falleni, A., Scarcelli, V., Del Barga, I., Pellegrini, S., Savarino, G., Mariotti, V., Benedetti, M., Fattorini, D., Regoli, F., Nigro, M. (2008). Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus* from a contaminated freshwater ecosystem. *Aquatic Toxicology*, 89, 188-196.
- Gant, D. B., Chalmers, A. E., Wolff, M. A., Hoffman, H. B., Bushey, D. F. (1998). Fipronil: action at the GABA receptor. *Reviews in Toxicology*, 2, 147-156.
- Gluszczak, L., Miron, D. S., Moraes, B. S., Simões, R. R., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M., Loro, V. L. (2007). Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Physiology and Biochemistry*, 146C, 519-524.
- Grisolia, C. K., Starling, F. L. R. M. (2001). Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoa, under influence of sewage treatment plant discharges, Mutation Research. *Genet.Toxicol. Environ. Mutagen.* 491, 39-44.
- Grisolia, C. K., Bilich, M. R., Formigli, L. M. A. (2004). Comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 123-126.
- Grützmacher, D. D., Grützmacher A. D., Agostinetto, D., Loeck, A. E., Roman, R., Peixoto, S. C., Zanella, R. (2008). Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 12(6), 632-637.

- Gunasekara, A. S., Troung, T. (2007). Environmental fate of Fipronil. *Environmental Monitoring Branch. Department of Pesticide Regulation. California Environmental Protection Agency. USA.*
- Hainzl, D., Cole, L. M., Casida, J. E. (1998). Mechanisms for selective toxicity of Fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chemical Resources Toxicology*, 11, 1529-1535.
- Heath, A. G. (1987). Toxicology, water pollution and fish physiology, *CRC. Press.*
- Heddle, J. A. (1973). A rapid in vivo test for chromosome damage. *Mutation Research*, 18, 187-192.
- Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J. D., Vanparys, P., Macgregor, J. T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage; past, present and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18, 277-291.
- Hose, J. E., Cross, J. N., Smith, S. G., & Diehl, D. (1987). Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated of southern California. *Marine Environmental Research*, 22, 167-176. doi:10.1016/0141-1136(87)90034-1.
- Knutson, R. D. (1999). *Economic impacts of reduced pesticide use in the United States: measurement of costs and benefits.* Agricultural and Food Policy Center. AFPC 99- 2, 21p.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., & Sofuni, T. (1995). A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *Mammalian Mutagenicity Study Group Communications*, 3, 103-115.
- Konwick, B. J., Fisk, A. T., Avants, J. K., Long J. M., Garrison, A. W. (2004). Bioaccumulation And Enantioselective Biotransformation Of Fipronil By Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality.* Proceedings of the Eighth International Symposium in China. U.S. Environmental Protection Agency.
- Leghait, J., Véronique, G., Nicole, P. H., Marion, C., Elisabeth, P., Pierre-Louis T., Catherine, V. (2009). Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology*, 255, 38-44.
- Miranda, A. L., Roche, H. B., Randi, M. A. F., Menezes M. L., Oliveira Ribeiro C. A. (2008). Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. *Environment International*, 34, 939-949.
- Miron, D., Crestani, M., Schetinger, M. R., Morsch, V. M., Baldisserotto, B., Tierno, M. A., Moraes, G., Vieira, V. L. P. (2005). Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuronmethyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicology Environmental Safety*, 61, 398-403.
- Mize, S. V., Porter, S. D., Demcheck, D. K. (2008). Influence of Fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate communities in streams of southwestern Louisiana, USA. *Environmental Pollution*, 152, 491-503.
- Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Jourdain, M. J., Ferrier, V., Triffault, G., Devaux, A. (2006). Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox® and Ames tests). *Science of the Total Environment*, 355(1-3), 232-246.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. (2004). Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, 567, 109-149.

Ohi, M., Dalsenter, P. R., Andrade, A. J. M., Nascimento, A. J. (2004). Reproductive adverse effects of Fipronil in Wistar rats. *Toxicology Letters*, 146, 121-127.

Ojha, J. Fish gills: potential indicators of ecodegradation of aquatic environments. In: Mittal, A. K., Eddy, F. B., Dattamunshi, J. S. (Editors) (1999). *Water/air transition in biology*. USA: Science Publishers, cap. 18, 263-279.

Rabitto, I. S., Alves Costa, J. R. M., Silva de Assis, H. C., Pelletier, E., Akaishi, F. M., Anjos, A., et al. (2005). Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(2), 147-156. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.03.002.

Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E. (2003). Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 56, 442-448.

Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, 9-15.

Speit, G., Hartmann, A. (1999). The comet assay (singlecell gel test), a sensitive test for the detection of DNA damage and repair. In D. S. Henderson (Ed.), *Methods in molecular biology: DNA repair protocols—eukaryotic systems* (pp. 203-211). Totowa: Human.

Tan, H., Cao, Y., Tang, T., Qian, K., Chen, W., Li, J. (2008). Biodegradation and chiral stability of Fipronil in aerobic and flooded paddy soils. *Science of the total environment*, 407, 428-437.

Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., Jaritkhuan, S. (2003). Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 121, 307-320.

Towsend, C. R., Begon, M., Harper, J. L. (2006). *Fundamentos em Ecologia*. Artmed, 2ª Ed. 592p.

United States Environmental Protection Agency. (1996). *Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. New pesticide fact sheet*. EPA-737-F-96-005, Washington, D.C.

<http://www.epa.gov/EPA-PEST/1996/June/day-12/Factsheet.pdf>.

Accessed 28 August 2009.

United States Environmental Protection Agency. (1998). *Office of Prevention, Pesticide and Toxic Substances. Fipronil for use on rice (Regent®, Icon®) and pets (Frontline®)*. HED risk assessment. Washington, D.C., p. 19,20,22.

Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6 .

Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., Peakall, D. B. (2006). *Principles of Ecotoxicology*. 3ª Ed. CRC Press.

<http://books.google.com/books?id=cFHEkzFJxQUCeprintsec=frontcoverehl=pt-BR>

Accessed 28 August 2009.

Wirth, E. F., Pennington, P. L., Lawton, J. C., Delorenzo, M. E., Bearden, D., Shaddrix, B., Sivertsen, S., Fulton, M. H. (2004). The effects of the contemporary-use insecticide (Fipronil) in an estuarine mesocosm. *Environmental Pollution*, 131, 365-371.

Zodrow, J. M., Stegeman, J. J., Tanguay, R. L. (2004). Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorobibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 66, 25-38.

ANEXO 1 – FIGURAS.

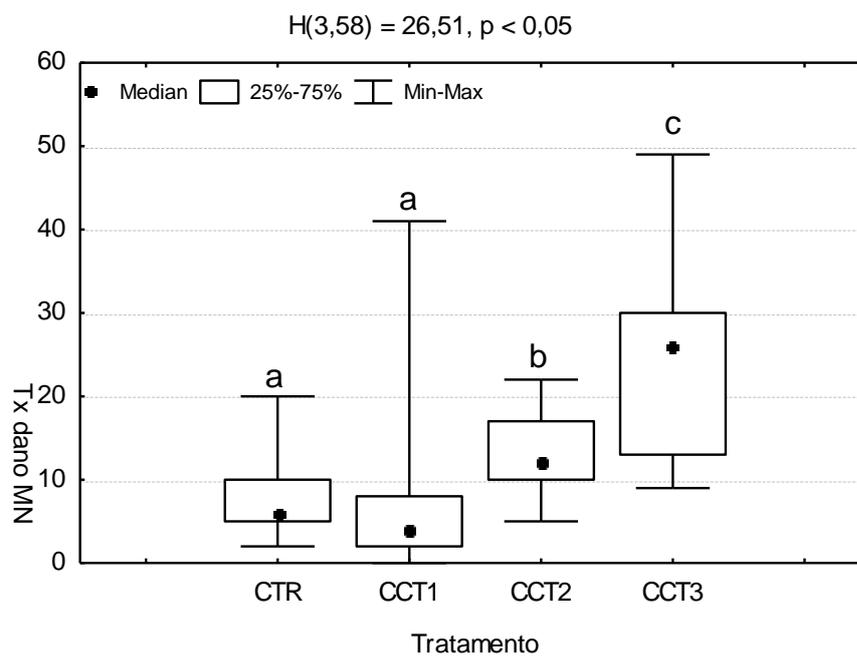


Ilustração 1. Comparação entre tratamentos – MNT. H= Resultado para o Kruskal-Wallis; CTR= Grupo controle; CCT1= grupo contaminado com 0,05 µg/L de Fipronil; CCT2= grupo contaminado com 0,10 µg/L; CCT3= grupo contaminado com 0,23 µg/L.

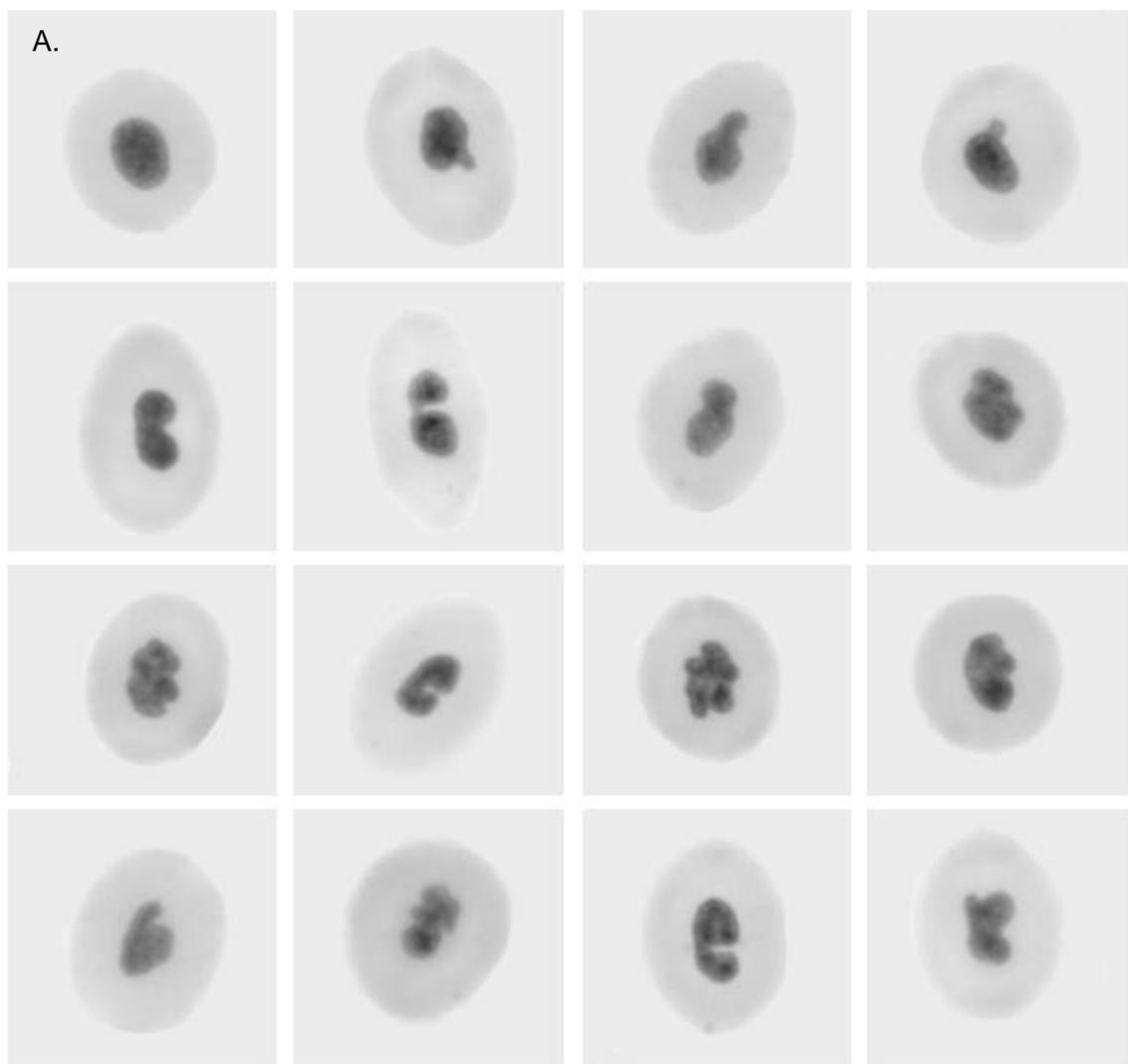


Ilustração 2. Algumas alterações morfológicas nucleares encontradas em *Rhamdia quelen* exposto ao Fipronil. A. núcleo normal. Todos os demais apresentam alterações morfológicas nucleares.

Fonte: Wanessa Ramsdorf, 2010.

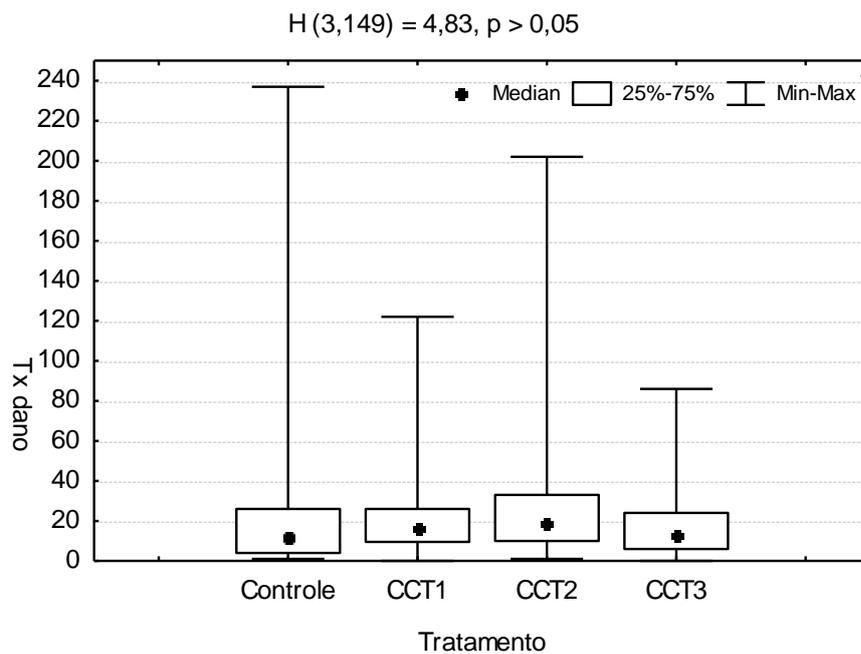


Ilustração 3. Resultado para o Ensaio Cometa. H= Resultado para o Kruskal-Wallis CCT1= grupo contaminado com 0,05 $\mu\text{g/L}$ de Fipronil; CCT2= grupo contaminado com 0,10 $\mu\text{g/L}$; CCT3= grupo contaminado com 0,23 $\mu\text{g/L}$.

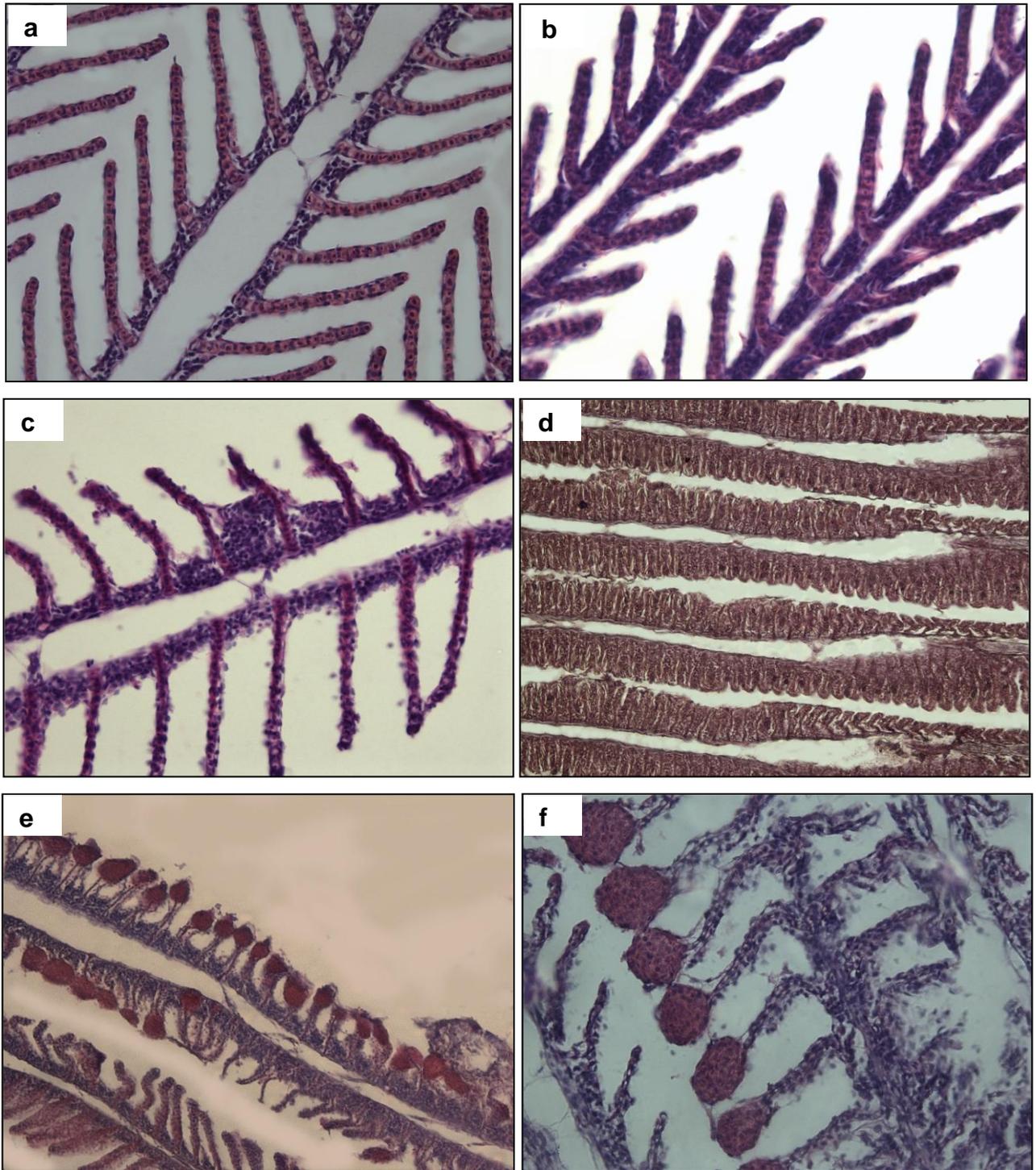


Ilustração 4. Fotomicrografia de tecido branquial. (a) e (b) lamelas normais, objetiva de 40 vezes. (c) hiperplasia parcial das lamelas, objetiva de 40 vezes. (d) fusão total das lamelas, objetiva de 10 vezes. (e) e (f) aneurismas em objetivas de 10 e 40 vezes, respectivamente.

ANEXO 2 – METODOLOGIA COMPLETA

I. ESPÉCIE UTILIZADA

A espécie utilizada foi o peixe neotropical *Rhamdia quelen*, popularmente conhecido como jundiá, para a realização dos bioensaios. O número amostral de indivíduos foi de 15 animais para o grupo de controle negativo e para cada uma das três dosagens de Fipronil: 0,05 µg/L, 0,10 µg/L e 0,23 µg/L; totalizando 60 animais. O grupo controle fica imerso somente em água filtrada.

II. MÉTODOS

A toxicidade do Fipronil foi avaliada através de bioensaios com contaminação de imersão, onde o xenobionte foi dissolvido diretamente na água do aquário. Esta água era filtrada com filtro de carvão ativado. A exposição fez-se de forma semi-estática, com dois terços da água com o contaminante sendo trocada a cada 72 horas. As contaminações tiveram duração de 60 dias. O grupo de controle era imerso somente em água filtrada, sendo esta também renovada a cada 72 horas. Os peixes eram alimentados a cada três dias e nas trocas de água era feita a limpeza dos aquários. Todos os aquários possuíam aerador para oxigenar a água.

i. Teste do Micronúcleo Písceo

A fim de se verificar a frequência de micronúcleos em hemácias periféricas, foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973) e Schmid (1975), com modificações, a saber:

A técnica aplicada consiste das seguintes etapas:

- a) Lâminas foram bem limpas e identificadas.
- b) Ao se coletar o sangue do animal anestesiado em benzocaína (solução alcoólica) colocou-se uma gota na superfície da lâmina.
- c) Com o auxílio de uma lamínula, fez-se um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina.
- d) A lâminas, após a secagem ao ar, são fixadas em etanol 96% por 30 minutos em cubetas.

e) As lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 8,6) por 10 minutos e lavadas em água corrente.

f) Analisou-se um número de 1000 células de cada animal, em teste cego. O número de 1000 células foi padronizado conforme a descrição no anexo 1. Somente foram consideradas na análise hemácias nucleadas com membrana nuclear e citoplasmática intactas. São consideradas como micronúcleos as partículas que, em relação ao núcleo principal: não excederem 1/3 do seu tamanho, estando nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadrarem no conceito de micronúcleo, mas que poderiam ser descritas como alterações morfológicas nucleares segundo Ayllon e Garcia-Vasquez (2000), também serão analisadas.

O resultado obtido em dados brutos foi submetido à análise estatística, para comparação entre os tratamentos. Normalidade residual foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Levene. Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Mann-Whitney.

ii. Ensaio Cometa

Para o Ensaio Cometa a técnica utilizada é a descrita por Singh et al. (1988), com algumas alterações descritas abaixo. Antes da coleta do material para análise, prepararam-se as lâminas com cobertura de agarose e a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) segundo as etapas descritas a seguir.

Preparação das lâminas com cobertura de agarose

a) Dissolveu-se 1,5g de agarose normal em 100 ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas. Essa mistura foi então levada ao forno de microondas até sua fervura e completa dissolução.

b) Após fervura, a agarose foi deixada em temperatura ambiente. Após a solidificação da agarose, esta foi picada e levada novamente ao forno de microondas. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Ao final desse processo, a agarose foi mantida em banho-maria a 70°C.

c) As lâminas, previamente limpas, foram mergulhadas na agarose aquecida, sendo que o lado da lâmina contendo a porção não esmerilhada foi limpo com um lenço de papel.

d) As lâminas foram deixadas *overnight* em superfície plana e à temperatura ambiente para solidificar a cobertura de agarose.

Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)

a) Dissolveu-se 100 mg de agarose normal em 20 ml de PBS que foi levada para fervura em forno de microondas somente uma vez.

b) Esta agarose foi mantida em geladeira até o momento do uso, quando é então aquecida em banho-maria e mantida em 37°C.

O material coletado foi armazenado em tubo de microcentrífuga do tipo ependorf e mantido sob refrigeração e ao abrigo da luz até a montagem das lâminas.

Ensaio Cometa com Brânquia

Para o Ensaio Cometa com brânquia, o procedimento para montagem das lâminas consistiu das seguintes etapas:

a) Após o peixe anestesiado em solução alcoólica de benzocaína, fez-se incisões nas brânquias para a retirada das mesmas.

b) As brânquias foram alocadas em um ependorf com uma solução de soro bovino fetal, na qual o tecido foi desagregado, com o auxílio de um micro-homoginizador. A escolha pelo soro bovino fetal foi feita de acordo com a padronização descrita no Anexo 4.

c) Da solução com tecido desagregado foram coletados 10µl e misturados com 120µl de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).

d) Esta suspensão celular foi então depositada sobre uma lâmina que já estava com a cobertura de agarose normal.

e) Após a deposição da mistura agarose e suspensão celular sobre a lâmina, esta foi então coberta com uma lamínula e levada a geladeira por 15 minutos.

f) Depois de decorrido o tempo de refrigeração, as lamínulas foram gentilmente retiradas.

g) As lâminas foram então acondicionadas em cubetas contendo a solução de lise por no mínimo 24 horas.

h) Após o tempo na solução de lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese. As lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal e, quando necessário, os espaços existentes foram preenchidos com lâminas limpas.

i) A cuba foi mantida sob refrigeração e no escuro.

j) Na cuba de eletroforese, foi suavemente adicionada a solução de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas.

k) Antes do início da corrida eletroforética, as lâminas ficaram na solução de eletroforese por 30 minutos para a desespiralização do DNA.

l) Decorrido este período, iniciou-se a corrida de eletroforese a 25V e 300 mA por 25 minutos.

m) Após o tempo de corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com um tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos. Esse processo realizou-se em 3 seções, com 5 minutos para cada seção. Essa neutralização foi realizada aplicando diretamente o tampão sobre as lâminas com o auxílio de uma pipeta sobre uma superfície plana.

n) As lâminas secaram em temperatura ambiente.

o) Após a secagem, as lâminas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos.

p) As lâminas foram então guardadas para posterior coloração e visualização.

q) Para a coloração, adicionou-se 25µl de brometo de etídeo em cada lâmina. Cada lâmina foi então coberta com lamínula e levada ao microscópio de epifluorescência com aumento de 400 vezes.

r) Foram analisados 100 núcleos em cada lâmina.

s) Os núcleos foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética. A classificação dos núcleos foi realizada conforme as classes: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano grande) e 4 (dano máximo), como mostrado na Figura 7.

t) Foi realizada a quantificação dos tipos de danos e a atribuição de escores em cada classe. Escores foram obtidos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

O resultado obtido foi submetido à análise estatística, para comparação entre os tratamentos. Sobre os dados brutos, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Mann-Whitney.

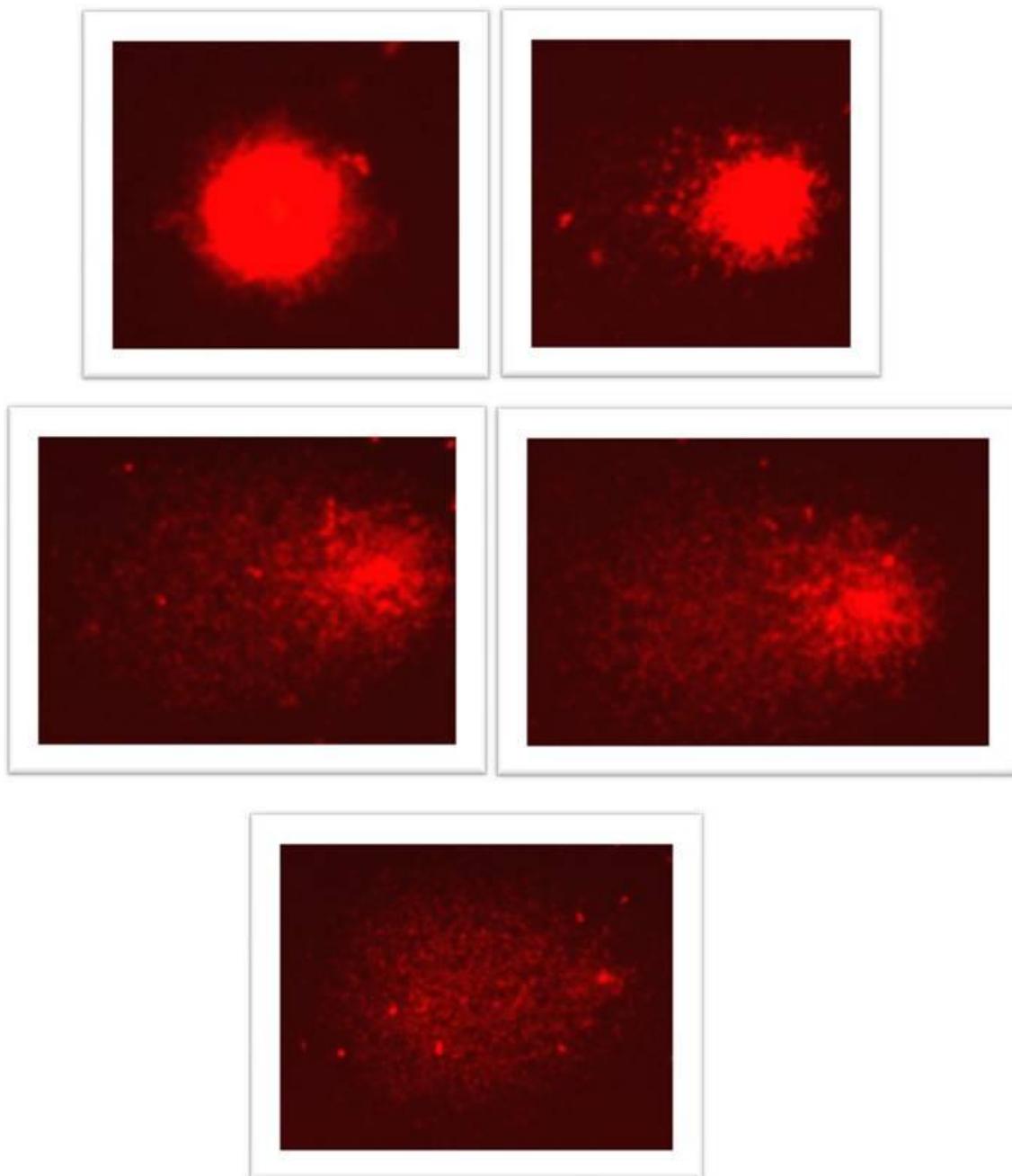


FIGURA 7. FOTOS MOSTRANDO AS CINCO DIFERENTES TAXAS DE DANO NO ENSAIO COMETA COM LENTE DE IMERSÃO. A. DANO ZERO; B. DANO UM; C. DANO DOIS; D. DANO TRÊS; E. DANO QUATRO (POSSIVELMENTE EM APOPTOSE).

FONTE: A AUTORA (2009)

iii. Histopatologia de brânquia

a) Fixação

Um fragmento da brânquia (aproximadamente 100 mg) foi retirado do animal, acondicionado em cassetes para histologia e mantido em Alfac (álcool 80% 85ml; ácido acético 5 ml e formol 40% 10 ml) por 20 horas. Passado esse período, os cassetes foram mantidos em frascos com álcool 70% por aproximadamente dois meses.

b) Emblocagem

Para emblocagem, primeiramente foi retirado o álcool 70% e foi feita uma bateria para desidratação alcoólica, sendo 1 hora em álcool 80%, 1 hora álcool 90%, 1 hora álcool 95%, 30 minutos álcool 100%, 30 minutos álcool 100%, 30 minutos xilol puro, 30 minutos xilol puro. Posterior ao xilol, foi feita a inclusão em Paraplast-Plus (Sigma) por 2 horas em estufa a 56°C. Em seguida, foi feita a emblocagem em forminhas. Os blocos foram mantidos em temperatura ambiente para posteriormente serem cortados.

c) Cortes

Para realização dos cortes, os blocos foram trimados em micrótomo. Também em micrótomo, foram feitos cortes com 0,5µm e estendidos em lâmina coberta com albumina de ovo 1%. Após as lâminas secarem, elas foram reservadas para posterior hidratação para que fosse possível a coloração.

d) Coloração

Antes da coloração com Hematoxilina/Eosina, as lâminas com os cortes secos fixados foram acondicionadas em cubetas de vidro e passaram pelos processos de diafanização e hidratação da maneira como segue:

a) Diafanização:

Xilol puro I: 5 minutos

Xilol puro II: 5 minutos

b) Hidratação:

Álcool 100%: 5 minutos

Álcool 90%: 5 minutos

Álcool 80%: 5 minutos

Álcool 70%: 5 minutos

Álcool 50%: 5 minutos

Enxágue em água corrente por 2 minutos seguido de água destilada 3 minutos.

c) Coloração

A coloração propriamente dita foi realizada da seguinte maneira:

Hematoxilina: 1 minuto

Lavar em água até sair todo o excesso do corante.

Eosina: 30 segundos

Lavar até sair todo o excesso do corante.

e) Desidratação:

Os cortes foram desidratados para montagem da lâmina permanente da seguinte maneira:

Álcool 70% 2 minutos

Álcool 80% 2 minutos

Álcool 90 % 1 minutos

Álcool 95% 1 minuto

Álcool 100% 2 minutos

Álcool 100% 2 minutos

f) Montagem

Xilol puro I: 5 minutos

Xilol puro II: 5 minutos

As lâminas foram retiradas do xilol e montadas com lamínulas e resina Permout com auxílio de pinça metálica para eliminação de bolhas.

g) Análise

Morfologia das Brânquias

As análises morfológicas das brânquias mostram quatro pares de arcos laterais dispostos em fileiras na cavidade faríngea, apoiadas sobre os arcos de sustentação, nos quais se dispõem fileiras de filamentos branquiais ou lamelas primárias. Em cada arco branquial observam-se saliências, denominadas

rastelos, que tem como uma das principais funções protegerem os filamentos branquiais de partículas.

A figura 8 mostra um conjunto de brânquias de *Rhamdia quelen*, no momento que foi retirado do animal. A compreensão da morfologia das brânquias e a histologia das lamelas primárias e secundárias, em estado normal e quanto à descrição das alterações branquiais, pode ser observada na figura 9, adaptada de Mallat (1985).



FIGURA 8. FOTO DAS BRÂNQUIAS DE *Rhamdia quelen*, NO MOMENTO QUE FORAM RETIRADAS DO ANIMAL PARA SEREM SUBMETIDAS ÀS PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS.

FONTE: A AUTORA (2008)

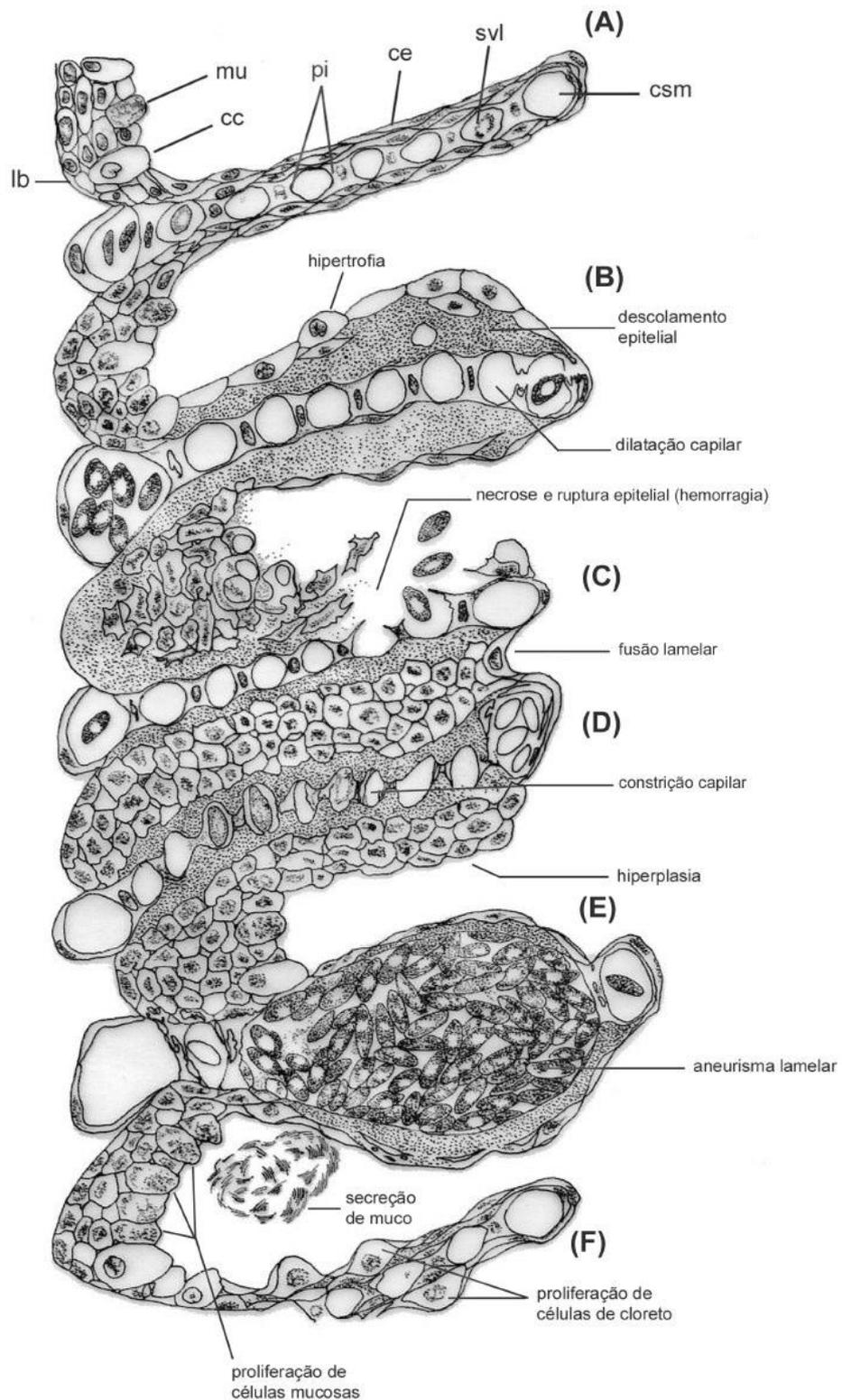


FIGURA 9. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE SEIS LAMELAS RESPIRATÓRIAS, MOSTRANDO AS LESÕES BRANQUIAIS MAIS COMUNS, INDUZIDAS POR IRRITANTES. A MORFOLOGIA NORMAL; B. DESLOCAMENTO EPITELIAL; C. NECROSE; D. HIPERPLASIA; E. ANEURISMA; F. PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE CLORETO. ((LB) LÂMINA BASAL; (CC) CÉLULA DE CLORETO; (UM) CÉLULA MUCOSA; (PI) CÉLULA PILAR; (CE) CÉLULA EPITELIAL LAMELAR; (SVL) SEIO VENOSO LAMELAR; (CSM) CANAL SANGUÍNEO MARGINAL (MODIFICADO DE MALLAT, 1985).

As alterações encontradas nas brânquias foram avaliadas pelo método descrito por Bernet et al. (1999), onde essas alterações receberam fatores de importância patológica (Tabela 1) de acordo com sua reversibilidade, sendo

I para importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao contaminante acaba;

II para importância patológica moderada, a lesão é reversível, na maioria dos casos se o estressor é neutralizado e;

III para importância patológica notável, quanto a lesão é geralmente irreversível levando a total ou parcial perda do órgão.

Para o grau de ocorrência também foram atribuídos valores que variaram de 0 (ocorrência inexistente) a 6 (ocorrência severa), sendo 0 = 0; 1 = 1% a 24%; 2 = 25% a 49%; 4 = 50% a 74%; 6 = 75% a 100% de lesões nas brânquias. Mais detalhes sobre essa metodologia pode ser encontrado em Bernet et al. (1999). A expressão utilizada para calcular o índice de lesão do órgão é a seguinte:

$$I = \sum_{pr} \sum_{alt} (a \times w)$$

Onde, I é o índice histopatológico, pr é o tipo da alteração no órgão, alt é a alteração, a é o valor de escore da ocorrência para uma alteração específica do órgão, w é o fator de importância para a referida alteração. Este índice permite a comparação da severidade das lesões branquiais entre os peixes de diferentes tratamentos.

TABELA 1. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS OBSERVADAS E SEUS RESPECTIVOS FATORES DE IMPORTÂNCIA.

Alterações Histológicas Branquiais (pr)	Fator de importância (w)
Fusão completa de todas as lamelas (e hiperplasia)	II
Aneurisma lamelar	I
Presença de parasitas	I

Pelo reduzido número de lâminas analisáveis, optou-se por não submeter os dados de alteração histológica branquial a análise estatística, restringindo-se somente a análise qualitativa.

ANEXO 3

TESTE DE METODOLOGIA PARA MICRONÚCLEO E ALTERÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES: QUAL O NÚMERO IDEAL DE CÉLULAS A SER CONTADO?

Até recentemente o ensaio de micronúcleo de eritrócitos *in vivo* tem sido quantificado (scored) usando microscopia simples. Pela frequência de micronúcleos ser tipicamente baixa, a contagem de células está sujeita a substancial erro de contagem binomial. O erro de contagem, acrescentado a variabilidade entre os animais, limita a sensibilidade desse teste (KISSLING *et al.* 2007).

A habilidade dos ensaios de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares para detectar pequenos aumentos na frequência basal de células micronucleadas em um grupo de animais (ou objetos de estudo) é limitada tanto pelo erro binomial de contagem, quando o número de células contadas fornece um pequeno número de eventos (células micronucleadas), quanto pela variação entre os animais, quando a variação é tão grande que obscurece um pequeno, mas real aumento. Reconhecendo esse fato, o grupo que trabalha com teste do micronúcleo *in vivo*, organizado pelo “International Workshops on Genotoxicity Testing” (IWGT) tem recomendado que sempre que possível, células suficientes sejam escoradas para que o erro de contagem seja menor que a variabilidade na frequência de micronúcleos entre animais individuais (para comparação de valores em diferentes grupos tratados) (KISSLING *et al.* 2007).

Neste sentido, uma questão importante seria a padronização deste número suficiente de células, um número considerado satisfatório para reduzir os erros de contagem ou qualquer variação que possa mascarar os resultados que realmente existem.

Na literatura atual não se tem ainda esse número padrão de células contadas, como mostrado na Tabela 2, os autores computam uma margem de 1.000 a 10.000 células intactas no total por indivíduo/lâmina.

TABELA 2. BIBLIOGRAFIA ATUAL MOSTRANDO COMO SÃO ANALISADAS AS CÉLULAS DE MICRONÚCLEO: QUANTAS CÉLULAS POR LÂMINA.

Células por lâmina	Referência/ ano
2.000/5.000	FRENZILLI <i>et al.</i> 2008.
1.000	AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000.
1.000	CAMPANA <i>et al.</i> 1999.
1.000	OSMAN <i>et al.</i> 2010.
1.000	YADAV; TRIVEDI, 2009.
1.500	ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003.
2.000	AI SABTI; METCALFE, 1995.
2.000	ALI <i>et al.</i> 2008.
2.000	ÇAVAS; KÖNEN, 2008.
2.000	CORREA <i>et al.</i> 2008.
2.000	COSTA <i>et al.</i> 2009 (no prelo)
2.000	KATSUMITI <i>et al.</i> 2007.
2.000	LEMOS <i>et al.</i> 2008.
2.000	LINDE-ARIAS <i>et al.</i> 2008.
2.000	MATSUMOTO <i>et al.</i> 2006.
3.000	BARBOSA <i>et al.</i> , 2010.
3.000	CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008.
3.000	GRISOLIA, 2002.
3.000	HOSHINA; ANGELIS; MARTIN-MORALES, 2008.
3.000	SOUZA; FONTANETTI, 2006.
4.000	BOLOGNESI <i>et al.</i> 2006.
4.000	FERRARO <i>et al.</i> 2004.
5.000	GRISOLIA; CORDEIRO, 2000.
5.000	RYBAKOVAS; BARŠIENE; LANG, 2009.
5.000	VENTURA; ANGELIS; MARTINS-MORALES, 2008.
10.000	MINISSI; CICCOTTI; RIZZONI, 1996.

Portanto, com o objetivo de se padronizar um número ideal de células a serem contadas no teste do Micronúcleo Píscico e Alterações Morfológicas Nucleares, simultaneamente ao experimento descrito no tópico 4 (4. Material e Métodos) desta dissertação realizou-se um teste de metodologia. A fim de se verificar a frequência de micronúcleos em hemácias periféricas, foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973) e Schmid (1975). No entanto, no momento da análise das lâminas, contou-se um número de 1000, 2000, 3000 e 4000 células de cada animal, para verificar se a contagem de somente 1000 células seria suficiente para fornecer um resultado confiável, ou se é necessária a contagem de um número maior de células.

O número de células analisadas foi submetido à análise estatística, para comparação entre os tratamentos. Normalidade residual foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Levene. Os dados brutos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e quando houve significância usou-se o teste de Mann-Whitney.

Para simplificação, na maioria das vezes chamaremos os grupos da seguinte forma: CTR (grupo controle), CCT1 (grupos contaminado na dosagem de 0,05 µg/L de Fipronil), CCT2 (grupos contaminado na dosagem de 0,10 µg/L de Fipronil) e CCT3 (grupo contaminado na dosagem de 0,23 µg/L de Fipronil).

RESULTADO

Na comparação entre as contagens de mil, duas mil, três mil e quatro mil células dentro de cada tratamento/contaminação, evidenciou-se que não houve diferença significativa entre os grupos, sendo o mesmo resultado obtido quando se conta mil, duas mil, três mil ou quatro mil células (Tabela 3).

TABELA 3. COMPARAÇÃO DA CONTAGEM DE MIL, DUAS MIL, TRÊS MIL E QUATRO MIL CÉLULAS DENTRO DE CADA GRUPO DE TRATAMENTO. H= RESULTADO PARA O KRUSKAL-WALLIS.

Tratamentos	H
Controle	$H_{(3,52)} = 3,97$ n.s
Contaminado 0,05 $\mu\text{g/L}$	$H_{(3,60)} = 0,99$ n.s.
Contaminado 0,10 $\mu\text{g/L}$	$H_{(3,60)} = 0,97$ n.s.
Contaminado 0,23 $\mu\text{g/L}$	$H_{(3,60)} = 0,06$ n.s.

A Figura 10 ilustra como em todas as contagens, a taxa de dano nuclear é praticamente a mesma, sem variação significativa.

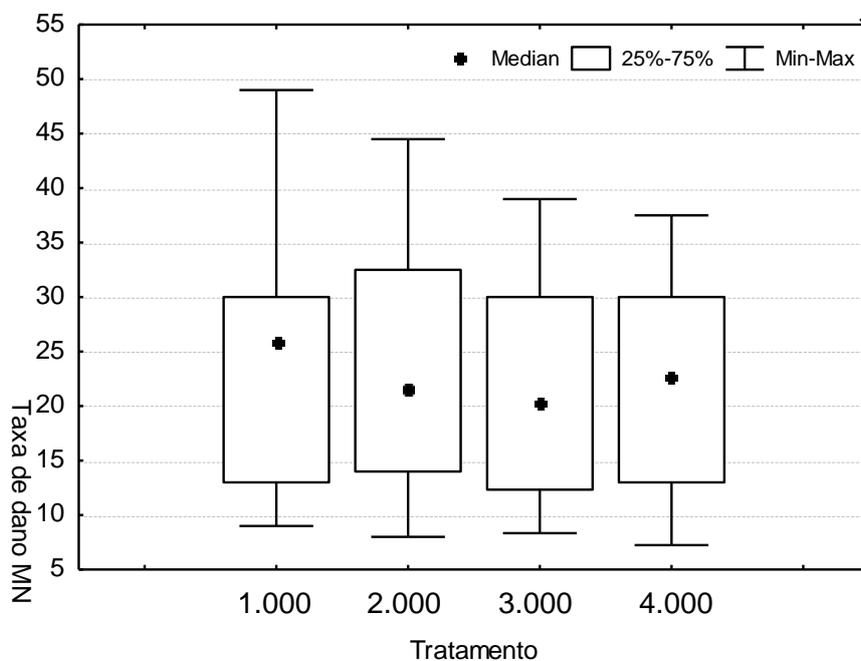


FIGURA 10. PADRÃO DE DIFERENÇA NÃO SIGNIFICANTE ENCONTRADA PARA AS CONTAGENS DE MIL CÉLULAS, DUAS MIL CÉLULAS, TRÊS MIL CÉLULAS E QUATRO MIL CÉLULAS. ESTE MODELO SE REPETIU PARA TODOS OS GRUPOS DE CONTAMINAÇÃO E GRUPO CONTROLE.

Independentemente da contagem realizada (mil, duas mil, três mil ou quatro mil células), em todos os casos evidenciou-se pelo teste de Kruskal-Wallis diferenças significativas na taxa de alterações nucleares entre os grupos de exposição (controle, e contaminados nas diferentes doses). Pelo teste de Mann-Whitney o grupo CCT3 e o grupo CCT2 revelaram maior taxa de dano, quando comparado aos grupos CCT1 e controle, em todas as contagens; o grupo CCT1 não diferiu do grupo controle com relação à taxa de dano ao DNA. Este resultado pode ser melhor visualizado na Tabela 4 e graficamente na Figura 11. Esta última mostra um padrão geral que foi obtido para todas as contagens.

TABELA 4. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA CADA CONTAGEM X GRUPOS DE TRATAMENTO. H= RESULTADO DO KRUSKAL-WALLIS; * RESULTADO SIGNIFICANTE ($p < 0,05$); CTR= GRUPO CONTROLE; CCT1= GRUPO CONTAMINADO COM 0,05 $\mu\text{g/L}$ DE FIPRONIL; CCT2= GRUPOS CONTAMINADO COM 0,10 $\mu\text{g/L}$; CCT3= GRUPO CONTAMINADO COM 0,23 $\mu\text{g/L}$.

Tratamentos (nº células contadas)	H	MANN-WHITNEY
Mil	$H_{(3,58)} = 26,51^*$	CCT3> CCT2> CCT1, CCTR
Duas mil	$H_{(3,58)} = 24,68^*$	CCT3> CCT2> CCT1, CCTR
Três mil	$H_{(3,58)} = 24,33^*$	CCT3> CCT2> CCT1, CCTR
Quatro mil	$H_{(3,58)} = 22,37^*$	CCT3> CCT2> CCT1, CCTR

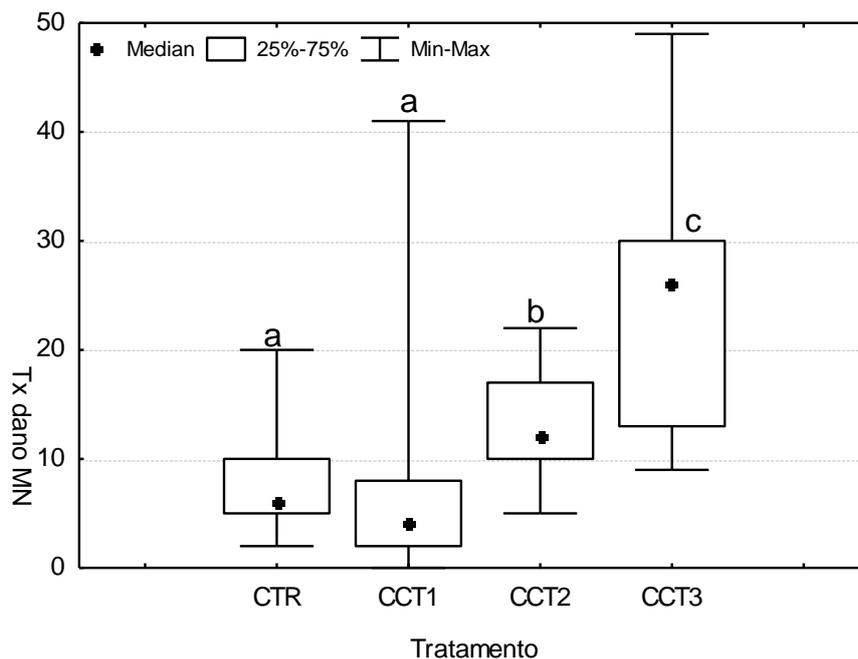


FIGURA 11. GRÁFICO MOSTANDO O RESULTADO GERAL DOS DIFERENTES TRATAMENTOS PARA TODAS AS CONTAGENS. CTR= CONTROLE; CCT1= GRUPO CONTAMINADO COM 0,05 $\mu\text{g/L}$ DE FIPRONIL; CCT2=GRUPOS CONTAMINADO COM 0,10 $\mu\text{g/L}$; CCT3= GRUPO CONTAMINADO COM 0,23 $\mu\text{g/L}$.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Apesar de todas suas vantagens e de o teste do Micronúcleo Písceo ser bastante difundido no meio científico, não se tem ainda uma padronização de um número exato de células a serem computadas, variando este número de mil a dez mil células. Por isso esta parte do trabalho se focou na comparação dos resultados das contagens de mil, duas mil, três mil e quatro mil células.

O resultado obtido no presente trabalho indica não haver diferença entre as contagens de células, isto é, o mesmo resultado pode ser obtido tanto se contando mil, bem como duas mil, três mil ou quatro mil células. Concluindo-se assim, que a contagem de apenas mil células já mostra resultados satisfatórios.

ANEXO 4

PADRONIZAÇÃO DA PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS COM A FINALIDADE DE USO NO ENSAIO COMETA

A Eletroforese em Gel de Células Únicas (SCGE) ou Ensaio Cometa foi primeiramente aplicado para ecotoxicologia cerca de quinze anos atrás, e tornou-se um dos mais populares testes para detecção de quebras de fita em animais aquáticos tanto em exposições *in vitro*, *in vivo* e *in situ* (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004).

O papel da solução de lise no Ensaio Cometa é o de remover os conteúdos celulares, com exceção do material nuclear. O DNA permanece bem condensado devido à presença de uma pequena quantidade de proteínas não histônicas. Porém, quando colocado na solução de eletroforese, com pH maior que 13, a espiralização do DNA começa a relaxar a partir dos pontos de quebra da fita, permitindo, dessa maneira, que os mesmos sejam revelados pela eletroforese na sequência do teste (YENDLE *et al.* 1997).

Como o Ensaio Cometa analisa as células individualmente, há certa limitação na desagregação do tecido. As células devem ser separadas por processos de fragmentação ou através da aplicação de enzimas. Estas células devem ser convenientemente separadas por meios que não as danifiquem, mas que permitam sua individualização. As células podem ser diluídas em soro bovino fetal, em solução fisiológica, RPMI ou outras soluções. Qualquer que seja o meio a ser utilizado, todo o processamento das células deve obrigatoriamente ser executado sem que danos adicionais ao DNA possam ocorrer (FERRARO *et al.* 2004).

Assim, a fixação de amostras biológicas representa um passo fundamental. Infelizmente, tais procedimentos frequentemente podem resultar em vários graus de artefatos (DUBOCHET; SARTORI BLANC, 2001).

Quando análises ambientais são realizadas, o elevado número de amostras requerido e as condições de manuseio durante o transporte dessas amostras para o laboratório são problemas comuns. Alguns estudos na literatura sugerem preservar as lâminas em solução de lise para o uso no Ensaio Cometa, por um período de até quatro meses de estoque (NACCI; CAYULA; JACKIM, 1996). Até agora, todavia, nenhuma metodologia realmente eficiente

para preservação de amostras para este ensaio foi descrita. (RAMSDORF *et al.* 2009).

Apesar dos poucos estudos sobre o assunto, dentre as soluções usadas para desagregar e preservar as células pode-se citar o EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) que age como quelante no sangue, o PBS (tampão fosfato salino), o soro bovino fetal, o meio RPMI, o Tris, entre outros.

O soro bovino fetal é amplamente utilizado em cultura celular e tem uma alta concentração de proteínas, sendo um meio rico para o crescimento celular (RAMSDORF *et al.* 2009).

O TRIS é uma abreviação do composto orgânico conhecido como tris(hidroximetil)aminometano, com a fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. O pH de utilização do Tris (7-9) coincide com o pH físico da maioria dos organismos vivos. Isso e seu baixo custo fazem do tris um dos tampões mais comuns usados em laboratórios de biologia e bioquímica. Em bioquímica, Tris é largamente usada como um componente de soluções tampão, tais como nos tampões TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA) e TBE (tampão Tris/Borato/EDTA), especialmente para soluções de ácidos nucleicos. É uma amina primária e como tal comporta-se similarmente nas reações associadas com aminas típicas, como nas condensações com aldeídos (GOMORI, 1955).

O PBS ou tampão fosfato salino é uma solução comumente utilizada em bioquímica, mas tem muitos outros usos. Esta é a solução de uso mais comum na diluição para o Ensaio Cometa, sendo citada em vários artigos, como: Masuda *et al.* 2004; Kim; Hyum, 2006; Deguchi *et al.* 2007; Bombail *et al.* 2001; Cavalcante *et al.* 2008.

Além desses, Coughlan *et al.* (2002) faz uso de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) com centrifugação para a dissociação das células. O meio RPMI também pode ser utilizado. Este é uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular.

Deve-se ter em mente que o Ensaio Cometa é essencialmente um teste comparativo. Assim, é sempre necessário, no mínimo um controle negativo. Ressalta-se que não existe célula sem dano no DNA, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno de 1000 lesões diárias no DNA/célula. O que se faz, rotineiramente é modular as condições técnicas para

que um mínimo de DNA migre da cabeça para a cauda do cometa nos controles negativos (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003) e que menos variáveis espúrias afetem o DNA tanto dos tratamentos como no grupo controle.

Desta maneira é importante a padronização de uma solução de estoque de células que as conserve por mais tempo sem causar dano ao DNA, para que permaneçam aptas às análises do Ensaio Cometa.

Com o objetivo de estabelecer uma solução confiável para o armazenamento de células do tecido branquial antes da corrida eletroforética para o Ensaio Cometa, realizou-se simultaneamente ao experimento descrito no tópico 4 (Material e Métodos) desta dissertação um teste adicional. Este consistiu nos procedimentos a seguir:

As brânquias foram divididas em três partes, cada parte colocada em um ependorfe com uma solução tampão/diluidora diferente, a citar: soro bovino fetal, tampão Tris* e Tampão Fosfato. Nestas soluções os tecidos foram desagregados, com o auxílio de um micro-homogeinizador.

* O tampão Tris-HCl Sacarose (tampão de homogeneização) foi preparado, no dia da coleta do material, dissolvendo-se 17,1150g de sacarose e 0,2422g de Tris em 100 ml de água destilada, e tendo o pH acertado em 8,6 com HCl_{conc}. Esse tampão foi mantido sob refrigeração até o momento do uso.

A brânquia foi mantida nas soluções pelos tempos de 0 hora, 24 horas e 48 horas. Depois de vencidos cada um dos tempos, a brânquia foi desagregada com um microhomogeinizador e coletou-se uma amostra de 10µl de solução celular, com a qual se deu continuidade aos procedimentos do Ensaio **Cometa** descritos no tópico 4.2.2.

Resumindo então, neste trabalho pesquisou-se a eficiência de três soluções tampão para estoque de células de brânquia na realização do Ensaio Cometa. Porções da brânquia foram alocadas em ependorfes, contendo três soluções diferentes: Soro bovino fetal, Tris e PBS, retirando-se amostra de células nos tempos de 0, 24 e 48 horas para realização do Ensaio Cometa.

Após a análise das lâminas, os dados foram submetidos à análise estatística, para comparação entre os tratamentos. Normalidade residual foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Levene. Como os dados apresentaram

distribuição normal e homogeneidade das variâncias, utilizou-se ANOVA bifatorial para se testar: 1 - a taxa de dano entre os tampões utilizados para armazenar as células, independentemente do tempo de armazenamento (medida de conservação do material); 2 - a taxa de dano celular entre os tampões de armazenamento e os tempos (medida para detectar qual tampão funciona melhor em relação ao tempo de armazenamento). Ao evidenciar diferenças significativas fez-se uso do teste a posteriori das mínimas diferenças significantes de Fisher (LSD) para detectar quais grupos diferiam (QUINN; KEOUGH, 2002). Os dados brutos foram transformados em raiz quadrada, visando obedecer aos pressupostos das análises pré-descritas.

RESULTADO

A Figura 12 mostra a comparação da taxa de dano ao DNA das células quando se confrontam as três soluções tampões de um modo geral, independente do tempo da amostragem. Na observação do gráfico fica evidente a menor taxa de dano no soro bovino fetal em relação aos outros dois tampões.

Quando se efetiva esta comparação pela análise estatística observa-se que o soro bovino fetal, invariavelmente, mostrou menor taxa de dano no DNA das células quando confrontado aos outros tampões. Isto pode ser visualizado no gráfico da Figura 12 e na Tabela 5. Destaca-se que a interação entre o tampão e o tempo foi não significativa ($F_{4,88}=1,96$ e $p>0,05$).

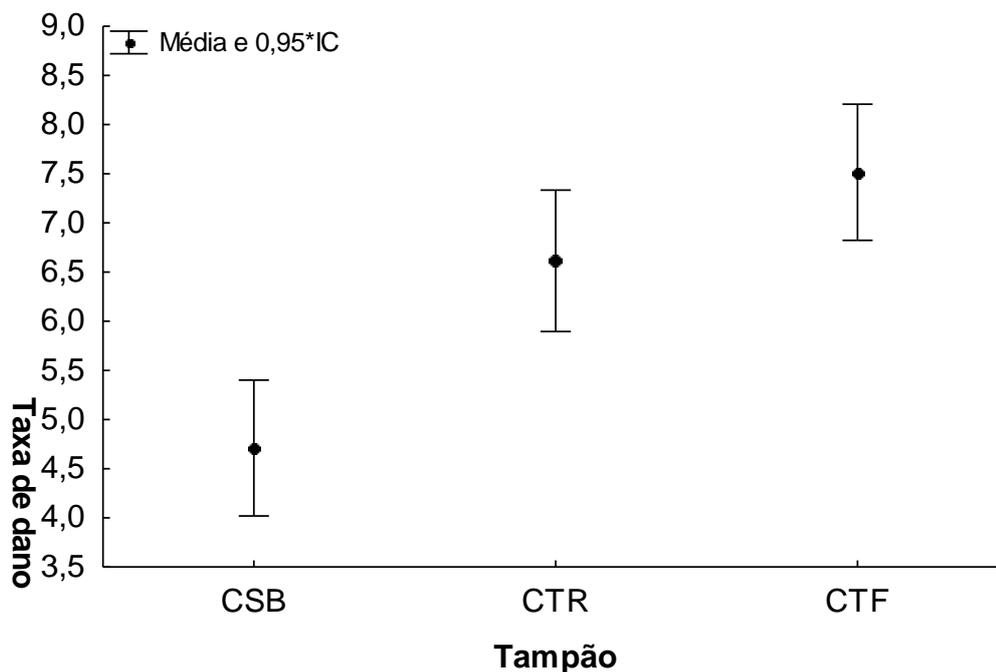


FIGURA 12. COMPARAÇÃO GERAL DOS TRÊS TAMPÕES COM RELAÇÃO À TAXA DE DANO, INDEPENDENTE DO TEMPO. CSB=SORO BOVINO FETAL; CTR= TRIS; CTF= TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS). OS DADOS SÃO APRESENTADOS EM RAÍZ QUADRADA.

TABELA 5. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DAS TAXAS DE DANO NO ENSAIO COMETA DAS DIFERENTES SOLUÇÕES TAMPÃO DENTRO DE CADA TRATAMENTO DOSE DE CONTAMINAÇÃO. F= RESULTADO PARA ANOVA BIFATORIAL; LSD= MÍNIMAS DIFERENÇAS SIGNIFICANTES DE FISHER; * RESULTADO SIGNIFICANTE ($p < 0,05$); CTR= GRUPO CONTROLE; CCT1= GRUPO CONTAMINADO COM $0,05 \mu\text{g/L}$ DE FIPRONIL; CCT2= GRUPOS CONTAMINADO COM $0,10 \mu\text{g/L}$; CCT3= GRUPO CONTAMINADO COM $0,23 \mu\text{g/L}$. CSB=SORO BOVINO FETAL; CTR= TRIS; CTF= TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS).

TRATAMENTO	TAMPÃO	
	F	LSD
Controle	$F_{(2,89)} = 29,37^*$	CTF>CTR>CSB
CCT1	$F_{(2,110)} = 11,44^*$	CTF>CTR, CSB
CCT2	$F_{(2,126)} = 16,78^*$	CTF>CTR>CSB
CCT3	$F_{(2,116)} = 13,24^*$	CTF>CTR>CSB

Na Tabela 6 analisa-se o resultado obtido para cada um dos tratamentos (grupos de contaminação e controle) em relação aos tempos de conservação das células. Deste modo, constatou-se na maioria das vezes que o tampão fosfatos apresentou maior taxa de danos às células, seguido pelo Tris, e

finalmente, o soro bovino fetal como a solução que melhor conserva as células. Além disso, evidenciou-se que à medida que ocorre um aumento do tempo de estocagem das células nos tampões mais intensificam estas diferenças. Isto é, no tempo de 0 horas, praticamente não se observa diferença entre os tampões, no entanto, com o decorrer do tempo, percebe-se uma maior eficiência do soro bovino fetal.

TABELA 6. COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS/DOSES DE CONTAMINAÇÃO X TAMPÃO DE DILUIÇÃO X TEMPO DE CONSERVAÇÃO. F= RESULTADO PARA ANOVA BIFATORIAL; LSD= MÍNIMAS DIFERENÇAS SIGNIFICANTES DE FISHER; * RESULTADO SIGNIFICANTE ($p < 0,05$); n.s. = RESULTADO NÃO SIGNIFICATIVO; CTR= GRUPO CONTROLE; CCT1= GRUPO CONTAMINADO COM 0,05 $\mu\text{g/L}$ DE FIPRONIL; CCT2= GRUPOS CONTAMINADO COM 0,10 $\mu\text{g/L}$; CCT3= GRUPO CONTAMINADO COM 0,23 $\mu\text{g/L}$. CSB=SORO BOVINO FETAL; CTR= TRIS; CTF= TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS).

TRATAMENTO	F	LSD (tempos)		
		0 horas	24 horas	48 horas
Controle	n.s.	-	-	-
CCT1	$F_{(4,110)} = 5,42^*$	CTF=CTR=CSB	CTF>CTR,CSB	CTF=CTR=CSB
CCT2	$F_{(4,126)} = 5,63^*$	CTF=CTR=CSB	CTF>CTR,CSB	CTF>CTR>CSB
CCT3	$F_{(4,116)} = 5,30^*$	CTF>CTR,CSB	CTF>CTR,CSB	CTF>CTR>CSB

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho mostraram que a solução que melhor preserva as células por um maior período de tempo é o soro bovino fetal, seguido pelo Tris e por último o tampão fosfato salino (PBS).

Este resultado concorda com Ramsdorf *et al.* (2009) que conservou amostras de sangue de *Rhombia quelen* em três diferentes soluções: soro bovino fetal, EDTA e PBS. Após, realizou coletas deste material nos tempos 0 hora, 24 horas, 48 horas e 72 horas, para realização do Ensaio Cometa, além da citometria de fluxo. Os seus resultados também apontaram o soro bovino fetal como o melhor conservante para as células, seguido pelo PBS (tampão fosfato salino) e por último o EDTA. Neste mesmo trabalho, a análise de viabilidade celular por citometria de fluxo revelou que o soro bovino fetal mantém as células viáveis por mais tempo.

O soro bovino fetal foi a solução testada que deu uma resposta mais satisfatória na conservação de células, provavelmente, devido as características de sua composição. O soro é uma rica fonte de proteínas, contendo fator de crescimento, aminoácidos, carboidratos, íons, vitaminas,

entre outros compostos. Provavelmente, vários componentes do soro beneficiam a proteção das células em estudo, como é o caso da alta quantidade de glicose (~0,6 -1,2 mg/ml) (MAURER, 1986), que pode servir como fonte para o metabolismo celular (SCOTT; LECAK; ACKER, 2005). A presença de inibidor de protease é particularmente importante por causa de sua atividade anti-tripsina, que inibe esta enzima a agir contra as células. Adicionalmente, a osmolaridade do soro (322mM) (MAURER, 1986) é similar àquela do sangue do peixe de água doce (POTTS; PARRY, 1964).

Em contrapartida, estudos revelam que Tris e PBS possuem efeitos negativos às células. Para o Tris foram evidenciados efeitos deletérios deste tampão no crescimento e nos conteúdos de clorofila e ficoeritrina da alga *Gracilaria birdiae* (URSI; GUIMARÃES; PLASTINO, 2008). Para as células mantidas em PBS verificaram-se, significativamente, mais quebras de DNA do que nas mantidas em soro bovino fetal. Esse resultado pode ser relacionado com a baixa osmolaridade do PBS (149,14 mM) em comparação àquela usualmente encontrada em peixes de água doce (que corresponde a 292,5 mM em *Salmo truta*) (POTTS; PARRY, 1964). A diferença de osmolaridade entre as células de peixe e o PBS pode ter levado a um influxo de água para dentro das células afetando o núcleo (RAMSDORF *et al.* 2009).

Há uma clara necessidade de métodos sensíveis que são aptos a avaliar impactos crônico e agudos de contaminação aos organismos. Em 1997 concluiu-se que o Ensaio Cometa é uma técnica promissora para detecção de dano ao DNA, no entanto mais pesquisas eram necessárias para obter uma técnica mais eficaz (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Muitos laboratórios têm atribuído esforço para aperfeiçoar a aplicabilidade do Ensaio Cometa em muitos campos da pesquisa. Esse desenvolvimento resultou em um grande número de protocolos, principalmente de métodos modificados de Singh (1998) e Tice (1995). Conseqüentemente, comparações interlaboratoriais são comprometidas por falta de padronização (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

O uso do Ensaio Cometa em pesquisas de campo geralmente envolve muitas amostras. Um método efetivo para a preservação das amostras é assim pré-requerido para ampliar a aplicação da técnica. Duas técnicas mais já foram estudadas, a criopreservação e a estocagem em solução de lise. Nacci, Cayula

e Jackim (1996) estocou lâminas na lise por mais de 4 meses. Já a criopreservação não se mostrou muito satisfatória na preservação das células, mas ainda mostrou-se mais eficaz para sangue do que para rim e brânquias (VAN DER ELST, 1992).

Portanto, conclui-se no presente trabalho, que o soro bovino fetal é a solução que melhor preserva as células branquiais e o material genético de *Rhamdia quelen*, por um tempo de até 48 horas na ausência de luz. Este resultado pode ser extrapolado para vários peixes de água doce, em geral.

Esta possibilidade de armazenar as células em ependorfes por um tempo maior, quando em trabalhos de campo e/ou com grandes quantidades de materiais, não sendo possível o preparo imediato e simultâneo de todas as amostras, facilitará os procedimentos para o Ensaio Cometa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; JAKOBI, S. C. G.; STJEAN, S.; COUTERNAY, S. C.; LIMA, E.; WAGNER, A. L. R.; SCOFIELD, A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 244-253, 2004.

ALBERTS, A.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**, Editora Artmed, 3ª edição, 1294p., 1997.

ALI, D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Chemosphere**, v.71, p.1823–1831, 2008.

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

ANDREOLI, C. V.; DALARMI, O.; LARA, A. I.; ANDREOLI, F. N. Limites ao desenvolvimento da região metropolitana de Curitiba impostos pela escassez de água. **Sanare: revista técnica da Sanepar**, v.12, nº 12, p. 31-42, 1999.

ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Eds.) **Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados**. Curitiba: SANEPAR, Finep, 2005.

ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, p.62-72, 1999.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, v.467, p. 177-186, 2000.

BANKS, J. E.; DICK, L. K.; BANKS, H. T.; STARK, J. D. Time-varying vital rates in ecotoxicology: Selective pesticides and aphid population dynamics. **Ecological modeling**, v.210, p. 155–160, 2008.

BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. B. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 320-325, 2010.

BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. P.; WOEHL, V. M.; QUEVEDO, R. M.; ITTZES, I.; KRIEGER, M. H.; LULHIER, F. Steroid profiles in cultured female jundia, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v.121, p.325-332, 2001a.

BARROS, M.; SILVA, M.; SOSA, R. **Geo-Goias - 2002**. Disponível em: http://www.agenciaambiental.go.gov.br/geogoias/indice_inicial.php>. Acesso em: 24 abr. 2005.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415, n^o3, p.167-184, 1998.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v.22, p.25-34, 1999.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D. M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, v.78, p.93–98, 2006.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p.383-392, 2001.

BRENNAN, A. A.; HARWOOD, A. D.; YOU, J.; LANDRUM, P. F.; LYDY, M. J. Degradation of Fipronil in anaerobic sediments and the effect on porewater concentrations. **Chemosphere**, v. 77, p.22–28, 2009.

CAMPANA, M. A.; PANZERI, A. M.; MORENO, V. J.; DULOUT, F. N. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*, **Mutation Research**, v.438, p.155–161, 1999.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.655, Issues 1-2, p.41-46, 2008.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S., Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.538, nº1, p.81-91, 2003.

ÇAVAS, T.; KÖNEN, S. In vivo Genotoxicity Testing of the Amnesic Shellfish Poison (Domoic Acid) in Piscine Erythrocytes Using the Micronucleus Test and the Comet Assay. **Aquatic Toxicology**, v.90, p. 154-159, 2008.

CEE – Comunidade Econômica Européia. Directiva 80/778/CEE relativa à qualidade de águas destinadas ao consumo humano. **Jornal Oficial da Comunidade Européia**, n.L299, 20p, 1980. Na pagina:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31980L0778:PT:HTML>
acessado em 10 de dezembro de 2009.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; OLIVEIRA - RIBEIRO, C. A.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI, MS; FENOCCHIO, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, nº2, p.270–274, 2004.

CHANDLER, G. T.; CARY, T. L.; VOLZ, D. C.; WALSE, S. S.; FERRY, J. L., KLOSTERHAUS, S. L. Fipronil effects on copepod development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.23, p.117-124, 2004.

CORREA L. M.; KOCHHANN, D.; BECKER, A. G.; PAVANATO, M. A.; LLESUY, S. F.; LORO, V. L.; RAABE, A.; MESKO, M. F.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. ; BALDISSEROTTO, B.; Biochemistry, cytogenetics and

bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. **Aquatic Toxicology**, v.88, p.250–256, 2008.

COSTA, D. D. M.; NETO, F. F.; COSTA, M. D. M.; MORAIS, R. N.; GARCIA, J. R. E.; ESQUIVEL, B. M.; RIBEIRO, C. A. O. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 2009. (no prelo)

COUGHLAN, B. M.; HARTL, M. G. J.; O'REILLY, S. J.; SHEEHAN, D.; MORTHERSILL, C.; VAN PELT, F. N. A. M.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N. M. Detecting genotoxicity using the Comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v.44, p.1359–1365, 2002.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; LAZZARI, R.; DUARTE, M. F.; MORSCH, V. M.; PIPPI, A. L.; VIEIRA, V. P.; Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silvercatfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.65, p.48–55, 2006.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental, 167-178. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

DAS, P. C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, L. R. Fipronil induces CYP isoforms and citotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v.164, p.200-214, 2006.

DEGUCHI, Y.; TOYOIZUMI, T.; MASUDA, S.; YASUHARA, A.; MOHRI, S.; YAMADA, M.; INOUE, Y.; KINAE, N. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutation Research**, v.627, p.178–185, 2007.

DE LEMOS, C. T.; RODEL, P. M.; TERRA, N. R.; ERDTMANN, B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.20, p.1320-1324, 2001.

DIMITROV, D. B.; GADEVA, P. G.; BENOVA, D. K.; BINEVA, M. V. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. **Mutagenesis**, v. 21, n^o6, p.357-382, 2006.

DUBOCHET, J.; SARTORI BLANC, N.; The cell in absence of aggregation artifacts. **Micron**, v.32, nº1, p. 91-99, 2001.

ECOBICHON, D. J. Our changing perspectives on benefit and risks of pesticides: a historical overview. **Neuro Toxicology**, v.21, p.211-218, 2000.

FAOUDER, J. Le; BICHON, E.; BRUNSCHWIG, P.; LANDELLE, R.; ANDRE, F.; BIZEC, B. Le. Transfer assessment of Fipronil residues from feed to cow Milk. **Talanta**, v.73, p.710–717, 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p.81-95, 2000.

FENT, K. Ecotoxicology of organotins compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v.26, n.1, p.3-10, 1996.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação do efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PbII) em *Hoplias malabaricus* (Pisces) através dos ensaios: Cometa, Micronúcleo e de Aberrações Cromossômicas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003. 102p.

FERRARO, M. V.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; CESTARI, M. M.; RIBEIRO, C. A. O. Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the Comet Assay, Piscine Micronucleous and Chromosome Aberrations tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, nº1, p.103-107, 2004.

FRENZILLI, G.; FALLENI, A.; SCARCELLI, V.; Del BARGA, I.; PELLEGRINI, S.; SAVARINO, G.; MARIOTTI, V.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; REGOLI, F.; NIGRO, M. Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus* from a contaminated freshwater ecosystem. **Aquatic Toxicology**, v.89, p.188–196, 2008.

GANT, D. B.; CHALMERS, A. E.; WOLFF, M. A.; HOFFMAN, H. B.; BUSHEY, D. F. Fipronil: action at the GABA receptor. **Reviews in Toxicology**, v.2, p.147-156, 1998.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; MORAES, B. S.; SIMÕES, R. R.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Physiology and Biochemistry**, v.146C, p.519–524, 2007.

GOKSOYR, A.; ANDERSON, T.; BUHLER, D. R.; STEGEMAN, J. J.; WILLIAMS, D. E.; FORLIN, L. Immunochemical cross-reactivity of β -naphthoflavone – inducible Cytochrome P450 in liver microsomes from different fish species and rat. **Fish Physiology**, v. 9, p.1-13, 1991.

GOMORI, G. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. **Methods Enzymology**, v.1, p.138-146, 1955.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução a Genética**, 7ª ed, Guanabara-Koogan. 794p. 2002.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetic and Molecular Biology**, v.23, p.253–259, 2000.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoa, under influence of sewage treatment plant discharges, **Mutation Research, Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** v.491, p.39–44, 2001.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, v.518, p.145–150, 2002.

GRISOLIA, C. K.; BILICH, M. R.; FORMIGLI, L. M. A. Comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.59, p.123–126, 2004.

GRÜTZMACHER, D. D.; GRÜTZMACHER, A. D.; AGOSTINETTO, D.; LOECK, A. E., ROMAN, R.; PEIXOTO, S. C.; ZANELLA, R. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, nº6, p.632–637, 2008.

GUNASEKARA, A. S.; TROUNG, T. Environmental fate of Fipronil. **Environmental Monitoring Branch. Department of Pesticide Regulation. California Environmental Protection Agency. USA, 2007.**

HAINZL, D.; COLE, L. M.; CASIDA J. E. Mechanisms for selective toxicity of Fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. **Chemical Resources Toxicology**, v.11, p.1529-1535, 1998.

HEATH, A. G. Toxicology, water pollution and fish physiology, CRC. Press. 1987.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, v.18, p.187-192, 1973.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, P.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage; past, present and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.18, p.277–291, 1991.

HOSE, J. E.; CROSS, J. N.; SMITH, S. G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated of southern California. **Marine Environmental Research**, v. 22, p.167–176, 1987. doi:10. 1016/0141-1136(87)90034-1.

HOSHINA, M, M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research**, v. 656, p 44-48, 2008.

KATSUMITI, A.; VALDEZ DOMINGOS, F. X.; AZEVEDO, M.; SILVA, M. D.; DAMIAN, R. C.; ALMEIDA, M. I. M.; SILVA de ASSIS H. C.; CESTARI, M. M.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FREIRE, C. A. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. **Environment Monitoring Assessment**, 2008. DOI>10.1007/s10661-008-0309-3.

KIM, I.; HYUN, C. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p.288–297, 2006.

KISSLING, G. E.; DERTINGER, S. D.; HAYASHI, M., MACGREGOR, J. T. Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: Dependence on number of

cells scored and inter-animal variability. **Mutation Research**, v.634, p. 235–240, 2007.

KNUTSON, R. D. **Economic impacts of reduced pesticide use in the United States**: measurement of costs and benefits. Agricultural and Food Policy Center. AFPC 99- 2, 21p., 1999.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **Mammalian Mutagenicity Study Group Communications**, v.3, p.103–115, 1995.

KONWICK, B. J.; FISK, A. T.; AVANTS, J. K.; LONG J. M.; GARRISON, A. W. Bioaccumulation And Enantioselective Biotransformation Of Fipronil By Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). **Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality**. Proceedings of the Eighth International Symposium in China. U.S. Environmental Protection Agency, 2004.

LEGHAIT, J.; VÉRONIQUE, G.; NICOLE, P. H.; MARION, C.; ELISABETH, P.; PIERRE-LOUIS T.; CATHERINE, V. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v.255, p. 38–44, 2009.

LEMONS, C. T.; IRANÇO, F. A.; OLIVEIRA, N. C. D.; SOUZA, G. D.; FACHEL, J. M. G. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. **Science of the Total Environment**, v. 406, Issues 1-2, p. 337-343, 2008.

LIAO, W; McNUTT, M. A.; ZHU, W. G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v.48, p. 46–53, 2009.

LINDE-ARIAS, A. R.; INÁCIO, A. F; ALBURQUERQUE, C.; FREIRE, M. M.; MOREIRA, J. C. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. **Science of The Total Environment**, v. 399, Issues 1-3, p.186-192, 2008.

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.42, p. 630-648, 1985.

MASUDA, S.; DEGUCHI, Y.; MASUDA, Y.; WATANABE, T.; NUKAYA, H.; TERAOKA, Y.; Takamura, T.; WAKABAYASHI, K.; KINAE, N. Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2*H*-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay, **Mutation Research**, v.560, p.33–40, 2004.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S., MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A., Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148–158, 2006.

MAURER, H. R. Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture, In: R.I. FRESHNEY (Ed.), *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, Oxford, IRL Press, p.13–30, 1986.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M. N.; NAGEL, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Research**, v.371, p.47–55, 1996.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, v.367, p.245-251, 1996.

MIRANDA, A. L.; ROCHE, H. B.; RANDI, M. A. F.; MENEZES M. L., OLIVEIRA RIBEIRO C. A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. **Environment International**, v. 34, p.939–949, 2008.

MIRON, D.; CRESTANI, M.; SCHETINGER, M. R.; MORSCH, V. M.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, M. A.; MORAES, G.; VIEIRA, V. L. P. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuronmethyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.61, p.398-403, 2005.

MIZE, S. V.; PORTER, S. D.; DEMCHECK, D. K. Influence of Fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate

communities in streams of southwestern Louisiana, USA. **Environmental Pollution**, v.152, p.491-503, 2008.

MONTEIRO, S. M.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; SOUSA, M. Caracterização morfológica e ultrastrutural do epitélio branquial de peixes teleósteos. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v.11, p.13-36, 2004.

MOUCHET, F.; GAUTHIER, L.; MAILHES, C.; JOURDAIN, M. J.; FERRIER, V.; TRIFFAULT, G.; DEVAUX, A. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox® and Ames tests). **Science of the Total Environment**, v.355, nº 1-3, p.232-246, 2006.

NACCI, D.E.; CAYULA S.; JACKIM E., Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay, **Aquatic Toxicology**, v. 35, p.197–210, 1996.

NGIM, K. K.; CROSBY, D. G. Fate and kinetics of carfentrazone-ethyl herbicide in California, USA, flooded rice fields. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.20, p.485-490, 2001.

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

OHI, M.; DALSENTER, P. R.; ANDRADE, A. J. M.; NASCIMENTO, A. J. Reproductive adverse effects of Fipronil in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 146, p.121-127 (2004).

OJHA, J. Fish gills: potential indicators of ecodegradation of aquatic environments. In: MITTAL, A. K.; EDDY, F. B.; DATTAMUNSHI, J. S. (Editores). *Water/air transition in biology*. E.U.A.: Science Publishers, cap. 18, p.263-279, 1999.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Evaluation of cytotoxic effects of Fipronil on ovaries of semi-engorged *Hipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female, **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.2459-2465, 2008.

OSMAN, A.; ALI, E.; HASHEM, M.; MOSTAFA, M.; MEKKAWY, I. Genotoxicity of two pathogenic strains of zoosporic fungi (*Achlyaklebsiana* and

Aphanomyces laevis) on erythrocytes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.24–31, 2010.

PERRY, S. F. The chloride cell: structure and functions in the gills of freshwater fishes. **Annual Review of Physiology**, v.59, p.325-347, 1997.

POLLACK, N.; CUNNINGHAM A. R.; ROSENKRANTZ, H. S. Environmental persistence of chemicals and their carcinogenic risks to human, **Mutation Research**, v. 528, p.81–91, 2003.

POTTS, W. T. W.; PARRY, G. Osmotic and Ionic Regulation in Animals, **Pergamon**, Oxford, 1964.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**, Ed. Planta. 6ª impressão. 328p., 2001.

QUINN, G. P.; KEOUGH, M. J. **Experimental design and data analysis for biologists**. Cambridge University Press, Cambridge. 537p. 2002.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA de ASSIS, H. C.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, nº2, p.147–156, 2005. doi:10.1016/j.ecoenv. 2004.03.002.

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

REBOUÇAS, A. C. Disponibilidade de água: cenários e perspectivas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 12, nº 1, 1999.

REBOUÇAS, A. C. Água e desenvolvimento rural. **Estudos Avançados**. v. 15 nº43 , 2001.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**, Editora ULBRA, Canoas, 2003.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, v.30, nº 3, p.688-694. 2007.

RODRIGUEZ-CEA, A.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.56, p.442–448, 2003.

RYBAKOVAS, A.; BARŠIENE, J.; LANG, T. Environmental genotoxicity and cytotoxicity in the offshore zones of the Baltic and the North Seas. **Marine Environmental Research**, v.68, p.246–256, 2009.

SAUTCHUK, C.; FARINA, H.; HESPANHOL, I.; OLIVEIRA, L. H.; COSTI, L. O.; ILHA, M. S. O.; GONÇALVES, O. M.; MAY, S.; BONI, S. S. N.; SCHMIDT, W.; **Conservação e reuso da água em edificações**. São Paulo: Prol Editora Gráfica, 152p., 2005.

SCHLENK, D. Pesticide biotransformation in fish, chapter 6. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 6, p 171-190, 2005.

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

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, p. 75-86, 1997.

SCOTT, K. L.; LECAK, J.; ACKER, J. P., Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. **Transfusion Medicine Reviews**. v.19, nº2, p.127–142, 2005.

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

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S., Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent, **Mutation Research**, v.605, p.87–93, 2006.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (singlecell gel test), a sensitive test for the detection of DNA damage and repair. In D. S. Henderson (Ed.), *Methods in molecular biology: DNA repair protocols— eukaryotic systems* (pp. 203–211). Totowa: Human. 1999.

TAN, H.; CAO, Y.; TANG, T. QIAN, K.; CHEN, W.; LI, J. Biodegradation and chiral stability of Fipronil in aerobic and flooded paddy soils, **science of the total environment**, nº407, p.428–437, 2008.

THOMAZ, P. **Economia de água para empresas e residências**. Editora Navegar, 2ª Ed. São Paulo, 2001.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M., UPATHAM, E. S., POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S., JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure, **Environmental Pollution**, v.121, p.307–320, 2003.

TICE, R., Protocol for the application of the alkaline single cell gel SCG. assay to the detection of DNA damage in mammalian cells, January 5, 1995.

TKATCHEVA, V.; HYVARINEN, H.; KUKKONEN, J.; RYZHKOV, L. P.; HOLOPAINEN, I. J. Toxic effects of mining effluents on fish gills in a subarctic lake system in NW Russia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, p. 278-289, 2004.

TOWSEND, C. R; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em Ecologia**. Editora Artmed, 2ª Ed. 592p. 2006.

URSI, S.; GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. Deleterious effect of TRIS buffer on growth rates and pigment content of *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta), **Acta botânica brasileira**, v.22, nº3, p.891-896, 2008.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. New pesticide fact sheet. EPA-737-F-96-005, Washington, D.C. 1996 <http://www.epa.gov/EPA-PEST/1996/June/day-12/Factsheet.pdf>.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Prevention, Pesticide and Toxic Substances. Fipronil for use on rice (Regent®,

Icon®) and pets (Frontline®). HED risk assessment. Washington, D.C., p. 19,20,22. 1998.

VAN DER ELST, J., Cryo-preservation of the mouse oocyte. Contribution to the study of cryo-preservation of mammalian oocytes, PhD Thesis, pp. 243, 1992.

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, p.57–149, 2003.

VAN DER WERF, H. M. G. Accessing the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.60, p.81-96, 1996.

VAN GASTEL, C. A. M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomaker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, p. 217 – 225, 1996.

VENTURA, B. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.90, p.42–51, 2008.

VON SPERLING, E. **Morfologia de lagos e represas**. Belo Horizonte: DESA/UFGM, 1999.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. 3^a Ed. CRC Press. 2006. Disponível em: <<http://books.google.com/books?id=cFHEkzFJxQUCeprintsec=frontcoverehl=pt-BR>>

WIRTH, E.F.; PENNINGTON, P.L.; LAWTON, J.C.; DeLORENZO, M.E.; BEARDEN, D.; SHADDRIX, B.; SIVERTSEN, S.; FULTON, M.H. The effects of the contemporary-use insecticide (Fipronil) in an estuarine mesocosm. **Environmental Pollution**, v. 131, p. 365-371, 2004.

YADAV, K. K., TRIVEDI, S. P. Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*, **Chemosphere**, v.77, p.1495–1500, 2009.

YENDLE, J. E.; TINWELL, H.; ELLIOT, B. M.; ASHBY, J. The genetic toxicity of time: Importance of DNA – unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 375, p. 125 – 136, 1997.

ZODROW, J. M.; STEGEMAN, J. J.; TANGUAY, R. L. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorobibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. **Aquatic Toxicology**. v. 66, p. 25-38. 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)