



**TÁSSIA FLÁVIA DIAS CASTRO**

**TOXICIDADE DE FUNGICIDA COMERCIAL A  
BASE DE TEBUCONAZOL EM *Danio rerio***

**LAVRAS - MG**

**2016**

**TÁSSIA FLÁVIA DIAS CASTRO**

**TOXICIDADE DE FUNGICIDA COMERCIAL A BASE DE  
TEBUCONAZOL EM *Danio rerio***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dr. Luís David Solis Murgas

Orientador

Profa. Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado

Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Castro, Tássia Flávia Dias.

Toxicidade de fungicida comercial a base de tebuconazol em  
*Danio rerio* / Tássia Flávia Dias Castro. – Lavras : UFLA, 2016.  
78 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2016.

Orientador: Luís David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Triazol. 2. Ensaio cometa. 3. Teste do micronúcleo. 4.  
Embriões. 5. Glicose. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**TÁSSIA FLÁVIA DIAS CASTRO**

**TOXICIDADE DE FUNGICIDA COMERCIAL A BASE DE  
TEBUCONAZOL EM *Danio rerio***

**TOXICITY OF TEBUCONAZOLE BASED COMMERCIAL  
FUNGICIDE IN *Danio rerio***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 13 de setembro de 2016.

Profa. Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado      UFG - JATAÍ

Profa. Dra. Silvana Marcussi      UFLA

Dra. Gilmara Junqueira Machado      UFLA

Prof. Dr. Luís David Solis Murgas  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2016**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades que surgiram ao longo dela, por me guiar, iluminar meu caminho e dar forças para superar as adversidades.

Ao professor e orientador Dr. Luís David Solis Murgas pela oportunidade de realizar este trabalho, por todos os ensinamentos que certamente contribuíram para o meu crescimento profissional, por seu incentivo, confiança, apoio, ajuda e, sobre tudo pela amizade durante esses anos de convivência.

À minha coorientadora Mônica Rodrigues Ferreira Machado, pela ajuda na elaboração deste trabalho, pela brilhante orientação, compreensão e apoio em todos os momentos e por ter me incentivado a dar o melhor de mim. Pela acolhida em seu laboratório, me dando total liberdade de trabalho. Pela amizade, carinho e conselhos.

À banca avaliadora pelos comentários e sugestões pertinentes que ajudaram a engrandecer esta pesquisa.

Aos meus colegas de biotério por todo o carinho e auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Sem vocês eu não teria conseguido! Além disso, agradeço aos colaboradores de outros departamentos: Marcus Vinícius (PULGA) meu eterno amigo e ao Marcel Palmieri.

Ao Labfish por todo carinho com que fui recebida e por todo ensinamento. Lembrar-me-ei de cada um do grupo com muito carinho e saudade.

Aos meus pais, Joaquim e Carminha, e ao meu irmão Thiago, a vocês dedico essa dissertação, pelo amor e esforço incondicional a fim de permitir que eu chegasse até aqui. Por sempre terem sido um modelo de honestidade,

humildade, esforço pessoal, amizade e companheirismo. Vocês são a força motriz que impulsiona a minha vida. Amo vocês.

Ao meu namorado Victor Hugo, pela amizade, palavras incentivadoras, compreensão, cumplicidade e amor. Por toda a ajuda, dedicação, incentivo, carinho e paciência durante esses dois anos. Obrigada por tudo.

À Universidade Federal de Lavras, bem como à Rede Mineira de Bioterismo e à CAPES pela colaboração e apoio financeiro.

Agradeço a todos!

## RESUMO

Avaliar os efeitos da exposição de diferentes concentrações de tebuconazol, princípio ativo de fungicidas comerciais, sobre embriões e adultos de *Danio rerio*, através de ensaio de ansiedade, glicemia, danos no DNA e desenvolvimento embrionário. Foram realizados dois ensaios, sendo o primeiro com adultos da espécie visando avaliar parâmetros de estresse através do teste de mergulho em tanque novo, glicose plasmática e genotoxicidade com os testes de micronúcleo e ensaio cometa. No segundo ensaio, avaliou-se a toxicidade do fungicida influenciando o desenvolvimento embrionário de zebrafish. No ensaio 1, utilizou-se 320 exemplares adultos de *D. rerio* divididos em oito aquários, tendo sido expostos às concentrações de 0; 100; 200 e 300 µg/L de tebuconazol com suas respectivas réplicas nos tempos de 24, 72 e 96 horas. Após cada período de exposição, 10 animais foram retirados de cada aquário, levados para filmagem do teste de mergulho em tanque novo e em seguida realizados os procedimentos de coleta de sangue e brânquias para a realização dos demais. No ensaio 2, embriões de zebrafish foram expostos às concentrações de 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/L de tebuconazol por um período de 96h, sendo analisadas diariamente as alterações morfológicas e taxa de sobrevivência. Os resultados encontrados mostraram desvio comportamental de zebrafish, em que os animais expostos ao tebuconazol apresentaram-se mais ansiosos, diminuindo seu tempo de permanência na superfície do aquário. Para a glicose plasmática (mg/dL), não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Para os testes de micronúcleo e ensaios cometa à exposição de *D. rerio* ao tebuconazol resultou em aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de danos ao DNA em função do tempo de exposição e das diferentes concentrações de tebuconazol. Nos embriões, o tebuconazol não causou nenhuma malformação durante os estágios embrionários. As taxas de sobrevivência não foram alteradas nas doses de 12,5; 25 e 50 µg/L, apenas a dose de 100 µg/L foi capaz de atuar diminuindo a sobrevivência. Ao analisar diferentes doses dentro de um mesmo período de desenvolvimento embrionário, houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ), em que as maiores taxas de sobrevivência foram obtidas nas menores concentrações de tebuconazol. A concentração de 200 µg/L foi considerada altamente tóxica para os embriões, pois em menos de 24hpf todos os embriões haviam morrido. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o tebuconazol possui efeitos tanto nos adultos quanto em embriões de *Danio rerio*, gerando fragmentação no material genético e alterações no comportamento dos adultos, além de induzir letalidade nos embriões.

**Palavras-chave:** Triazol. Ensaio cometa. Teste do micronúcleo. Embriões. Glicose. Ansiedade.

## ABSTRACT

This work aimed at evaluating the effects of the exposure to different concentrations of tebuconazole, active principal for commercial fungicides, over *Danio rerio* embryos and adults, by means of anxiety, glucose, DNA damage and embryonic development trials. Two trials were conducted, the first with adults, aiming at evaluating stress parameters by means of new tank dive, plasma glucose and genotoxicity tests, as well as micronuclei test and comet trial. In the second trial, we evaluated the toxicity of the fungicide, influencing the embryonic development of zebrafish. In trial 1, 320 specimens of adult *D. rerio*, divided into 8 tanks, having been exposed to the concentrations of 0, 100, 200 and 300 µg/L of tebuconazole, with the respective replicates at times 24, 72 and 96 hours. After each period of exposure, 10 animals were removed from each tank, taken to filming of the new tank dive test having, subsequently, collected blood and gill samples to conduct the remaining tests. In trial 2, zebrafish embryos were exposed to the concentrations of 0, 12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/L of tebuconazole for a period of 96 hours, daily analyzing morphological changes and survival rate. The results show a behavioral deviation of the zebrafish, when the animals exposed to tebuconazole were more anxious, reducing the time of permanence at the surface of the tank. For plasmatic glucose (mg/dL) there was no significant difference ( $p>0.05$ ). For the micronuclei test and comet trial, the exposure to tebuconazole resulted in a significant increase ( $p<0.05$ ) of damage to the DNA in function of the time of exposure and different concentrations of tebuconazole. For the embryos, the tebuconazole caused no malformation during the embryonic stages. The survival rates were not altered with the doses of 12.5, 25 and 50 µg/L. Only the dose of 100 µg/L was capable of decreasing the survival. When analyzing the different doses within a same period of embryonic development, there was significant difference ( $p<0.001$ ), in which the higher survival rates were obtained at the lowest concentrations of tebuconazole. The concentration of 200 µg/L was considered highly toxic to the embryos, given that, in less than 24 hours, all embryos had died. The results obtained in this study allow us to conclude that tebuconazole has the same effects over *Danio rerio* embryos and adults, causing fragmentation of the genetic material and changes in the behavior of the adults, in addition to reducing embryo lethality.

**Keywords:** Triazole. Comet assay. Micronucleus test. Embryos. Glucose. Anxiety.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura do composto Tebuconazol. ....	16
Figura 2 -	Respostas comportamentais do zebrafish. ....	21
Figura 3 -	Formação de micronúcleo a partir de quebras cromossômicas não incorporadas ao fuso mitótico nem ao núcleo. ....	25
Figura 4 -	Divisão de um cometa em cabeça e cauda. ....	27
Figura 5 -	Aquário utilizado para o teste de mergulho em tanque novo. ....	37
Figura 6 -	Micronúcleo (setas) em eritrócitos de <i>Danio rerio</i> . ....	39
Figura 7 -	Classes de danos de DNA utilizadas no ensaio cometa. A- Classe 0; B- Classe 1; C- Classe 2; D- Classe 3; E- Classe 4. ....	42
Figura 8 -	Separação dos embriões em excelentes e ruins. (A) embrião excelente; (B1 e B2) embriões ruins malformação e células espalhadas. ....	45
Figura 9 -	Efeito das diferentes doses de tebuconazol sobre os parâmetros distância percorrida, velocidade máxima e tempo gasto na porção inferior. ....	47
Figura 10 -	Diferença no efeito das diferentes doses de tebuconazol sobre o percentual de tempo de permanência do zebrafish na superfície do aquário. ....	48
Figura 11 -	Frequência de micronúcleos em eritrócitos de zebrafish expostos a diferentes concentrações de tebuconazol. ....	53
Figura 12 -	Unidades Arbitrárias (UA) calculadas para nucleoides de células das brânquias de peixes <i>Danio rerio</i> expostos a diferentes concentrações de tebuconazol, durante 24, 72 e 96h. ....	57
Figura 13 -	Sobrevivência dos embriões de <i>Danio rerio</i> em relação ao tempo de exposição à dose de 100 µg/L de tebuconazol . ....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Culturas, doenças e doses utilizadas de tebuconazol.....	18
Tabela 2 - Concentrações plasmáticas médias de glicose (mg/dL) em zebrafish expostos a diferentes concentrações de tebuconazol e diferentes tempos de exposição.....	50
Tabela 3 - Porcentagens referentes às médias dos números de nucleoides classificados em cada score do teste cometa em zebrafish, avaliadas nos diferentes tempos experimentais e tratamentos com tebuconazol.....	55
Tabela 4 - Percentual de sobrevivência de embriões de zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) expostos ao tebuconazol em diferentes tempos de exposição.....	59

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1	Agrotóxicos .....	15
2.2	Toxicidade / problemática com o fungicida triazol (Tebuconazol) .....	16
2.3	Ensaio para estudos de efeitos de poluentes em organismos vivos .....	19
2.3.1	Parâmetros de estresse.....	19
2.3.1.1	Teste de mergulho em tanque novo .....	20
2.3.1.2	Biomarcadores metabólicos .....	22
2.3.2	Genética toxicológica .....	23
2.3.2.1	Teste do micronúcleo .....	24
2.3.2.2	Ensaio cometa .....	26
2.3.3	Embriotoxicidade.....	28
2.4	Peixes como modelos para estudo de mutagênese ambiental .....	29
2.5	Zebrafish na prospecção de efeitos de poluentes ambientais.....	30
3	OBJETIVOS .....	33
3.1	Objetivo geral .....	33
3.2	Objetivos específicos .....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	35
4.1	Local dos experimentos .....	35
4.2	Ensaio experimentais realizados .....	35
4.3	Análise Estatística .....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
5.1	Ensaio I “Exposição de adultos de <i>Danio rerio</i> ao fungicida .....	47
5.1.1	Teste de mergulho em tanque novo .....	47
5.1.2	Análise de glicose plasmática .....	50
5.1.3	Teste do micronúcleo .....	52
5.1.4	Ensaio cometa .....	54
5.2	Ensaio II: Exposição dos embriões de <i>Danio rerio</i> ao tebuconazol .....	59
6	CONCLUSÃO .....	63
	REFERÊNCIAS.....	65

## 1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento da população do planeta está levando à necessidade de uma maior oferta por alimentos, acompanhada por uma intensa atividade agropecuária. A elevação da produção de alimentos ocasiona um uso intensivo de defensivos agrícolas, a fim de combater doenças, pragas e a competição com plantas invasoras. No entanto, a utilização destes produtos vem sendo realizada de forma incorreta e ou de maneira inconsciente. Apesar do uso contínuo e intenso, pouco se sabe sobre os efeitos dos defensivos agrícolas em longo prazo e o efeito das altas dosagens na saúde pública e em animais.

Muitos defensivos como os fungicidas são utilizados desde a antiguidade, apresentando diferentes classificações de acordo com o princípio químico ativo. Dentre as classificações encontra-se o grupo dos triazois, os quais são altamente tóxicos por serem persistentes na água. Nesse grupo está inserido o princípio ativo tebuconazol.

Estudos indicam que este princípio ativo apresenta ação citotóxica, fitotóxica e clastogênica em plantas. Em mamíferos podem causar problemas no desenvolvimento neurológico, comprometimento do sistema imunológico de ratos e efeito negativo no desempenho reprodutivo de morcegos. Além disso, por serem facilmente transportados no ambiente, acabam contaminando rios e lençóis freáticos, afetando todos os organismos ali existentes, inclusive os peixes.

Os peixes são considerados importantes bioindicadores para a qualidade de água, pois são capazes de capturar e reter os xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo) dissolvidos em água, e por estarem expostos diretamente aos contaminantes, reagem sensivelmente a quaisquer alterações do meio. As alterações fisiológicas dos peixes associadas aos níveis de pesticidas presentes no ambiente, não só proporcionam um meio para compreender a dinâmica dos poluentes em termos biológicos, mas também podem ser usadas

como modelo para estudos de toxicidades desses poluentes em vertebrados, incluindo o homem.

Quando os peixes são expostos a uma substância tóxica, esse composto estranho no ambiente pode ameaçar o equilíbrio homeostático dos animais e causar alterações fisiológicas como variações na concentração de glicose plasmática ou alterações comportamentais, como maior tempo de permanência dos peixes no fundo do aquário em uma situação de estresse. Essas alterações podem ser facilmente medidas e avaliadas nos teste de toxicidade, no qual é possível mensurar o grau de ansiedade e estresse causado pela presença desses compostos no ambiente aquático.

Outra maneira de avaliação da ação de substâncias tóxicas nos peixes se faz através da detecção de modificações no DNA. Muitas substâncias tóxicas são capazes de impedir e ou modificar a replicação do DNA, por interagirem intimamente com o material genético das células, levando a uma alteração oxidativa ou mesmo quebras no DNA, interferindo na transmissão genética. A detecção dessas modificações no DNA pode ser realizada utilizando testes como do micronúcleo e ensaio cometa, os quais se mostram relativamente simples e baratos. Além dos adultos, os embriões também são amplamente utilizados em testes toxicológicos, área esta conhecida como embriotoxicidade.

A utilização de embriões de peixes, dependendo da substância que está sendo testada e do objetivo do trabalho, torna-se de extrema importância, pois são organismos mais sensíveis que os adultos, podendo em muitos casos apresentarem alterações que não são perceptíveis nos adultos. Os agentes tóxicos podem gerar alterações nos processos fisiológicos dos embriões, ocasionando má formação dos mesmos, interferindo no seu desenvolvimento e sobrevivência.

O peixe *Danio rerio* (zebrafish ou paulistinha) é considerado modelo experimental para humanos, por apresentar 70% de homologia genética com os mamíferos. Corresponde a um animal de pequeno porte, de fácil manutenção,

com alta taxa reprodutiva, de comportamento facilmente observável e quantificável. Nos últimos anos, tem atraído a atenção da comunidade científica, principalmente em estudos com monitoramento de toxicidade ambiental.

Baseado nos argumentos apresentados, visa-se com este estudo avaliar os efeitos toxicológicos do princípio ativo tebuconazol de fungicidas comerciais, através de ensaios utilizando embriões e adultos do peixe modelo *Danio rerio*.



## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Agrotóxicos**

Além dos efluentes industriais e domésticos lançados diretamente nos rios, muitos defensivos agrícolas são lixiviados para lagos e rios contaminando o ecossistema ali presente. Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas e agroquímicos são definições que se aplicam a compostos constituídos por diversas substâncias químicas ou produtos biológicos fabricados de forma a aumentar a ação biocida (VEIGA, 2007).

Os agrotóxicos por apresentarem diferentes formulações, podem ser agrupados em herbicidas, fungicidas, inseticidas, microbicidas, nematocidas e acaricidas, de acordo com o organismo alvo, sendo classificados quanto ao modo de ação, à finalidade, à toxicidade e à origem (KRÜGER, 2009).

Utilizados desde a antiguidade, os fungicidas constituem um dos principais defensivos utilizados na agricultura (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2008). Podem ser classificados em fungicidas sistêmicos e de contato e com relação ao grupo químico em triazol, ditiocarbamatos, benzimidazol e dicarboximidas.

Segundo dados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, os grupos dicarboximida e triazol e seus princípios ativos foram encontrados em amostras alimentares em elevada quantidade, ultrapassando o limite permitido (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2010).

Fungicidas do grupo triazol são altamente tóxicos, podendo chegar aos lençóis freáticos através de pulverizações ou escoamento superficial após a precipitação (RAUDONIS; SURVILIENE; VALIUSKAITE, 2004; KONWICK et al., 2006). Apresentam elevada estabilidade química e fotoquímica, baixa biodegradabilidade e fácil transporte no ambiente (WANG; ZHANG, 2012),

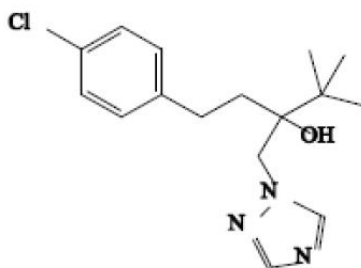


tornando-os persistentes em águas (BROMILLOW; EVANS; NICHOLLS., 1999). Nesse grupo estão os princípios ativos tebuconazol e difenoconazol. Neste trabalho é abordado o estudo com o tebuconazol.

## 2.2 Toxicidade / problemática com o fungicida triazol (Tebuconazol)

O tebuconazol (TZ) é um fungicida do grupo químico triazol com meia vida no solo de 20-25 dias, utilizado para controle de pragas, apresentando formulação molecular  $C_{16}H_{22}ClN_3O$  (FIGURA 1) e propriedades físico-químicas apresentadas na Quadro 1. De acordo com seu potencial de periculosidade ambiental, o tebuconazol enquadra-se na classe II, sendo considerado perigoso ao meio ambiente e altamente tóxico para organismos aquáticos, segundo a Anvisa (2010). De acordo com Montuelle et al. (2010), nos últimos anos, a concentração de tebuconazol tem aumentado em águas correntes e detectadas concentrações de 175-200  $\mu\text{g/L}$  em águas superficiais (ELSAESSER; SCHULZ, 2008).

Figura 1 - Estrutura do composto Tebuconazol.



Fonte:Shen et al.,2012.

Quadro 1 - Características gerais e propriedades físico-químicas do tebuconazol.

Nome químico	(RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol
Formula molecular	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O
Composição	Tebuconazol 20% m/v (200 g/L) Ingredientes inertes 80% m/v (800 g/L)
Tipo de formulação	Concentrado Emulsionável
Numero do CAS	107534-96-3
Estado físico	Líquido
Cor	amarelo translúcido
pH	6,12 a 25 <sup>0</sup> C
Densidade	1,0612 g/cm <sup>3</sup> a 20 <sup>0</sup> C
Viscosidade	99mPa.s. (20 <sup>0</sup> C)
Solubilidade	miscível em água, acetona e etanol.

Fonte: NUFARM INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÊUTICA, 2015.

Seu efeito fungicida é resultado da inibição do citocromo P450 (CYP450) dependente da enzima C14 $\alpha$ sterol-demetilase, a qual promove a dimetilação do lanosterol, um intermediário na biossíntese do ergosterol, interferindo assim, na síntese de esteróis, essenciais para a constituição normal das membranas celulares (MENEGOLA et al., 2008), o que dificulta o desenvolvimento da biomassa fúngica.

Tabela 1 - Culturas, doenças e doses utilizadas de tebuconazol.

CULTURAS	DOENÇAS	DOSES*		
		L do p.c./ha	mL do p.c./100 L de água	g do i.a./ha
Abacaxi	Fusariose ( <i>Fusarium subglutinans</i> )		100	20 g/100L de água
Arroz	Brusone ( <i>Pyricularia grisea</i> )	0,75		150
	Mancha-parda ( <i>Bipolaris oryzae</i> )			
Banana	Sigatoka-amarela ( <i>Mycosphaerella musicola</i> )	0,5		100
Batata	Pinta preta ( <i>Alternaria solani</i> )		100	20 g/100L de água
Café	Ferrugem-do-cafeeiro ( <i>Hemileia vastatrix</i> )	1,0		200
Cebola	Mancha-púrpura ( <i>Alternaria porri</i> )	1,0		200
Feijão	Ferrugem ( <i>Uromyces appendiculatus</i> )	0,75		150
Mamão	Antracnose ( <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> )	1,0		200
Manga	Antracnose ( <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> )		100	20 g/100L de água
	Oídio ( <i>Oidium mangiferaem</i> )			
Melancia	Antracnose ( <i>Colletotrichum orbiculare</i> )	1,0		200
	Podridão-amarga ( <i>Didymella bryoniae</i> )			
	Mildio-pulverulento ( <i>Sphaerotheca fuliginea</i> )			
Melão	Podridão-amarga ( <i>Didymella bryoniae</i> )	1,0		200
	Mildio-pulverulento ( <i>Sphaerotheca fuliginea</i> )			
Milho	Mancha-foliar ( <i>Exserohilum turcicum</i> )	1,0		200
	Ferrugem ( <i>Puccinia polysora</i> )			
	Ferrugem-comum ( <i>Puccinia sorghi</i> )			
Soja	Ferrugem-da-soja ( <i>Phakopsora pachyrhizi</i> )	0,3-0,5		60-100
	DFCs ( <i>Septoria glycines</i> e <i>Cercospora kikuchii</i> )	0,75		150
	Oídio ( <i>Microsphaera diffusa</i> )	0,3-0,5		60-100
Tomate	Septoriose ( <i>Septoria lycopersici</i> )		100	20 g/100L de água
Trigo	Helminthosporiose ( <i>Bipolaris sorokiniana</i> )	0,75		150
Uva	Podridão-da-uva-madura ( <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> )		100	20 g/100L de água
	Oídio ( <i>Uncinula necator</i> )			

\*p.c. = produto comercial; i.a.= ingrediente ativo

Fonte: NUFARM INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÊUTICA INDÚSTRIA, 2015.

A toxicidade do tebuconazol vem sendo investigada há alguns anos em plantas e animais, devido a sua alta permanência no ambiente de modo ativo e de seu fácil transporte, (WANG; ZHANG, 2012). Em estudos com plantas, em que o tebuconazol foi aplicado na dose indicada para campo em culturas de alface e crisântemo (75 mL para cada 100 L de água), houve inibição total do crescimento de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e de outros fungos (LOUREIRO et al., 2002). Também se observou o efeito deste fungicida sobre a germinação de sementes de cebola (*Allium cepa*), obtendo-se ação citotóxica e fitotóxica, por impedir a divisão celular e desenvolvimento de plântulas (BERNARDES et al., 2015).

O efeito do tebuconazol sobre vertebrados, principalmente peixes, é dependente da dose e espécie, como foi observado por Hussar et al. (2004), quando alevinos e juvenis de tilápia (*Tilapia rendalli*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foram submetidos a diferentes concentrações do fungicida, sendo obtidas diferentes respostas comportamentais. Em outro trabalho realizado

por Ferreira (2010), também foi possível observar que o tebuconazol induz estresse oxidativo em jundiá (*Rhamdia quelen*).

Em mamíferos, como ratos, são relatados problemas no desenvolvimento neurológico, comprometimento do sistema imunológico, além de alterações na função reprodutiva e na síntese de hormônios quando expostos ao tebuconazol (MOSER et al., 2001). Morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) expostos a tebuconazol cronicamente por 30 dias apresentaram diminuição no percentual de túbulos seminíferos e alterações nas células de Leydig, o que indica o efeito negativo no desempenho reprodutivo nessa espécie (MIRANDA, 2012). Em humanos, foram encontradas concentrações máximas de 19,2µg/L e 2,22ng/Kg em amostras de urina e cabelo, respectivamente, de trabalhadores agrícolas (FUSTINONI et al., 2012; SCHUMMER et al., 2012).

Impactos do tebuconazol sobre os organismos compreendem pesquisas recentes, sendo necessárias mais investigações sobre seus efeitos tóxicos, incluindo nos peixes.

### **2.3 Ensaios para estudos de efeitos de poluentes em organismos vivos**

Diversos ensaios podem ser realizados para análise do efeito de poluentes em organismos vivos, avaliando-se desde análises simples como as de alterações comportamentais até as mais complexas como análises a nível de molécula de DNA. Seguem algumas análises escolhidas para serem utilizados no presente trabalho.

#### **2.3.1 Parâmetros de estresse**

Quando um organismo é submetido a situações em que um desafio pode resultar em um perigo real ou simbólico para sua integridade, emprega-se, por definição, o termo estresse (TORT, 2011). De acordo com McEwen e Wingfield (2003), o estresse descreve eventos que representam ameaça, desencadeando

respostas fisiológicas e comportamentais como parte da alostase, somadas às respostas normais do ciclo de vida.

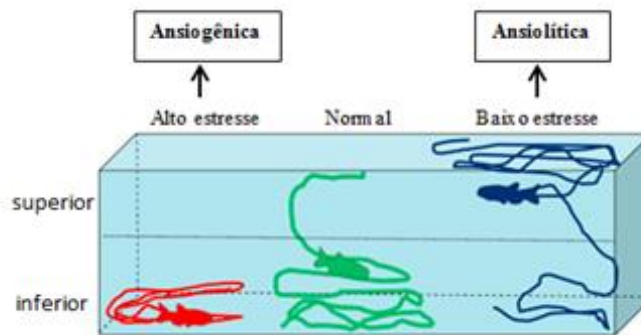
Segundo Barcellos et al. (2003), a poluição aquática é um ótimo exemplo de evento desencadeador de estresse nos organismos. Dependendo da substância presente na água e de sua toxicidade, essa pode ameaçar o equilíbrio homeostático dos seres vivos ali presentes, causando respostas integradas, envolvendo alterações fisiológicas e comportamentais.

### **2.3.1.1 Teste de mergulho em tanque novo**

Quando o animal encontra um ambiente novo e ou desconhecido, tende a se proteger por meio de mergulho e permanece na parte inferior até gradualmente, ao longo de um período de minutos, expandir sua posição de natação para porções superiores, quando se sentem seguros o suficiente para explorar. Testes explorando este comportamento instintivo de busca por proteção em ambientes desconhecidos têm sido descritos, sendo conhecidos o teste de campo aberto e o de mergulho em tanque novo (*novel tank diving test*) (LEVIN et al., 2007).

O teste de mergulho em tanque novo permite analisar as medidas comportamentais com padrões “verticais”, compreendendo o tempo gasto pelo animal no fundo do tanque como indicativo de ansiedade (CHAMPAGNE et al., 2010). Um animal encontra-se ansioso quando ocorre diminuição na exploração da porção superior, acompanhada de uma elevada latência para atingir essa porção. Portanto, substâncias que elevam o tempo de permanência do animal no fundo do aquário indicam ansiogênese, e manipulações que aumentam a exploração da superfície representam ansiólise (EGAN et al., 2009) (FIGURA 2).

Figura 2 - Respostas comportamentais do zebrafish.



Fonte: Adaptado de Kalueff et al. (2016).

Esse teste consiste do mais popular, sensível e fiável teste utilizado dentre os ensaios comportamentais realizados em zebrafish adulto (CACHAT et al., 2010). Usando esse teste, os pesquisadores são capazes de coletar e comparar parâmetros comportamentais para avaliar a ansiedade perante um ambiente novo ou alguma deficiência neurocomportamental causada por um medicamento ou substância tóxica.

Drogas ansiolíticas, como buspirona e fluoxetina são capazes de aumentar o tempo de permanência de peixes no topo do tanque, além de diminuir a latência para sair do fundo do aquário (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009). Drogas ansiogênicas como a cafeína ou feromônio de alarme, diminuem o tempo no topo (EGAN et al., 2009). Inseticidas também são capazes de alterar o comportamento normal dos animais. Crosby et al. (2015) ao estudarem a deficiência neurocomportamental em zebrafish expostos à imidacloprida, um inseticida neonicotinoide, demonstraram que o inseticida influenciou no tempo de permanência dos animais no topo, apresentando maior grau de ansiedade e estresse. Outros inseticidas como o diazinon e clorpirifós (LEVIN et al., 2010;

SLEDGE et al., 2011) aumentam a distância percorrida quando submersos num tanque novo e gastam um tempo significativamente menor na parte inferior do tanque.

### **2.3.1.2 Biomarcadores metabólicos**

A poluição aquática pode desencadear nos organismos uma série de reações conhecidas como respostas de estresse (BARCELLOS et al., 2003). Esse estresse pode levar a um aumento da demanda energética, caracterizando um estresse metabólico, podendo afetar as reservas de nutrientes do animal, como as reservas lipídicas e de proteínas em último caso. Uma das primeiras respostas é o aumento da glicose no sangue e a diminuição de glicogênio no fígado, na tentativa de suprir essa demanda energética (MORGAN; IWAMA, 2011).

Inicialmente, um estímulo estressor desencadeia a ativação do sistema nervoso simpático, que determinará a liberação dos hormônios adrenalina, noradrenalina além da liberação do cortisol pela adrenal. A liberação desses hormônios é considerada resposta primária do organismo frente ao agente estressor e desencadeia uma série de reações secundárias, como alterações hematológicas, metabólicas e osmo-iônicas (IWANA; AFONSO; VIJAYAN, 2006). Entre as alterações metabólicas, está a disponibilidade de glicose a partir dos estoques de glicogênio do fígado pelo processo de glicogenólise, ou indução de gliconeogênese para atender a demanda energética envolvida no mecanismo de adaptação do animal exposto ao agente estressor (IWAMA; AFONSO; VIJAYAN, 2006).

A concentração de glicose plasmática representa uma medida útil do estado energético de um organismo num dado momento, visto que um aumento na sua disponibilidade pode indicar a ocorrência de uma situação de estresse. Alguns trabalhos, nos quais os peixes foram expostos a agrotóxicos,

demonstraram a ocorrência de estresse, percebido pelo aumento dos níveis de glicose.

Crestani et al. (2006) observaram um quadro de hiperglicemia como resposta de estresse em jundiá (*Rhamdia quelen*) expostos a concentrações subletais do herbicida clomazone de 12 até 192 horas. Aumentos da taxa glicêmica também foram observados em piapara (*Leporinus obtusidens*) expostos ao herbicida glifosato (GLUSCZAK et al., 2006) e *Rhamdia quelen* e *Leporinus obtusidens* expostos ao herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (CATTANEO et al., 2008; FONSECA et al., 2008)

### **2.3.2 Genética toxicológica**

A genotoxicidade é uma área da genética que estuda eventos de clastogenicidade e mutagenicidade em organismos quando estes são expostos a agentes tóxicos (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Os agentes que mudam a sequência ou causam quebras em moléculas de DNA são chamados de genotóxicos. Estudos que envolvam a detecção e quantificação de danos genéticos são de extrema importância, principalmente devido ao seu interesse nas áreas ecológicas para estudos de alterações ambientais.

Para estudos da genotoxicidade, são feitos testes *in vitro* e *in vivo* desenhados para detectar o potencial das substâncias e ou agentes causadores de mutações genéticas e cromossômicas. Os agentes genotóxicos interagem intimamente com o material genético das células, levando a uma alteração oxidativa ou mesmo quebras no DNA. Na maior parte dos acontecimentos, a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula é eliminada, mas, caso isso não ocorra, haverá alterações hereditárias (mutações) (ABHILASH; SINGH, 2009; NAIK; PRASAD, 2006).

As medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos ao DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992). Também podem ser



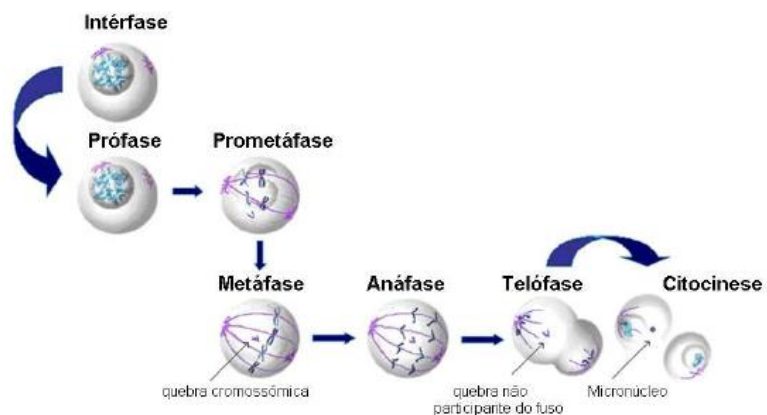
analisados defeitos hereditários (mutações em células germinativas), deleções, efeitos teratogênicos, aneuploidias e translocações. A detecção dessas medidas pode ser avaliada utilizando testes como o do micronúcleo e do cometa.

### **2.3.2.1 Teste do micronúcleo**

Micronúcleos são massas de cromatina citoplasmática que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntica em aparência ao núcleo celular, que emergem de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros deixados para trás na anáfase, durante a divisão celular. A presença de micronúcleos na célula é um reflexo da aberração cromossômica estrutural ou numérica durante a mitose (FENECH et al., 2000). Pode ocorrer tanto em células somáticas quanto germinativas, permitindo sua avaliação em qualquer tecido ou célula animal (UDROIU, 2006).

A análise baseia-se no princípio de que, durante o processo de divisão celular, principalmente na anáfase, fragmentos cromossômicos ou cromátides acêntricas deixam de ser transportadas pelas fibras do fuso para os pólos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômero o são. Após a telófase, os cromossomos sem dano são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas, enquanto que os fragmentos ou cromátides acêntricas não conseguem ser incluídas nos núcleos formados, permanecendo no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como micronúcleo (FENECH, 2000; JACOBOWSHI, 2009) (FIGURA 3).

Figura 3 - Formação de micronúcleo a partir de quebras cromossômicas não incorporadas ao fuso mitótico nem ao núcleo.



Fonte: (JACOBOWSHI, 2009).

As vantagens do teste do micronúcleo consistem em uma análise simples e rápida de um elevado número de células, menor custo, grande poder estatístico, utilização de pequenas concentrações de células, eficácia na identificação de danos clastogênicos (quebra de cromossomo) e aneugênicos (segregação cromossômica anormal) (CEPPI et al., 2010).

Embora grande parte dos estudos empregando esse teste tenha sido realizada com mamíferos (roedores), este se tem mostrado uma ferramenta muito útil para estudos com outros animais. Como os peixes aparentemente respondem a xenobióticos da mesma maneira que os mamíferos, e apresentam eritrócitos nucleados, possibilitando o uso destas células para averiguar a presença de micronúcleos, podem ser utilizados para avaliar possíveis propriedades genotóxicas de agentes químicos e físicos presentes no ambiente aquático (AL-SABTI; METCALFE, 1995; UDROIU, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado uma alta incidência de micronúcleos em eritrócitos de peixes expostos em diferentes ambientes e a agrotóxicos. Alguns estudos relataram uma elevada frequência de micronúcleos em eritrócitos circulantes de tilápias (*Oreochromis mossambicus*) (MOTA; BARBONI; JESUS, 2009; NEPOMUCENO; SPANÓ, 1992; SOUZA; FONTANETTI, 2006), enquanto que Silva e Neponuceno (2010) observaram uma elevada frequência pesquisando mandi amarelo (*Pimelodus maculatus*). Nepomuceno e Spanó (1997) demonstraram em carpa comum (*Cyprinus carpio*) expostas ao mercúrio metálico, nas doses 2, 20 e 200mg Hg/litro de água, um aumento na frequência de micronúcleos nas mais altas concentrações.

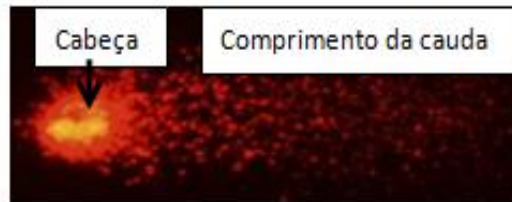
Hose et al. (1987) aplicaram com sucesso o teste do micronúcleo para a detecção de danos em eritrócitos de peixes de ambientes poluídos no Sul da Califórnia. Scotto et al. (2013) obtiveram sucesso ao realizar análise genotóxica de amostras de água do Rio Ramis (Peru) utilizando eritrócitos de *Danio rerio* (zebrafish). Chapadense et al. (2009) demonstraram aumento significativo no número de micronúcleos em tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos ao herbicida atrazina, sugerindo ação genotóxica do herbicida na espécie avaliada. Micronúcleos também foram encontrados em goldfish (*Carassius auratus*) expostos a concentrações de 5, 10 e 15ppm do herbicida Roundup®, em que a exposição levou a um aumento na frequência de MN de forma significativa após os tratamentos (ÇAVAS; KÖNEN, 2007).

#### **2.3.2.2 Ensaio cometa**

Para estudos que tenham como interesse científico demonstrar danos no DNA induzidos por substâncias genotóxicas, o ensaio cometa representa uma valiosa ferramenta. O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com fragmentos de DNA (BOMBAIL et al., 2001).

O princípio desta técnica baseia-se no fato de que moléculas de DNA quando apresentam algum dano, podem gerar fragmentos de diversos tamanhos. Um dano intenso resulta em fragmentos de diversos tamanhos, os quais, devido ao peso molecular, migrarão em velocidades diferentes, originando a figura de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990), (FIGURA 4). Quando as moléculas de DNA não apresentarem nenhum dano, migrarão de forma homogênea formando um círculo.

Figura 4 - Divisão de um cometa em cabeça e cauda.



Fonte: Arquivo pessoal

O ensaio cometa apresenta algumas vantagens, como: necessidade de um baixo número de células para a realização do teste; pode ser realizado em ensaios *in vivo* e *in vitro*; mensuração de danos em células individuais; é um método muito sensível para detecção de danos no DNA e possibilidade de ser realizado em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada (LEE; STEINERT, 2003).

Diversos trabalhos comprovam que o ensaio cometa é capaz de detectar danos no DNA causados por diferentes classes de mutagênicos em peixes. Em 1995, Pandrangi demonstrou que carpa comum (*Cyprinus carpio*) e peixe gato (*Ameiurus nebulosus*), quando expostos à ciclofosfamida, apresentavam um aumento nos danos do DNA das células avaliadas (eritrócitos), utilizando o ensaio cometa. Devaux, Pesonen e Monod (1997) também mostraram o aumento no comprimento da cauda dos nucleoides após a exposição de hepatócitos de

truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*) ao benzopireno e ao peróxido de hidrogênio.

Ferraro (2009) analisando o efeito do Roundup e Folicur em jundiá (*Rhamdia quelen*), carpa comum (*Cyprinus carpio*) e lambari (*Astyanax bimaculatus*) e Nwani et al. (2011) analisando um herbicida à base de atrazina em peixe cabeça de cobra (*Channa punctatus*) demonstraram a grande eficiência do ensaio no monitoramento das águas. Deve-se destacar, entretanto, que a resposta depende das espécies, do tipo de célula, condições experimentais, do contaminante e do tempo de exposição do animal. Além do sangue, outros tecidos podem ser utilizados, como o fígado, por se tratar do principal órgão metabolizador, as brânquias, devido ao contato contínuo com a água e os rins corresponderem ao tecido hematopoiético em peixes (BELPAEME et al., 1998).

O ensaio do Cometa, por suas diversas vantagens já citadas e por ser rápido, relativamente econômico, preciso e reproduzível, torna-se um sistema teste adequado para o biomonitoramento ambiental e na genética toxicológica (TICE, 1995).

### **2.3.3 Embriotoxicidade**

Os ensaios de embriotoxicidade geralmente são realizados por meio da exposição direta de embriões a substâncias tóxicas (HALLARE et al., 2006). Estudos prévios revelam que a sensibilidade de embriões e larvas a agentes químicos é muito maior que para adultos (LUCKENBACH et al., 2001). Essa maior sensibilidade deve-se a sua imobilidade e por apresentarem imaturidade fisiológica, possuindo baixos níveis de enzimas para desintoxicação (WESTERFIELD, 2000). Se em qualquer altura desta fase de desenvolvimento, um estresse ambiental, originado por um poluente, induz alguma alteração no desenvolvimento, as hipóteses de sobrevivência são imediatamente reduzidas.

O uso de embriões e larvas oferece uma alternativa barata e eficaz, pois são organismos que ainda não se alimentam; quando utilizados em testes de toxicidade requerem pequena quantidade da substância teste, o que é particularmente importante quando estão disponíveis quantidades limitadas de substâncias. Os testes envolvendo embriões são considerados como testes em não animal, devido aos embriões ainda não terem desenvolvido a percepção da dor comparáveis aos adultos (LAMMER et al., 2009).

O desenvolvimento embrionário em teleósteos é um processo que se inicia na fertilização e finaliza na eclosão, envolvendo os períodos de zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e organogênese. Trata-se de um fenômeno complexo que permite estudar a ontogenia das espécies, podendo, os embriões serem utilizados em processos biotecnológicos, em bioindicação e em experimentos toxicológicos (BOTERO et al., 2004). Na maioria dos casos, os resultados obtidos em um ensaio de fase de vida precoce são capazes de refletir os efeitos que seriam obtidos em um ciclo de vida.

#### **2.4 Peixes como modelos para estudo de mutagênese ambiental**

Há muitos anos, os peixes têm recebido uma atenção especial como possíveis monitores de ambientes poluídos, objetivando assim, a detecção da atividade dos agentes genotóxicos no ambiente aquático (UDROIU, 2006). Como vertebrados aquáticos, os peixes metabolizam poluentes diretamente através da água contaminada ou indiretamente pela ingestão de outros organismos contaminados (MATSUMOTO et al., 2006) respondendo de forma similar aos vertebrados superiores quando expostos às substâncias tóxicas (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Os peixes são geralmente usados como organismos sentinelas, por apresentarem uma série de papéis na rede trófica: no estudo da toxicologia aquática, por acumularem substâncias tóxicas e por responderem a baixas

concentrações de mutagênicos. Também apresentam a vantagem de fácil manipulação em laboratório, econômicos para criação e facilidade no emprego de testes citogenéticos (ÇAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2005).

Assim, o uso de peixes como índice de efeitos da poluição através da biomarcação é de grande importância e pode permitir a detecção de problemas aquáticos ambientais no início dos mesmos (LÓPEZ-BAREA, 1996; VAN DER OOST et al., 2003).

### **2.5 Zebrafish na prospecção de efeitos de poluentes ambientais**

*Danio rerio* (Zebrafish), também conhecido como paulistinha, é um pequeno teleosteo (3 a 4 cm) de água doce (SPENCE et al., 2008), proveniente do Sul da Ásia, com origens nos campos de arroz dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal. Apresenta este nome por ter um padrão de listras horizontais, sendo que a coloração destas pode alterar de mais clara a mais escura dependendo das circunstâncias e do ambiente em que se encontra o indivíduo (ENGESZER et al., 2007).

Por ser um peixe de pequeno porte, de manutenção fácil, econômico para criação, com alta taxa reprodutiva, de comportamento facilmente observável e quantificável em um ambiente controlado, nos últimos anos, tem atraído a atenção da comunidade científica. Apresentam importante homologia com os mamíferos e possuem seu genoma sequenciado (KARI; RODECK; DICKER, 2007; LIESCHKE; CURRIE, 2007).

O zebrafish tem sido largamente utilizado para o monitoramento da toxicidade ambiental, efeito aditivo e toxicidade de substâncias como metais pesados, compostos carcinogênicos e agrotóxicos. Mu et al. (2015) ao submeterem o zebrafish a diferentes concentrações de difenoconazol, reduziram significativamente o nível de colesterol hepático em machos, além dos embriões terem apresentando anomalias.

Pesticidas organoclorados (aldrin e heptacloro) afetaram o crescimento e morfologia das brânquias de *D. rerio* expostos por sete dias (CAMPAGNA et al., 2007). Tecidos musculares e cérebro, quando expostos a efluentes agrícolas, apresentaram alterações na atividade da acetilcolinesterase, na expressão de melatonina, enzimas antioxidantes e níveis de glutathione indicando resposta ao estresse (COSTA-SILVA et al., 2015). As vantagens deste modelo combinadas com as ferramentas para manipulação e análise tornaram o zebrafish particularmente adequado para estudos genotóxicos.





### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da exposição de diferentes concentrações de tebuconazol, princípio ativo de fungicidas comerciais, sobre embriões e adultos de *Danio rerio*, através de ensaio de ansiedade, glicemia, danos no DNA e desenvolvimento embrionário.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliar a ansiedade de adultos de zebrafish, (*D. rerio*) através do teste de mergulho em tanque novo;
- b) Analisar o nível de glicose sanguínea de adultos de zebrafish, (*D. rerio*) através da coleta de sangue;
- c) Avaliar danos no DNA de eritrócitos obtidos de adultos de zebrafish, (*D. rerio*) através do ensaio micronúcleo;
- d) Avaliar os níveis de fragmentação do DNA de células sanguíneas e branquiais obtidas de adultos de zebrafish (*D. rerio*);
- e) Verificar a sobrevivência e alterações no desenvolvimento de embriões de zebrafish (*D. rerio*).



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local dos experimentos**

O experimento foi realizado na Ala de Peixes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras, MG. Os testes com os adultos foram realizados nos meses de novembro de 2015 a fevereiro de 2016 e os ensaios com embriões nos meses de julho a agosto de 2016.

### **4.2 Ensaios experimentais realizados**

As análises da toxicidade do fungicida tebuconazol ocorreram em dois ensaios:

- a) Ensaio 1: avaliou-se a resposta ao estresse através do teste de mergulho em tanque novo e glicose plasmática e os possíveis danos gerados ao DNA das células dos indivíduos adultos de zebrafish, foram analisados através do teste do micronúcleo e o ensaio cometa.
- b) Ensaio 2: avaliou-se a toxicidade do fungicida pela influência deste no desenvolvimento embrionário de zebrafish.

Todos os ensaios envolvendo o uso de peixes foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal incluídos nas normas da Comissão de Ética no Uso de Animais, tendo sido aprovados pela mesma e estando o projeto protocolado sob nº 057 desde 2015.

#### **Ensaio I: Exposição dos adultos de *Danio rerio* ao tebuconazol**

Foram utilizados trezentos e vinte espécimes adultos de *D. rerio* de ambos os sexos, com aproximadamente cinco meses, com peso médio de 0,4817 gramas. Os animais foram adquiridos diretamente de um produtor, localizado na

Fazenda São Domingos, no município de Muriaé - MG. Antes de serem submetidos ao teste de toxicidade, foram aclimatados durante 30 dias em caixas de polietileno de 500 L, mantidos em densidade de estocagem de dois animais por litro.

Encerrado o período de aclimação, os exemplares foram submetidos ao teste de toxicidade em aquários de 20 L (unidade experimental), em um delineamento inteiramente casualizado, sendo utilizados três tratamentos (100; 200 e 300 µg/L de tebuconazol) e um grupo controle (água), com suas respectivas réplicas, totalizando oito aquários. As concentrações foram calculadas utilizando como referência a concentração subletal do tebuconazol para zebrafish de 230 µg/L apresentada por Sancho et al. (2010).

Em cada unidade experimental, foram colocados 40 peixes, ficando expostos aos tratamentos por um período de 24, 72 e 96 horas. Durante todo o período experimental, os animais não foram alimentados e foram monitorados diariamente os valores de pH e temperatura. Após cada período de exposição (24, 72 e 96h), dez animais eram retirados de cada um dos aquários e levados para o teste de mergulho em tanque novo.

#### A) Teste de mergulho em tanque novo

Os tanques para o teste consistiam de aquários de policarbonato com tamanho de 11,5 cm x 34,5 cm x 15,5 cm, dispostos em uma superfície nivelada e estável e foram estes divididos em duas porções horizontais virtuais iguais, marcados por uma linha divisória nas paredes exteriores (FIGURA 5).

Figura 5 - Aquário utilizado para o teste de mergulho em tanque novo.



Fonte: Arquivo pessoal

Os animais foram colocados individualmente nos tanques experimentais para facilitar a filmagem comportamental. Assim que eram transferidos para o aparato, os animais passavam por um período de aclimatação de 3 minutos e logo após seu comportamento era registrado por uma câmera digital. A câmera era posicionada à frente do aquário para que fosse possível a filmagem do animal explorando todo o ambiente. O comportamento de natação dos peixes foi gravado ao longo de um período de 6 minutos e os vídeos analisados utilizando o *software* Ethovision XT (Noldus, Holanda). Foram analisados os seguintes parâmetros: a distância percorrida (cm), a velocidade máxima (cm/s) o tempo gasto na porção superior do tanque. Não houve exposição ao tebuconazol durante o experimento comportamental.

Após o teste comportamental, os animais foram eutanasiados com superdosagem de óleo de cravo (55 mg/L) (WONG et al., 2014), sendo posteriormente coletadas amostras de sangue e brânquias para as análises de glicose, teste do micronúcleo e ensaio cometa.

### B) Análise de glicose plasmática

Imediatamente após os animais serem retirados dos aquários do teste comportamental e eutanasiados, realizava-se a coleta de amostras de sangue através de um corte na região caudal dos animais. A glicose foi analisada através de um glicosímetro (Breeze 2®), e foram obtidos os valores de glicose sanguínea (mg/dL) pela leitura de fitas colorimétricas contendo uma gota de sangue.

### C) Teste do micronúcleo

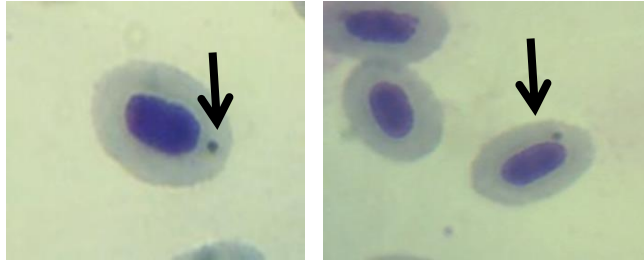
O procedimento para o teste do micronúcleo seguiu a metodologia descrita por Al-Sabti e Metcalfe (1995) e a coleta de sangue conforme descrito por Vilches (2009). Após a avaliação da glicose, o sangue restante era utilizado para a composição do esfregaço sanguíneo, sendo confeccionada uma lâmina por animal (20 lâminas por tratamento/tempo). As lâminas eram fixadas em metanol P.A por um minuto e após secarem, coradas com corante Panótico Rápido. Este corante foi utilizado por conferir uma distinção satisfatória entre eritrócitos, corando o núcleo de azul escuro e o citoplasma de azul claro.

A análise citológica foi registrada com avaliação cega por um único observador para evitar qualquer variação técnica. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico de luz (Motic BA 310) com aumento de 1.000 X, sendo três mil eritrócitos intactos contados por lâmina de acordo com a metodologia proposta por Carrasco, Tilbury e Mayers (1990) e a determinação da frequência de micronúcleos (FIGURA 6), seguindo os critérios:

- a) tamanho menor que 1/3 do núcleo;
- b) mesmo plano de foco do núcleo;

- c) padrão da estrutura e coloração da cromatina idênticos ao núcleo;
- d) nenhuma ligação com o núcleo.

Figura 6 - Micronúcleo (setas) em eritrócitos de *Danio rerio*.



Fonte: Arquivo pessoal

#### D) Teste do cometa

##### 1) Preparação das soluções necessárias

##### **Solução de lise**

Uma solução de lise estoque contendo 2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA e 10 mM de Tris diluídos em água autoclavada foi preparada, sendo ajustado o pH para 10. Na hora do uso dessa solução, cada 1.000 mL da mesma foi adicionada a 10 mL de Triton X-100 e 100 mL de DMSO, sendo utilizada para imersão das lâminas contendo as células incluídas em agarose de baixo ponto de fusão (LMP), preparada a 1,5%. A solução de lise permite a obtenção de nucleoides, massas de moléculas de DNA anteriormente contidas no núcleo, sendo eliminadas, durante a lise: membranas, organelas e demais moléculas que fazem parte da composição celular.



### **Solução de eletroforese**

30 mL de uma solução de 0,075 g/L de EDTA (100 mM) e 5 mL de uma solução de 2,5 g/L de NaOH (300 mM) foram misturadas à água ultrapura a 4 °C, completando-se o volume para 1 L.

### **Solução de neutralização**

Para a neutralização das lâminas submetidas à eletroforese, uma solução de 0,4 M de Tris foi preparada, sendo o pH acertado para 7,5.

Todas as soluções foram armazenadas e utilizadas a 4 °C.

## 2) Passos para preparação das lâminas e avaliação

### **Preparo das lâminas**

O preparo das lâminas seguiu a metodologia descrita por Singh et al. (1988) com algumas modificações, em que lâminas de ponta fosca foram embebidas em agarose com ponto de fusão normal (NMP) preparada a 1,5%. As lâminas permaneceram em ambiente limpo à temperatura ambiente até a secagem da agarose, sendo utilizadas posteriormente como suporte para a inclusão das células.

### **Obtenção do material biológico e inclusão em agarose**

Pelo fato de o zebrafish ser um animal muito pequeno, a coleta de sangue torna-se muitas vezes dispendiosa e ou se obtém pequenas quantidades. Por esses motivos, optou-se pela utilização das brânquias neste ensaio.

Em microtubos contendo 500 µL de soro fetal bovino, foram colocadas brânquias de dois animais, ambos do mesmo tratamento. As brânquias por serem muito pequenas e sensíveis, para a realização da extração de células, foi realizada a maceração do material com o auxílio de um bastão de vidro.

Em seguida, misturou-se uma alíquota de 50  $\mu$ L da suspensão celular a 100  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP). A mistura foi homogeneizada e adicionada a uma lâmina de vidro revestida previamente por agarose de ponto de fusão normal, sendo imediatamente coberta por lamínula. Setenta lâminas, sendo cinco de cada tratamento, incluindo o controle, foram preparadas e levadas para um refrigerador por cerca de 5 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas colocadas em cubas verticais, permanecendo imersas em solução de lise no escuro, a 4 °C, por aproximadamente 12 horas.

#### **Eletroforese e fixação das lâminas**

Quando retiradas da lise, as lâminas foram acondicionadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo solução alcalina (NaOH 300 mM, EDTA 1mM, pH > 13), onde permaneceram por 20 minutos. Em seguida, realizou-se a eletroforese a 25 V e 300 mA, por período de 30 minutos. Ao término do processo de eletroforese, as lâminas foram imersas em solução de neutralização, por período de 25 minutos.

As lâminas permaneceram em ambiente arejado à temperatura ambiente até a secagem completa sendo, em seguida, fixadas em etanol absoluto, por imersões durante 3 minutos e, novamente, secas à temperatura ambiente.

Todos os procedimentos, desde a coleta das brânquias dos animais até a neutralização das lâminas submetidas à eletroforese, foram realizados na ausência de luz.

#### **Coloração e avaliação das lâminas**

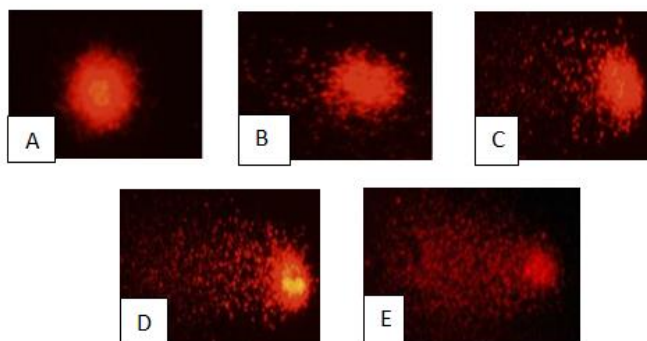
Para medir o dano ao DNA através do ensaio cometa, 100 nucleoides de cada lâmina (5 lâminas por tratamento) foram contados e classificados em

microscópio de epifluorescência utilizando aumento de 400X, após coloração com iodeto de propídio (40  $\mu$ L de uma solução a 1,5  $\mu$ g/L),

Os nucleoides foram avaliados visualmente, conforme metodologia descrita por Collins et al. (1997) e caracterizados em “scores” de 0 a 4 (FIGURA 7), conforme o dano observado de acordo com o tamanho da cauda e diâmetro da cabeça, em:

- a) Classe 0: nenhum dano, ou seja, nucleoides intactos, sem cauda;
- b) Classe 1: dano pequeno, os nucleoides apresentam um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça;
- c) Classe 2: dano intermediário, os nucleoides apresentam tamanho de cauda equivalente a uma vez o diâmetro da cabeça;
- d) Classe 3: dano elevado, os nucleoides apresentam tamanho de cauda equivalente a duas vezes o diâmetro da cabeça;
- e) Classe 4: dano máximo, os nucleoides apresentaram caudas com tamanho superior a duas vezes o diâmetro da cabeça.

Figura 7 - Classes de danos de DNA utilizadas no ensaio cometa. A- Classe 0; B- Classe 1; C- Classe 2; D- Classe 3; E- Classe 4.



Fonte: Arquivo pessoal

Todos os nucleoides foram avaliados no escuro (para evitar a perda da fluorescência das lâminas coradas) e por apenas um observador, minimizando assim erros relativos às definições de scores diferentes mesmo que de forma sutil.

Os “scores” obtidos no teste cometa foram multiplicados pela frequência de células que apresentam cada score para um dado tratamento, obtendo-se um valor de Unidade Arbitrária (UA), conforme descrito por Collins et al. (2004) que varia de 0 a 400 para cada tratamento (0 indica ausência total de danos e 400, dano máximo), de acordo com a fórmula:

$$\text{Índice de dano: } (0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D) + (4 \times E)$$

Em que, A, B, C, D e E são os números de células encontradas para cada categoria analisada.

## **Ensaio II: Obtenção e exposição dos embriões de *Danio rerio* ao tebuconazol**

### **Metodologia para obtenção de embriões:**

Os adultos de zebrafish foram adquiridos diretamente de um produtor, localizado na Fazenda São Domingos no município de Muriaé - MG no mês de março de 2016. Os animais foram mantidos em uma caixa d'água de 500 L durante trinta dias em período de aclimação, mantidos em densidade de estocagem de dois animais por litro.

Após o período de aclimação, os animais foram acondicionados em uma raque específica para a espécie (Rack Hidrus, modelo ZEB-40), mantidos em aquários de policarbonato, com tamanho de 11,5 cm x 34,5 cm x 15,5 cm, com capacidade para 15 peixes. Qualidade da água e temperatura de 28,5 °C

eram controladas de forma automatizada pela raque e os peixes eram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial e mantidos em ciclo de luz 14:10 (claro/escuro).

Para a reprodução, os adultos de *D. rerio* foram separados de acordo com o sexo no dia anterior a cada reprodução, em pequenas criadeiras mantidas em aquários de 60 L. Foram selecionadas as fêmeas com ventres abaulados e machos com coloração amarelada forte nas nadadeiras peitorais. No dia seguinte pela manhã, os machos foram acondicionados na criadeira das fêmeas (2 machos / 1 fêmeas) uma ou duas horas antes do término do período escuro (LAMMER et al., 2009).

Logo após a reprodução, os embriões foram coletados por meio de um sifão e mantidos em meio E3, em placas de Petri (100 embriões por placa) até que alcancem a fase de 50% de epibolia (5 horas após a fertilização). O meio E3 consiste de um meio que permite a padronização do desenvolvimento embrionário do zebrafish (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>, e 0,1% de azul de metileno) (DI PRINZIO et al., 2010).

Todos os procedimentos experimentais, tanto a reprodução quanto os testes toxicológicos, seguem especificações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2013).

#### Exposição dos embriões ao tebuconazol

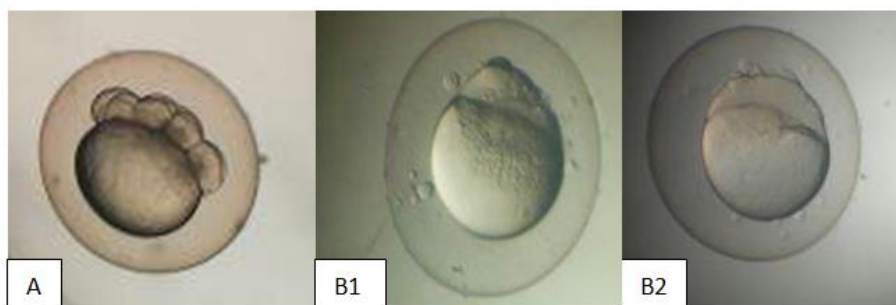
Após a coleta dos embriões, estes foram alocados em placas de Petri contendo meio E3, sendo em seguida classificados de duas formas: como excelentes ou ruins. As avaliações eram realizadas com o auxílio de um microscópio óptico de luz (Motic BA 310) com aumento de 4X. Eram considerados excelentes todos os embriões que não apresentavam alterações visíveis, com tamanho, cor e textura uniforme. Os embriões ruins apresentavam

malformação, lesões no córion e alterações na cor e tamanho, sendo estes descartados (FIGURA 8). Após separação, os embriões classificados como excelentes foram mantidos nas placas de Petri até a montagem do teste de concentração com o fungicida.

O ensaio com os embriões foi realizado em placas de 96 poços, sendo alocado 1 embrião por poço. Para o teste de toxicidade, foi utilizada a metodologia de microdiluição, em que o tebuconazol foi diluído seriadamente, na proporção de 1:1, com concentração inicial de 200 g/L, buscando uma concentração final de 200 µg/L. Em sequência, executou-se a adição de 100 µL de meio E3 por poço, e fez-se a diluição de 1:2, descartando-se 100 µL no final da última concentração, perfazendo uma série de microdiluições em cinco concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5 µg/L). O controle possuía apenas meio E3. Foram realizadas triplicatas de cada tratamento, sendo utilizados 144 embriões por tratamento.

As placas de 96 poços foram mantidas em temperatura ambiente durante todo o desenvolvimento embrionário (96 horas) e cobertas com Parafilm® para evitar o possível efeito de evaporação (BRANDHOF; MONTFORTS, 2010).

Figura 8 - Separação dos embriões em excelentes e ruins. (A) embrião excelente; (B1 e B2) embriões ruins malformação e células espalhadas.



Fonte: Arquivo pessoal

As avaliações dos embriões para as concentrações letais e alterações no desenvolvimento embrionário devido à toxicidade do tebuconazol foram realizadas nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas. Foram avaliadas as seguintes características: não fertilização, formação de blástula e gástrula, não desenvolvimento de somitos, desenvolvimento dos olhos, movimentos espontâneos, presença de circulação na aorta dorsal, grau de pigmentação da larva, edema durante a formação do coração, não descolamento de cauda, falta de batimento cardíaco e retardo de crescimento (HALLARE; KOHLER; TRIEBSKORN, 2004). Com base nos parâmetros normais da espécie (KIMMEL et al., 1995), quaisquer outras características que não correspondessem ao desenvolvimento da espécie eram consideradas como alterações morfológicas.

O número de indivíduos mortos e o estágio de desenvolvimento foram verificados todos os dias, sendo removidos e contabilizados todos os embriões que não apresentavam batimento cardíaco, circulação sanguínea ou se encontravam em processo de degeneração.

### **4.3 Análise Estatística**

Os dados referentes aos parâmetros comportamentais, glicose plasmática, frequência de micronúcleos, porcentagem de danos e unidades arbitrárias obtidos no teste cometa foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando constatada diferença significativa, foi realizada análise de regressão. As taxas de sobrevivência foram comparadas pelo teste qui-quadrado. Para as análises estatísticas, foi utilizado o *software* R 3.2.2.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ensaio I “Exposição de adultos de *Danio rerio* ao fungicida

Neste ensaio, avaliou-se a resposta ao estresse através do teste de mergulho em tanque novo e glicose plasmática e os possíveis danos gerados ao DNA de células dos indivíduos adultos de zebrafish, quando expostos a diferentes concentrações e tempos de exposição.

#### 5.1.1 Teste de mergulho em tanque novo

Ao analisar o estresse dos animais através do teste de mergulho em tanque novo, não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) para a distância percorrida (cm), velocidade máxima (cm/s) e tempo gasto na porção inferior (s) (FIGURA 9) Houve diferença estatística apenas para o parâmetro de tempo de permanência na área superior do tanque (s) ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 10).

Figura 9 - Efeito das diferentes doses de tebuconazol sobre os parâmetros distância percorrida, velocidade máxima e tempo gasto na porção inferior.

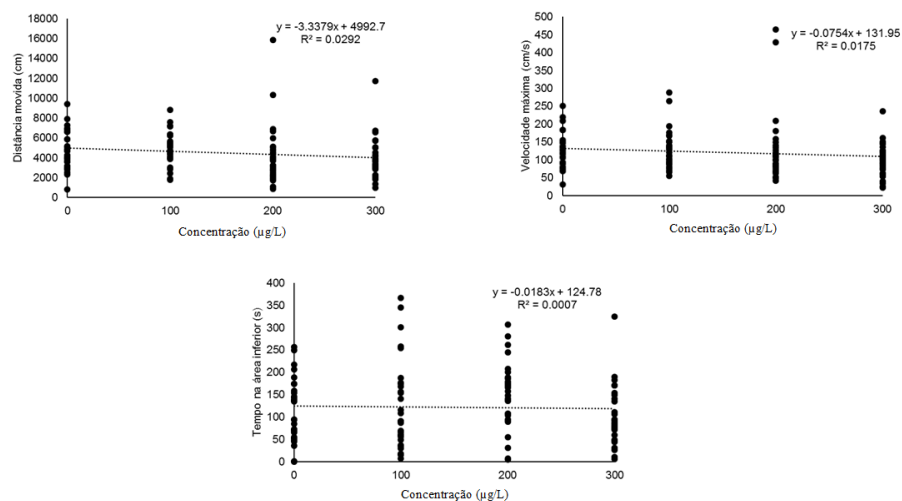
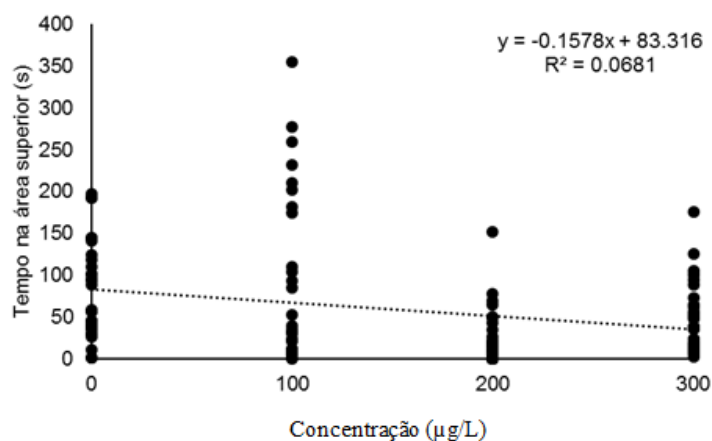




Figura 10 - Diferença no efeito das diferentes doses de tebuconazol sobre o percentual de tempo de permanência do zebrafish na superfície do aquário.



Os animais expostos ao tebuconazol permaneciam menos tempo na superfície do tanque quando comparados aos animais controle, apresentando-se por sua vez mais ansiosos (FIGURA 10). O aumento da ansiedade foi caracterizado pelo aumento da dose, ou seja, quanto maior a concentração de tebuconazol, mais ansioso e estressado o animal se encontrava. Como característica da espécie, dada uma situação de estresse, existe uma tendência do zebrafish em se afastar da superfície, buscando um local seguro no ambiente novo (CACHAT et al., 2010; EGAN et al., 2009). A maioria dos animais exposta ao fungicida, aproximadamente 60%, permaneceu no fundo do aquário durante as análises, o que evidencia uma ação do tebuconazol sobre o comportamento do zebrafish.

O tebuconazol afetou apenas a exploração no topo, sem afetar os demais parâmetros de velocidade e distância percorrida, o que indica ser o fungicida uma substância ansiogênica. Segundo Egan et al. (2009), após submeterem zebrafish a tratamento agudo com cafeína ou ferormônio de alarme, encontraram

que essas substâncias são ansiogênicas. Drogas ansiogênicas são todas as substâncias capazes de reduzir o tempo de exploração do animal no topo, sem afetar a velocidade e a distância percorrida.

A diminuição do tempo de permanência dos animais na porção superior caracteriza elevado nível de ansiedade e estresse. Além do tebuconazol, outros defensivos agrícolas apresentaram a mesma ação. Crosby et al. (2015) ao estudarem a deficiência neurocomportamental em zebrafish expostos a imidacloprida, um inseticida neonicotinoide, encontraram que as doses do inseticida também influenciaram no tempo de permanência dos animais no topo.

Além da ansiedade e estresse gerado devido à toxicidade do tebuconazol, é possível observar uma variedade comportamental entre alguns animais (FIGURA 9). Aproximadamente 60% dos animais expostos ao tanque novo apresentaram uma reduzida exploração da superfície, mas em alguns exemplares ocorreu o contrário, permanecendo esses mais próximos da superfície. Uma possível explicação deve-se ao fato do teste ter sido realizado com os indivíduos separadamente, o que pode ter comprometido o desempenho dos animais. O zebrafish é uma espécie extremamente interativa e interdependente, e quando ao se executar experimentos, esses animais tenham que ser separados do restante do grupo, o fato de estarem sozinhos torna-se uma experiência estressante e além do mais, existem diferenças comportamentais distintas entre os indivíduos, sendo o comportamento de um único peixe bastante imprevisível e variável (PAGNUSSAT et al., 2013).

No presente trabalho, apesar de ter sido realizado com indivíduos separadamente e ocorrer uma variedade comportamental de alguns animais, a maioria se comportou de maneira semelhante quando expostos a tebuconazol, levando-os a apresentarem reduzida exploração da superfície do tanque. Sendo assim, o tebuconazol comporta-se como um composto ansiogênico, atuando no neurocomportamento do zebrafish.

### 5.1.2 Análise de glicose plasmática

Para a análise da glicose plasmática (mg/dL) não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as concentrações de tebuconazol testadas (0; 100; 200 e 300  $\mu\text{g/L}$ ) e os tempos de exposição (24; 72 e 96h). A Tabela 2 demonstra os valores médios encontrados para a glicose plasmática nos diferentes tratamentos.

Tabela 2 - Concentrações plasmáticas médias de glicose (mg/dL) em zebrafish expostos a diferentes concentrações de tebuconazol e diferentes tempos de exposição.

Tratamento (NS)		Tempo de exposição (h)	Concentrações Plasmáticas de Glicose (mg/dL)(NS)
Controle negativo(-)		24	168,40± 30,91
		72	167,44±52,53
		96	141,00±31,47
Tratamento Tebuconazol ( $\mu\text{g/L}$ )	100	24	162,60±66,73
	200		177,00±61,40
	300		167,11±33,91
	100	72	152,63±40,70
	200		143,00±29,84
	300		163,20±47,10
	100	96	130,70±30,19
	200		119,94±29,38
	300		162,05±32,90

NS: Teste Tukey não significativo a nível de 5% de probabilidade ( $p>0,05$ ).

Pode-se observar elevados valores de glicose tanto nos tratamentos quanto no controle negativo, estando todos acima do parâmetro de glicose basal

de zebrafish, que possui uma taxa de variação fisiológica com valores próximos a 80 mg/dL (EAMES et al., 2010). Também é possível observar que no controle negativo tem-se valores que variam de 141 a 168 mg/dL, ao passo que para os demais tratamentos essa variação encontra-se de 120 a 177 mg/dL, indicando uma grande variação entre os diferentes tratamentos. Isso pode ser devido à grande variação individual nos valores entre os animais. Lunkes (2015) ao analisarem a glicose de zebrafish expostos a diferentes doses de melatonina, também encontraram valores superiores ao nível basal da espécie e uma variação de 120 até 202 mg/dL, indicando que talvez para o zebrafish, a glicose não seja o melhor indicador.

A elevação na glicose também pode ter ocorrido devido aos animais terem sido submetidos à eutanásia com óleo de cravo. Em alguns estudos envolvendo outras espécies de peixes como tilápias (*Oreochromis niloticus*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*), foram observados níveis de glicose superiores ao nível basal de cada espécie, quando anestesiados com óleo de cravo (DERIGGI; INOUE; MORAES, 2006; SIMÕES et al., 2012; VESÍSEK et al., 2005a; VESÍSEK; SVOBODOVÁ; PIACKOVÁ, 2005). Sabe-se que, quando se aplica o anestésico óleo de cravo, ocorre uma diminuição do oxigênio e o animal apresenta uma reação muscular para o arranque na tentativa de fuga, o que desencadeia a produção da glicose anaerobicamente, resultando em maiores concentrações de glicose plasmática (SIMÕES et al., 2012). Dessa forma, quando os animais do presente estudo foram expostos ao óleo de cravo, ocorreu um aumento na atividade natatória dos mesmos na tentativa de fuga, o que levou a um aumento nos níveis de glicose.

Outra possível explicação baseia-se no intervalo de tempo entre a eutanásia e a medição da glicose. Elevados valores para glicose são encontrados quando sua medição ocorre logo após a indução anestésica, ocorrendo uma

redução significativa ao longo do tempo. Alguns autores como Sanchez et al. (2014) ao avaliarem a glicose de pacu (*Piaractus mesopotamicus*),

Inoue et al. (2011) trabalhando com tambaqui e Simões e Gomes (2009) trabalhando com tilápia, encontraram elevados valores para a glicose logo após a indução anestésica, ocorrendo uma redução nas concentrações plasmáticas 12h após indução. Essa variação na taxa glicêmica nos estudos citados é semelhante à observada neste estudo, podendo afirmar que as concentrações plasmáticas de glicose apresentadas pelos peixes sempre serão superiores no primeiro momento, ou seja, 0h após a indução anestésica, voltando à normalidade posteriormente. Observa-se que o uso dos valores de glicose associados ao tempo de indução e recuperação é suficiente para verificar que o uso de anestésicos em peixes inviabiliza as dosagens de glicose sanguínea.

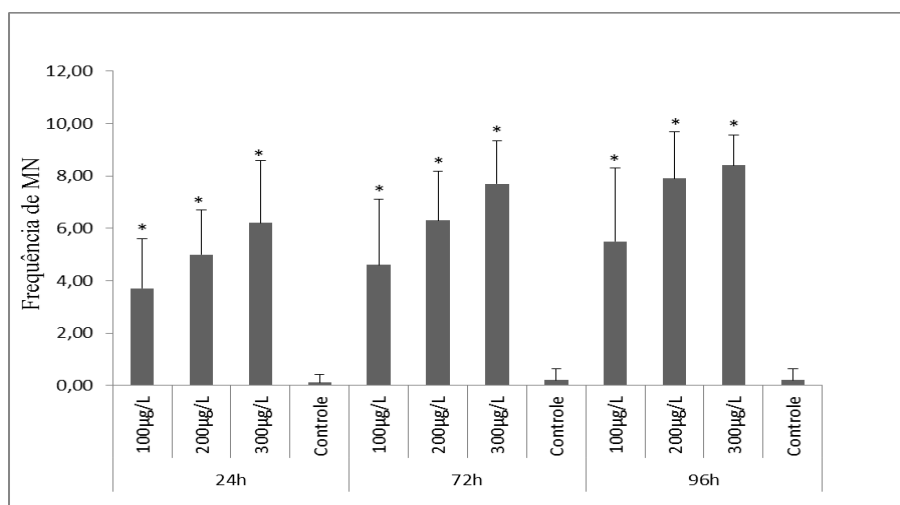
No presente estudo, tanto a glicose dos animais do controle quanto dos tratamentos apresentaram-se em alta concentração pelo fato de todos os animais terem sido submetidos ao mesmo procedimento de eutanásia com o óleo de cravo, e os níveis de glicose terem sido analisados imediatamente após a eutanásia (tempo 0h).

### **5.1.3 Teste do micronúcleo**

Para o teste do micronúcleo (MN), as frequências nos controles apresentaram-se menores que 0,2, ao passo que para os animais expostos ao tebuconazol, ocorreu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da frequência de MN em função do tempo de exposição e das diferentes concentrações de tebuconazol (FIGURA 11). A menor frequência de micronúcleo obtida nos animais expostos a tebuconazol foi de 3,7 na concentração de 100  $\mu\text{g/L}$  em 24h, tendo seus valores aumentados para 4,6 e 5,5 à medida que se aumentou as concentrações tebuconazol para 200 e 300  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente.

Além do aumento de MN em função do aumento das concentrações, ocorreu também uma influência do tempo de exposição. Por exemplo, a concentração de 300  $\mu\text{g/L}$  em 24h levou a uma frequência de 5,5 de MN, ao passo que em 72h houve um acréscimo de 2,4 na frequência, alcançando em 96h uma frequência de 8,4, sendo essa a maior frequência encontrada no estudo.

Figura 11 - Frequência de micronúcleos em eritrócitos de zebrafish expostos a diferentes concentrações de tebuconazol.



As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. \* indica diferença significativa em relação ao controle.

Os resultados evidenciaram a presença de danos nos eritrócitos de zebrafish, possibilitando comprovar a toxicidade do tebuconazol e a utilização deste peixe como modelo para o teste. Trabalhos realizados com diferentes agentes tóxicos também demonstraram resultados similares ao utilizarem *Danio rerio*. Fabender e Braunbeck (2013) ao submeterem exemplares de zebrafish a diferentes concentrações de metil metano sulfonato (2 a 8 mg/L) e Scott et al. (2013) ao realizarem análises genotóxicas de amostras do Rio Ramis (Peru),

obtiveram um aumento na frequência de micronúcleos em relação ao aumento da concentração do composto.

Neste estudo, a frequência das anormalidades eritrocíticas foi superior àquela encontrada em seus respectivos controles negativos, em todos os tempos experimentais, o que evidencia o efeito de tebuconazol na indução de danos nos eritrócitos de zebrafish. Nossos estudos estão de acordo com outros achados na literatura que utilizaram o teste do micronúcleo para averiguação da toxicidade de agrotóxicos. Exemplos incluem análise de micronúcleo em goldfish (*Carassius auratus*) expostos a concentrações de 5,10 e 15 ppm do herbicida Roundup®, em que a exposição levou a um aumento na frequência de MN de forma significativa após os tratamentos (ÇAVAS; KÖNEN, 2007). Dar et al. (2014) ao estudarem os efeitos genotóxicos do endossulfan em carpa (*Carassius carassius*) e Chapadense et al. (2009) e Nwani et al. (2011) ao avaliarem a toxicidade do herbicida atrazina sobre peixe cabeça de cobra (*Channa punctatus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) respectivamente, obtiveram uma frequência aumentada de micronúcleos dependente das concentrações e do tempo de exposição em relação ao controle, como também foi observado no presente trabalho.

Desta forma, os resultados observados corroboram com estudos de autores que propõem que o teste de micronúcleo em peixes constitui um instrumento sensível para medir a ação de produtos químicos mutagênicos, especialmente os que causam repostas clastogênicas em organismos expostos.

#### **5.1.4 Ensaio cometa**

A Tabela 3 apresenta as médias dos números de nucleoides classificados em cada score do teste cometa, para os tratamentos e os controles no decorrer dos três tempos experimentais avaliados. Neste ensaio, é necessária a análise dos valores médios das pontuações para cada grupo, para que possa ser possível

distinguir as células com diferentes classes de danos no DNA. No presente trabalho, observou-se uma predominância das classes 0 e 1 em todos os grupos de controle negativo. É importante salientar que as classes 0, 1 e 2 apresentam maior probabilidade de reparo, enquanto as classes 3 e 4 correspondem aos danos superiores a 40% sendo em sua maioria irreversíveis.

Ao analisar os danos causados nas brânquias de zebrafish expostos ao tebuconazol, ocorreu uma redução das classes 0 e 1 nos tratamentos quando comparados ao controle. A maior frequência da classe 0 nos tratamentos foi de 7,3% para a concentração de 100 µg/L (96h), enquanto para o controle, a maior frequência foi de 34,8% (24h). Na classe 1, o controle apresentou valores acima de 40% e os tratamentos, valores menores que 31%. As classes 3 e 4, nos controles eram quase inexistentes, apresentando valores elevados nos tratamentos.

Tabela 3 - Porcentagens referentes às médias dos números de nucleoides classificados em cada score do teste cometa em zebrafish, avaliadas nos diferentes tempos experimentais e tratamentos com tebuconazol.

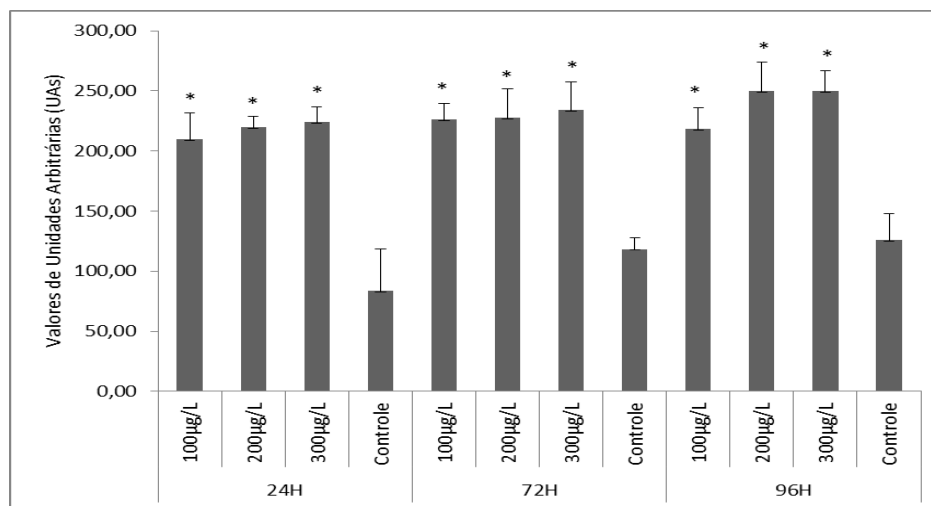
Tratamento/Tempo de exposição (h)		Classes de Cometa				
		0 (<5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3(40-85%)	4(>85%)
<b>Controle</b>	<b>24</b>	34,8±24,8	46,6±16,5	18,6±11,0	0	0
	<b>72</b>	17,2±9,6	49,8±10,0	31±4,5	1,4±1,5	0,6±0,9
	<b>96</b>	17,8±6,5	41,4±10,1	38,2±14,8	2±1,6	0,6±0,9
<b>Tebuconazol</b>	<b>100</b>	2,6±3,2	31,9±3,2	33,4±4,0	17,3±2,9	14,9±6,7
	<b>200</b>	3,4±3,2	31,2±3,2	27±3,6	18,5±3,9	19,9±2,2
	<b>300</b>	4,7±1,8	28,9±3,7	27,6±4,7	16,8±2,7	22±4,9
<b>Tebuconazol</b>	<b>100</b>	5±1,8	24,2±4,3	31,6±5,5	18,6±3,2	20,6±3,6
	<b>200</b>	6±2,2	20±6,8	34,7±7,0	19,9±7,1	19,4±7,1
	<b>300</b>	1,6±2,5	22,8±9,1	31,7±10,1	23±8,9	21±7,1
<b>Tebuconazol</b>	<b>100</b>	7,3±5,4	26,1±6,1	28,8±5,4	15,9±4,3	21,9±4,8
	<b>200</b>	2,3±2,1	18,9±10,6	32,1±7,0	21,4±7,3	24,5±6,4
	<b>300</b>	2,2±3,3	10,2±5,8	44,8±15,1	18,3±6,1	25,3±7,6



A Figura 12 apresenta uma análise detalhada das unidades arbitrárias calculadas para os danos nos animais tratados com tebuconazol em relação aos controles negativos.

As unidades arbitrárias (UA) são analisadas de acordo com Collins et al. (2004), em que os scores obtidos no teste cometa são multiplicados pela frequência de células que apresentam cada score para um dado tratamento. Os valores de UA variam de 0 a 400, sendo 0 indicação de ausência total de danos e 400 o dano máximo. Sendo assim, quando o valor de UA, obtido para os nucleoides das células avaliadas, se apresentar mais distante de 0 e mais próximo ao valor de 400, maior será a toxicidade da substância testada. Na Figura 11, os valores de UA encontrados para os tratamentos com tebuconazol foram superiores aos do controle negativo. O menor valor de UA de 83,8 foi encontrado para o controle negativo, sendo que os seus valores permaneceram abaixo de 127. Todos os tratamentos com tebuconazol apresentaram valores de UA entre 200 a 250, sendo estes superiores aos encontrados para o controle.

Figura 12 - Unidades Arbitrárias (UA) calculadas para nucleoides de células das brânquias de peixes *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de tebuconazol, durante 24, 72 e 96h.



As barras representam os valores de UA e as linhas verticais o erro padrão. \* Indica diferença significativa em relação ao controle.

Os elevados valores de UA e a alta frequência de nucleoides nas classes de danos 3 e 4 obtidas das brânquias de animais expostos ao tebuconazol, indicam que o fungicida foi capaz de gerar uma maior fragmentação de moléculas de DNA, indicando uma ação genotóxica. Além disso, esses resultados corroboram com diversos trabalhos que comprovam que o ensaio cometa é capaz de detectar danos no DNA de peixes, causados por diferentes classes de mutagênicos, incluindo agrotóxicos. Em alguns estudos com peixes, como em jundiá (*Rhamdia quelen*), carpa comum (*Cyprinus carpio*), lambari (*Astyanax bimaculatus*) e peixe cabeça de cobra (*Channa punctatus*) foram observadas lesões no DNA quando expostos aos fungicidas Roundup® e Folicur (FERRARO, 2009), fato também observado em *Channa punctatus* e curimba (*Prochilodus lineatus*) expostos aos herbicidas atrazina e Roundup®, respectivamente (CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008; NWANI et al.,

2011). Estes estudos demonstram grande eficiência do ensaio no monitoramento da genotoxicidade induzida pela presença de agrotóxicos nas águas.

O ensaio cometa dentre diversas vantagens, apresenta a característica de poder ser realizado em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada (LEE; STEINERT, 2003), facilitando a sua aplicação para diversas espécies de peixes e órgãos. Em animais muito pequenos como o zebrafish, a coleta de sangue para análises genotóxicas muitas vezes tornam-se dispendiosas ou obtêm-se pequenas quantidades de sangue, podendo ser utilizadas para o ensaio cometa as brânquias.

As brânquias além de apresentarem um tecido importante para a absorção de contaminantes, por estarem diretamente expostos ao ambiente contaminado, podem ser facilmente coletadas (CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008). Outra vantagem de sua utilização é que dependendo do tamanho do animal, apenas um pequeno fragmento da brânquia seria necessário para o ensaio, não necessitando realizar a eutanásia dos animais. Os resultados apresentados neste estudo, evidenciando a indução de danos citogenéticos em células das brânquias de *D. rerio* estão de acordo com os achados de outros pesquisadores para diferentes defensivos agrícolas. Células das brânquias de *Prochilodus lineatus* e de *Channa punctatus* quando expostas aos pesticidas cipermetrina (CYP) e endosulfan, respectivamente, apresentaram alta sensibilidade, obtendo-se elevados valores UA em comparação com o controle (PANDEY et al., 2006; POLETTA et al., 2013).

Dentro desse contexto, foi possível observar que o tebuconazol possui grande capacidade de induzir fragmentação do material genético das brânquias de *Danio rerio* tendo apresentado valores de UA superiores ao controle negativo, se comportando de maneira semelhante a outros pesticidas amplamente utilizados na agricultura e que são conhecidos por suas elevadas ações genotóxicas.

Baseado nos resultados do ensaio cometa e no teste do micronúcleo foi verificado o potencial de mutagenicidade e genotoxicidade do tebuconazol sobre as células sanguíneas e branquiais de zebrafish.

## 5.2 Ensaio II: Exposição dos embriões de *Danio rerio* ao tebuconazol

Os embriões expostos às diferentes concentrações de tebuconazol foram examinados uma vez ao dia por microscopia de luz ao longo do período experimental, sendo analisadas as alterações morfológicas e o número de embriões mortos.

Para análises da sobrevivência, foram considerados mortos todos os embriões que não apresentavam movimento, juntamente com a perda de batimento cardíaco detectável. Os dados de mortalidade estão apresentados como porcentagem de sobrevivência em cada tratamento ao longo do tempo (Tabela 4).

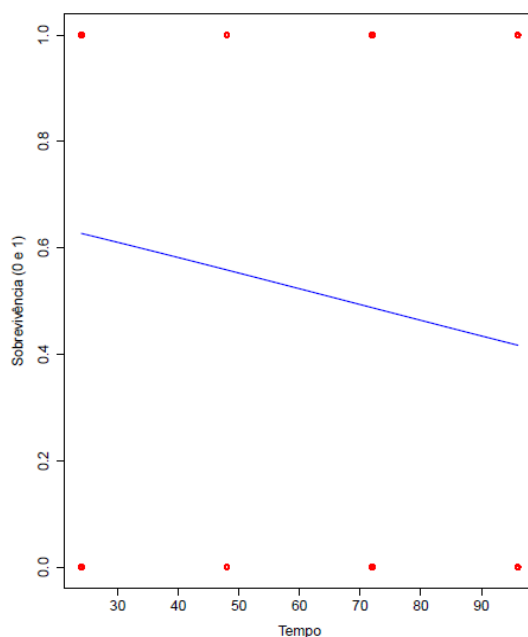
Tabela 4 - Percentual de sobrevivência de embriões de zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao tebuconazol em diferentes tempos de exposição.

Dose de TZ( $\mu\text{g/L}$ )	Tempo de exposição (h)			
	24	48	72	96
0,0	86,81 <sup>A</sup>	84,03 <sup>A</sup>	82,64 <sup>A</sup>	82,64 <sup>A</sup>
12,5	75,00 <sup>A</sup>	72,22 <sup>AB</sup>	72,22 <sup>A</sup>	71,53 <sup>AB</sup>
25	74,31 <sup>AB</sup>	72,22 <sup>AB</sup>	70,83 <sup>A</sup>	68,06 <sup>AB</sup>
50	68,06 <sup>AB</sup>	63,19 <sup>AB</sup>	61,81 <sup>AB</sup>	58,33 <sup>BC</sup>
100*	62,50 <sup>B</sup>	54,86 <sup>B</sup>	47,22 <sup>B</sup>	42,36 <sup>C</sup>
200	0,00 <sup>C</sup>	0,00 <sup>C</sup>	0,00 <sup>C</sup>	0,00 <sup>D</sup>

Percentuais de sobrevivência acompanhados pela mesma letra não diferem entre si nas colunas ( $p > 0,05$ ) por teste de Qui-quadrado.\* regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ).

Não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) ao analisar o efeito das doses 12,5; 25 e 50  $\mu\text{g/L}$  ao longo do tempo sob a taxa de sobrevivência. Apenas a dose de 100  $\mu\text{g/L}$  foi capaz de reduzir a taxa de sobrevivência ao longo do desenvolvimento dos embriões ( $p<0,05$ ) (FIGURA 13). Em 24hpf, a taxa de sobrevivência para embriões expostos a 100  $\mu\text{g/L}$  de tebuconazol era de 62,50%, apresentando uma queda decorrente do tempo de exposição, alcançando em 96hpf uma sobrevivência de 42,36%.

Figura 13 - Sobrevivência dos embriões de *Danio rerio* em relação ao tempo de exposição à dose de 100  $\mu\text{g/L}$  de tebuconazol .



Ao analisar as diferentes doses dentro de um mesmo tempo (mesmo período de desenvolvimento embrionário), houve diferença significativa ( $p<0,001$ ), como mostrado na Tabela 2. Em 24hpf, comparando o controle em que a taxa de sobrevivência foi de 86,81%, com os demais tratamentos, na

medida em que se aumentou a concentração de tebuconazol, houve um decréscimo da sobrevivência. A maior sobrevivência nos tratamentos foi de 75% para a menor concentração de tebuconazol (12,5 µg/L), e na medida em que se aumenta a concentração essa porcentagem diminui, alcançando em 100 µg/L de tebuconazol uma taxa de 62,50%. Esses decréscimos na sobrevivência foram observados dentro de todos os tempos avaliados. A concentração de 200 µg/L foi considerada altamente tóxica para os embriões, pois em menos de 24hpf, todos os embriões haviam morrido.

Observou-se elevada mortalidade de embriões na maior concentração em menos de 24hpf. Sobrevivência dependente da dose também foi encontrada por Fischer et al. (2015) ao submeterem embriões de zebrafish a várias concentrações de brometo de piridostigmina (PB) e monitorá-los durante cinco dias. A concentração de 500 mM levou a mortalidade de todos os embriões em menos de 24hpf, a de 100 mM também desencadeou uma redução da sobrevivência em todos os tempos avaliados e as demais concentrações ocasionaram uma mortalidade inferior a 10% durante todo o desenvolvimento.

Os resultados encontrados indicam que a exposição dos embriões ao tebuconazol resultou em uma mortalidade significativa de modo dependente apenas da concentração, sendo significativamente dependente da dose/tempo apenas para o tratamento de 100 µg/L de tebuconazol. Fenômenos semelhantes foram observados em estudos com embriões de zebrafish, em que também foi encontrada uma mortalidade significativamente dependente da dose com exposição dos animais a diferentes concentrações do inseticida piretroide lambda-cialotrina (LCT) e do herbicida butaflor (TU et al., 2013; XU et al., 2008). Em ambos os trabalhos, bem como no presente trabalho, a manutenção da sobrevivência do embrião ao longo do tempo dentro da mesma concentração, pode estar relacionada ao fato dos embriões estarem envoltos pelo córion. Este pode ter protegido os animais, agindo como uma barreira, permitindo, portanto,

a passagem de pequenas quantidades dos pesticidas, sendo a toxicidade da substância dependente da concentração (TU et al., 2013). Isso também explica o fato da concentração de 100 µg/L de tebuconazol ter sido a única capaz de alterar significativamente a taxa de sobrevivência em todos os tempos avaliados, pelo fato de que mesmo passando pelo córion em pequenas quantidades, a sua concentração foi capaz de causar letalidade aos embriões.

No presente estudo, o tebuconazol não causou nenhuma malformação evidente durante os estágios embrionários. Talvez por ser uma exposição aguda, o tempo de 96h pode não ter sido suficiente para a manifestação de alterações morfológicas e para expressiva mortalidade nas concentrações testadas, uma vez que durante a maior parte do desenvolvimento, o embrião esteve protegido pelo córion. Resultado semelhante foi observado por Domingues et al. (2010) ao estudarem a exposição de dicromato de potássio em embriões de zebrafish, não sendo observada significância em relação à mortalidade e efeitos sobre o desenvolvimento embrionário, ao passo que quando ocorreu a eclosão houve um aumento na mortalidade, malformação e distúrbios de equilíbrio, tendo sido acompanhados os embriões até 144hpf. Por isso, torna-se indispensável em estudos que visam análise toxicológica de determinada substância, a avaliação dos embriões por períodos maiores. Porém evidenciou-se com o presente trabalho a mortalidade em elevadas concentrações de tebuconazol, independente da presença do córion protegendo o embrião.

Pesquisas complementares são necessárias, com vistas a conhecer os mecanismos biológicos afetados pelo tebuconazol, possibilitando determinar impactos ambientais e socioeconômicos decorrentes do uso indiscriminado do produto, permitindo assim elaborar e aplicar medidas para prevenir e ou remediar os danos previstos.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o tebuconazol possui efeitos tanto nos adultos quanto em embriões de *Danio rerio*, gerando fragmentação no material genético e alterações no comportamento dos adultos, além de induzir letalidade nos embriões.

Desta forma, o presente trabalho corrobora e complementa dados toxicológicos descritos em literatura para este composto, destacando a importância de ampliar e intensificar medidas de controle da distribuição e uso destes produtos, visando reduzir os riscos de danos ao meio ambiente e a saúde humana.





## REFERÊNCIAS

- ABEL, P. D. **Water pollution**. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1989. 296 p.
- ABHILASH, P. C.; SINGH, N. Pesticide use and application: an Indian scenario. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 165, n. 1/3, p. 1-12, June 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução 160 de 19 de janeiro de 2010. Agrotóxicos e toxicologia, monografia dos agrotóxicos. Tebuconazol. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 jan. 2010. Acesso em: 1 jun. 2015.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, Amsterdam, v. 343, n. 2, p. 121-135, June 1995.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 34, n. 15, p. 1465-1469, Dec. 2003.
- BELPAEME, K. et al. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 485-492, Sept. 1998.
- BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 94, n. 1, p. 75-80, Nov. 2009.
- BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in allium cepa. **Water, Air, & Soil Pollution**, New York, v. 226, n. 7, p. 1-11, July 2015.
- BOMBAIL, V. et al. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 383-392, July 2001.
- BOTERO, M. et al. Descripción del desarrollo embrionario de cigotas híbridas obtenidos por el cruce de machos de Cachama Blanca (*Piriacetus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macropomum*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 17, n. 4, p. 38-45, 2004.

BRANDHOF, E. J.; MONTFORTS, M. Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 8, p. 1862-1866, Nov. 2010.

BROMILLOW, R. H.; EVANS, A. A.; NICHOLLS, P. H. Factors affecting dissipation rates of five triazole fungicides in soil types: 2. Field studies. **Pest Management Science**, Sussex, v. 55, n. 12, p. 1129–1142, Dec. 1999.

CACHAT, J. et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult Zebrafish. **Nature Protocols**, London, v. 5, n. 11, p. 1786-9917, Nov. 2010.

CAMPAGNA, A. F. et al. The toxic potential of aldrin and heptachlor on *Danio rerio* juveniles (Cypriniformes, Cyprinidae). **Ecotoxicology**, London, v. 16, n. 3, p. 289-298, Apr. 2007.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S. Assessment of the piscine micronuclei test in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Elmsford, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, Apr. 1990.

CATTANEO, R. et al. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 92, n. 3, p. 133-137, Nov. 2008.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 655, n. 1/2, p. 41–46, Aug. 2008.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 264-271, Sept. 2005.

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

CEPPI, M. et al. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 705, n. 1, p. 11–19, July/Sept. 2010.

CHAMPAGNE, D. L. et al. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 214, n. 2, p. 332-342, Dec. 2010.

CHAPADENSE, P. F. G. et al. Toxicity of atrazine herbicide in *Colossoma macropomum*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 2, p. 398-405, abr./jun. 2009.

COLLINS, A. et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 30, n. 2, p. 139-146, 1997.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 26, n. 3, p. 249-261, Mar. 2004.

COMBES, R. D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry and Industry**, London, v. 24, p. 950-954, Dec. 1992.

COSTA-SILVA, D. G. et al. Oxidative stress markers in fish (*Astyanax sp.* and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 22, n. 20, p. 1526-15535, Oct. 2015.

CRESTANI, M. et al. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 65, n. 1, p. 48-55, Sept. 2006.

CROSBY, E. B. et al. Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, Elmsford, v. 49, p. 81-90, May/June 2015.

DAR, S. A. et al. Investigation of the genotoxicity of endosulfan to freshwater Cyprinid fish Crucian carp (*Carassius carassius* L.) using the micronucleus and chromosomal aberration as biomarkers. **The Nucleus**, Berlin, v. 57, n. 2, p. 87-98, Aug. 2014.

DERIGGI, G. F.; INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 269-274, 2006.

DEVAUX, A.; PESONEN, M.; MONOD, G. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 11, n. 1/2, p. 71-79, Feb./Apr. 1997.

DI PRINZIO, C. M. et al. Growth hormone receptors in zebrafish (*Danio rerio*): adult and embryonic expression patterns. **Gene Expression Patterns**, Amsterdam, v. 10, n. 4/5, p. 214-225, June 2010.

DOMINGUES, I. et al. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: toxicology & pharmacology**, New York, v. 152, n. 3, p. 338-345, Sept. 2010.

EAMES, S. C. et al. Blood sugar measurement in Zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. **Zebrafish**, Larchmont, v. 7, n. 2, p. 205-213, June 2010.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 205, n. 1, p. 38-44, Dec. 2009.

ELSAESSER, D.; SCHULZ, R. Mitigation of fungicide pollution in vegetated agricultural surface waters: GIS modelling and monitoring in the field. In: CONFERENCE FROM THE SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY EUROPE, 18., 2008, Warsaw. **Proceeding...** Warsaw: Setac, 2008. p. 406-407.

EMBRY, M. R. et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 79-87, Apr. 2010.

ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, Larchmont, v. 4, n. 1, p. 21-40, 2007.

FABBENDER, C.; BRAUNBECK, T. Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of zebrafish (*Danio rerio*) by use of the comet assay and micronucleus test after in vivo exposure to methyl methanesulfonate. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 91, n. 1, p. 89-95, July 2013.

FENECH, M. et al. The human micronucleous project-an international collaborative study on the use of micronucleous technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 428, n. 1/2, p. 271-283, July 2000.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, n. 1/2, p. 81-95, Nov. 2000.

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

FERREIRA, D. **Parametros de estresse oxidativo e estudo de lesões histopatológicas em jundia expostos a agroquímicos**. 2010. 58 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

FISCHER, A. et al. Carbamate nerve agent prophylactics exhibit distinct toxicological effects in the zebrafish embryo model. **Neurotoxicology and Teratology**, Elmsford, v. 50, p. 1-10, July/Aug. 2015.

FONSECA, M. B. et al. 2,4-D herbicides effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of paiva freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 69, n. 3, p. 416-420, 2008.

FUSTINONI, S. et al. Biomonitoring human exposure to tebuconazole. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 211, p. 51, June 2012.

GLUSCZAK, L. et al. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 65, n. 2, p. 237-241, Oct. 2006.

HALLARE, A. V. et al. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 63, n. 3, p. 378-388, Mar. 2006.

HALLARE, A.V.; KOHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Developmental toxicity an stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. **Chemosphere**, Oxford, v. 56, n. 7, p. 659-666, Aug. 2004.

HOSE, J. E. et al. Elevated circulating erythrocytes micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 22, n. 3, p. 167-176, 1987.

HUSSAR, G. J. et al. Ensaio para a determinação de dosagem tóxica do fungicida tebuconazole (folicur 200 ce) sobre alevinos e juvenis de tilápia (*Tilapia rendalli*) e de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Engenharia Ambiental: pesquisa e tecnologia**, Espírito Santo do Pinhal, v. 1, n. 1, p. 35-44, 2004.

INOUE, L. A. K. A. et al. Avaliação de respostas metabólicas do tabaqui expostos ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 41, n. 2, p. 327-332, 2011.

IWANA, G. K.; AFONSO, L. O. B.; VIJAYAN, M. M. Stress in fish. EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B. (Org.). **The physiology of fish**. 3. ed. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 319-342.

JACOBOWSHI, A. C. **Avaliação do potencial efeito genotóxico de quelato de cobre nano e microcapsulado**. 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul, 2009.

KALUEFF, A. V. et al. Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 170, p. 297-30, Jan. 2016.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug disco: very. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, Saint Louis, v. 82, n. 1, p. 70-80, July 2007.

KHOR, Y. M.; SOGA, T.; PARHAR, I. S. Caffeine neuroprotects against dexamethasone-induced anxiety-like behaviour in the Zebrafish (*Danio rerio*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 181, p. 310-315, Jan. 2013.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, New York, v. 203, n. 3, p. 253-310, July 1995.

KONWICK, B. J. et al. Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 80, n. 4, p. 372–381, Dec. 2006.

KRÜGER, R. A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa***. 2009. 43 p. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, 2009.

LAMMER, E. et al. Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1436-1442, Oct. 2009.

LAMMER, E. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: toxicology & pharmacology**, New York, v. 149, n. 2, p. 196-209, Mar. 2009.

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

LEVIN, E. D. et al. Persisting behavioral impairment in the novel tank diving task after embryonic exposure to diazinon in zebrafish. **Paper presented at: neurobehavioral teratology society**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 25–29, July 2010.

LEVIN, E. D.; BENCAN, Z.; CERUTTI, D. T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 90, n. 1, p. 54–58, Jan. 2007.

LIESCHKE, J. G.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews-Genetics**, London, v. 8, n. 5, p. 353-367, May 2007.

LÓPEZ-BAREA, J. Biomarkers to detect environmental pollution. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 88, p. 79, 1996.

LÓPEZ-PATIÑO, M. A. et al. Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 93, n. 1/2, p. 160-171, Jan. 2008.



LOUREIRO, E. D. S. et al. Efeitos de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 263-269, abr./jun. 2002.

LUCKENBACH, T. et al. Fish early stage tests as a tool to assess embryotoxic potentials in small streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 355-370, Sept. 2001.

LUNKES, L. C. **Influência da melatonina sobre os parâmetros de locomoção e estresse em Zebrafish (*Danio rerio*)**. 2015. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

MASON, C. F. **Biology of freshwater pollution**. 3. ed. Essex: Longmann, 1996. 387 p.

MASUDA, S. et al. Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis (2-hydroxyethyl) amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3, 3'-dichloro-5, 4'-dinitro-biphenyl (ADDDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 560, n. 1, p. 33-40, May 2004.

MATSUMOTO, S. T. et al. 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 on root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 2-15, Jan. 2003.

MENEGOLA, E. et al. Postulated pathogenic pathway in triazole fungicida induced morphogenic effects. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 22, n. 2, p. 186-195, Aug. 2008.

MIRANDA, D. C. **Efeito dos fungicidas mancozeb e tebuconazol sobre parâmetros testiculares do morcego frugívoro (*Artibeus lituratus*) (Olfers, 1818)**. 2012. 71 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

MONTUELLE, B. et al. The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). **Hydrobiologia**, The Hague, v. 657, n. 1, p.123-141, Dec. 2010.

MORGAN, J. D.; IWAMA, G. K. Measurements of stressed states in the field. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK C.B. (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. p. 247-270.

MOSER, V. C. et al. The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 62, n. 2, p. 339-352, Aug. 2001.

MOTA, G. G. P.; BARBONI, S. A. V.; JESUS, M. C. Tilápias (Actinopterygii: Cichlidae) comercializadas em Feira de Santana (Bahia) como bioindicadores de poluição ambiental em rios da bacia do Paraguaçu. **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v. 19, p. 11-18, jan./dez. 2009.

MU, X. et al. Occurrence and origin of sensitivity toward difenoconazole in zebrafish (*Danio rerio*) during different life stages. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 160, p. 57-68, Mar. 2015.

NAIK, S. N.; PRASAD, R. Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. **Journal of Chemical Health and Safety**, Amsterdam, v. 13, n. 6, p. 12-19, Nov. 2006.

NEPOMUCENO, J. C. **Detecção de eritrócitos micronucleados em peixes expostos ao mercúrio metálico**. 1993. 119 p. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Genética Aplicada) – Universidade de Brasília, Brasília, 1993.

NEPOMUCENO, J. C. et al. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 30, n. 3, p. 293-297, 1997.

NEPOMUCENO, J. C.; SPANÓ, M. A. Incidência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de tilápias (*Oreochromis mossambicus*) provindas de diferentes estações de piscicultura. **Revista Ciência e Biomedicina**, Uberlândia, v. 8, n. 1, p. 7-15, 1992.

NUFARM INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÊUTICA. Ficha de informações de segurança de produto químico. **Nufarm**, Maracanaú, p. 1-13, maio 2015. Disponível em: <[http://www.nufarm.com/assets/33595/1/RIVAL\\_200\\_EC\\_FISPQ\\_Nufarm\\_Rev06\\_GHS.pdf](http://www.nufarm.com/assets/33595/1/RIVAL_200_EC_FISPQ_Nufarm_Rev06_GHS.pdf)>. Acesso em: 22 set. 2016.

NWANI, C. D. et al. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 314-322, Mar. 2011.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. **Radiation Research**, Charlottesville, v. 122, n. 1, p. 86-94, Apr. 1990.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÓMICO - OCDE. Diretrizes da OCDE para a ensaios de produtos químicos, seção 2. **Effects on Biotic Systems**, Oxford, n. 236, p. 1-22, July 2013. Disponível em: <[Http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9713161e.pdf](http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9713161e.pdf)>. Acesso em: 2 dez. 2015.

PAGNUSSAT, N. et al. One for all and all for one: the importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. **Zebrafish**, Larchmont, v. 10, n. 3, p. 338-342, Sept. 2013.

PANDEY, S. et al. Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 65, n. 1, p. 56-61, Sept. 2006.

PANDRANGI, R. et al. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 26, n. 4, p. 345-356, 1995.

POLETTA, G. L. et al. Comet assay in gill cells of *Prochilodus lineatus* exposed *in vivo* to cypermethrin. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 107, n. 3, p. 385-390, Nov. 2013.

RAUDONIS, L.; SURVILIENE, E.; VALIUSKAITE, A. Toxicity of pesticides to predatory mites and insects in apple-tree site under field conditions. **Environmental Toxicology**, New York, v. 19, n. 4, p. 291-295, Aug. 2004.

SANCHEZ, M. D. et al. Effect of menthol and eugenol on the physiological responses of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 2799-807, 2014. Suplemento.

SANCHO, E. et al. Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 3, p. 370-6, Mar. 2010.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 9-15, Feb. 1975.

SCHUMMER, C. et al. Determination of farm workers' exposure to pesticides by hair analysis. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 210, n. 2, p. 203-210, Apr. 2012.

SCOTTO, C. et al. Análisis genotóxico de muestras de agua del río Ramis (Departamento de Puno, Perú) utilizando eritrocitos de la sangre periférica del pez Cebra (*Danio rerio*). **Revista Científica Cátedra Villarreal**, Lima, v. 1, n. 1, p. 23-36, Enero/Jun. 2013.

SLEDGE, D. et al. Critical duration of exposure for developmental chlorpyrifos-induced neurobehavioral toxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, Elmsford, v. 33, n. 6, p. 742-751, Nov./Dec. 2011.

SHEN, Z. et al. Stereoselective degradation of tebuconazol in rat liver microsomes. **Chirality**, New York, v. 24, n. 1, p. 67-71, Jan. 2012.

SILVA, A. C. e; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Perquirere Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, Patos de Minas, v. 1, n. 7, p. 167-179, ago. 2010.

SIMÕES, L. N. et al. The use of clove oil as an anesthetic for advanced juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 34, n. 2, p. 175-81, abr./jun. 2012.

SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia do nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 613-620, fev. 2009.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 175, n. 1, p. 184-191, Mar. 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**, Amsterdam, v. 605, n. 1/2, p. 87-93, June 2006.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, London, v. 83, n. 1, p. 13-34, Feb. 2008.

TICE, R. The single cell/ comet assay: a microgel eletroforetic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cell. **Environmental mutagenesis. Bios Scientific Publishers**, Oxford, p. 315-339, 1995.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, Dec. 2011.  
TU, W. et al. Embryonic exposure to butachlor in zebrafish (*Danio rerio*): endocrine disruption, developmental toxicity and immunotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 89, p. 189-195, Mar. 2013.

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

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

VEIGA, M. M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Agricultura**, Manguinhos, v. 379, p. 63-66, 2007.

VESÍSEK, J. et al. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinary Medicine**, San Diego, v. 50, n. 6, p. 269-275, 2005.

VESÍSEK, J.; SVOBODOVÁ, Z.; PIACKOVÁ, V. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 74, n. 1, p. 139-146, 2005.

VILCHES, M. **Análise genotóxica do Rio Cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores.** 2009. 54 p. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, 2009.

WANG, X.; ZHANG, R. Control efficiency and increase yield of two difenoconazole and propiconazole 30% EC to rice false smut. **Journal of Agricultural Technology & Science**, Oxford, v. 29, p. 300–304, 2012.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book.** Eugene: University of Oregon Press, 2000. 389 p.

WONG, D. et al. Conditioned place avoidance of zebrafish (*Danio rerio*) to three chemicals used for euthanasia and anaesthesia. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. e88030, Feb. 2014.

XU, C. et al. Separation and aquatic toxicity of enantiomers of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 27, n. 1, p. 174-181, Jan. 2008.

ZAMBOLIM, L.; JESUS JUNIOR, W. C. O essencial dos fungicidas empregados no controle de doenças – parte básica. In: ZAMBOLIM, L. et al. **Produtos fitossanitários: fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas.** Viçosa: Editora da UFV, 2008. 652 p.