



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Disciplina: Agrotóxicos e impactos no Ambiente (CEN 0413)



# Efeitos bioquímicos e genotóxicos do inseticida Imidacloprido para *Astyanax altiparanae* (Teleostei:Characidae)

**Éryka Costa de Almeida**

Mestre em Ciências (Meio Ambiente e Recursos Hídricos – Unifei)

Doutoranda no programa de pós-graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

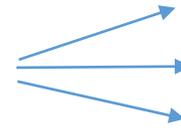
erykaca@usp.br

# Agrotóxicos

Armas químicas nas Guerras Mundiais



Agrotóxicos



Agricultura

Pecuária

Controle de vetores de doenças



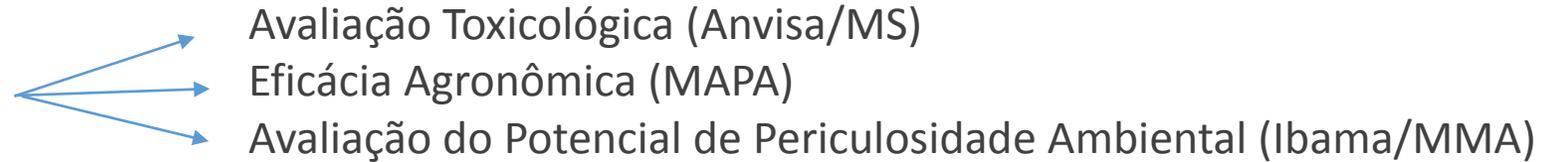
DDT



# Brasil

- Déc. 60-70: Início da utilização de agrotóxicos
- 2009: Banimento definitivo do DDT

**Registro**  
(Lei Federal nº 7.802)



<b>Classe I</b>	<b>Extremamente tóxicos</b>
<b>Classe II</b>	<b>Altamente tóxicos</b>
<b>Classe III</b>	<b>Medianamente tóxicos</b>
<b>Classe IV</b>	<b>Pouco tóxicos</b>

Fonte: Adaptado de Ibama (2013)

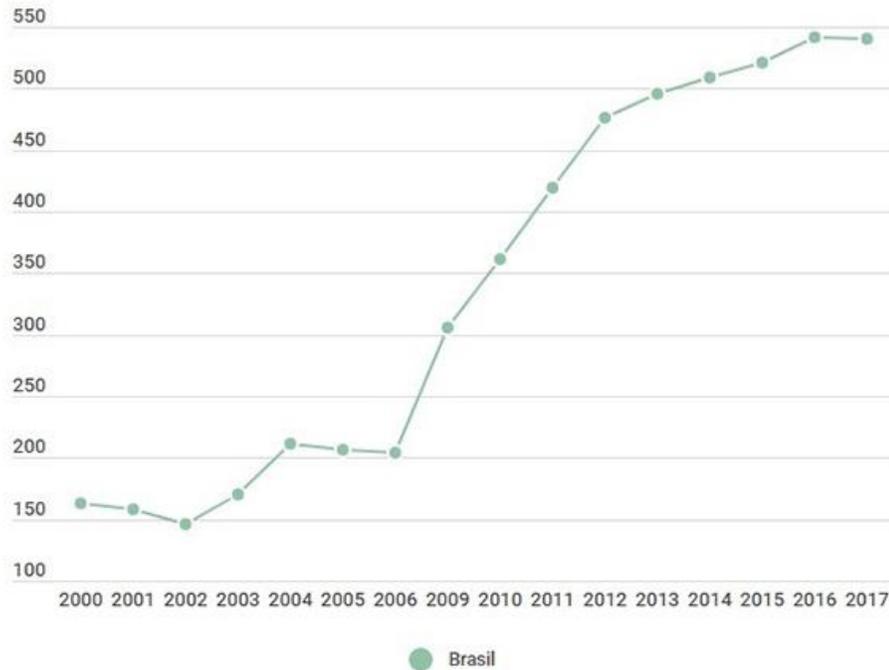


Fonte: Karam, Rios e Fernandes (2014)

# Brasil

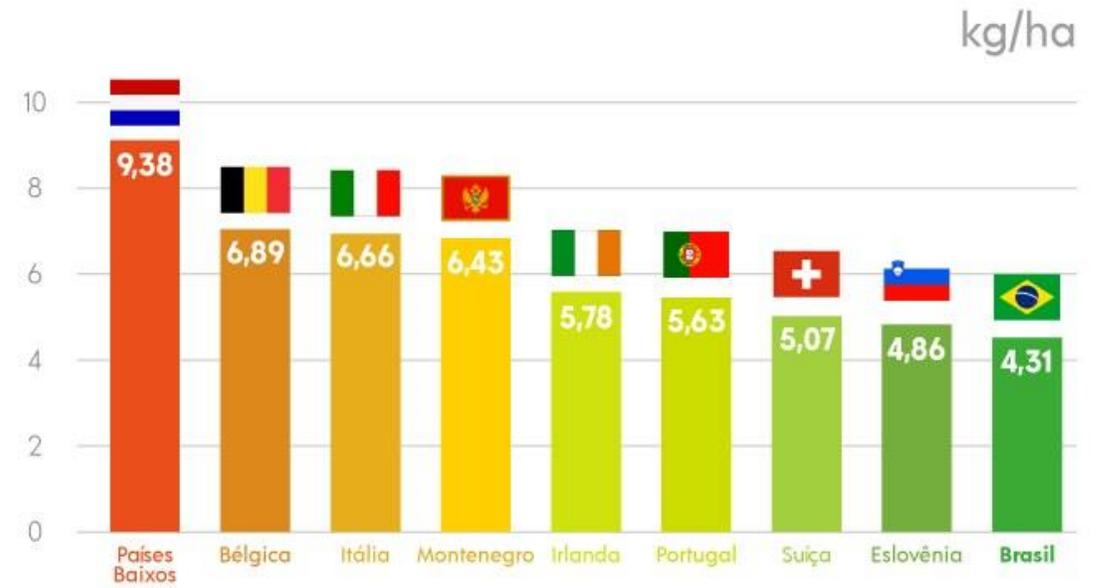
## Consumo de agrotóxico no Brasil

\*Números em tonelada de ingrediente ativo



Fonte: IBAMA / Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto n° 4.074/2002.

## Ranking da FAO sobre uso de defensivos por hectare cultivado



Fonte: FAO (2016)

# Intoxicações

Ministério da Saúde → + 400.000 pessoas/ano com ~ 4.000 mortes

OMS { ~ 7.000.000 casos de doenças agudas e crônicas não fatais  
~ 70.000 casos que levam a óbito

Lista de alimentos com maior nível de contaminação por agrotóxicos



Fonte: Anvisa

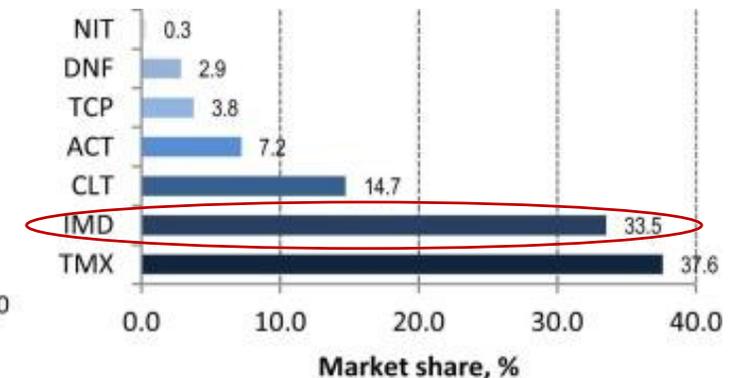
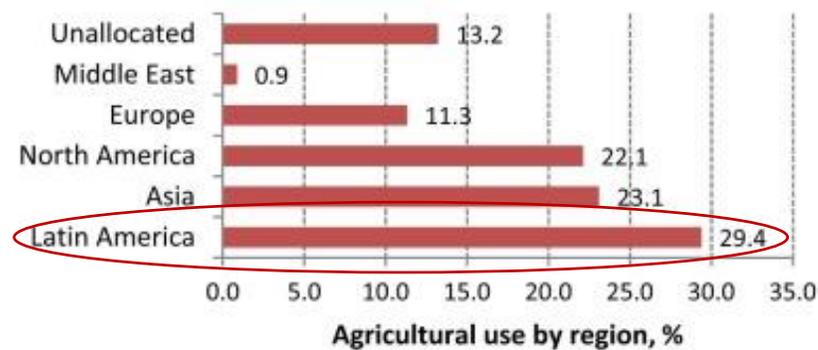
# Neonicotinóides

Izuru Yamamoto (1980): nova geração de inseticidas **nicotinóides**



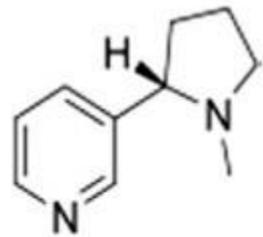
Compostos estruturalmente semelhantes à **nicotina**

- Classe de inseticidas mais utilizada no mundo;
- Registrados em mais de 120 países;

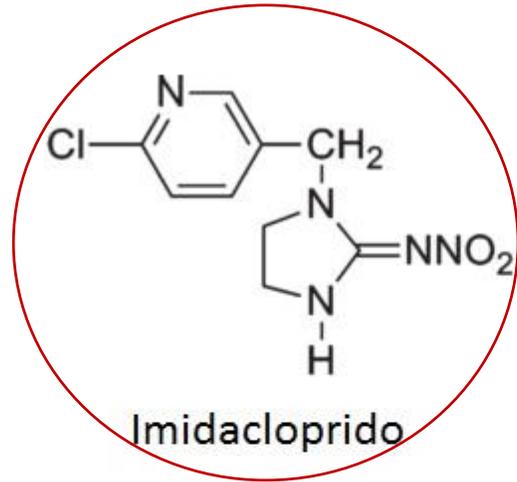


Fonte: Bass et al. (2015).

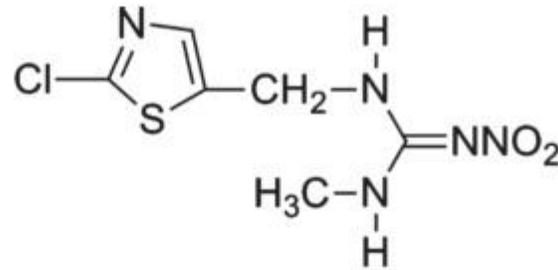
# Neonicotinóides



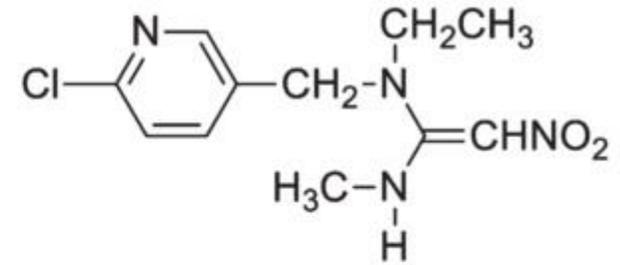
Nicotina



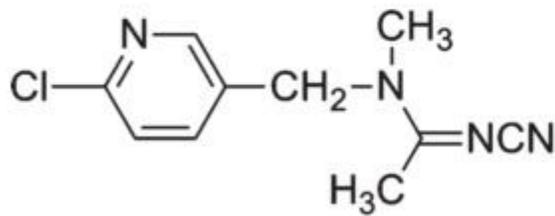
Imidacloprido



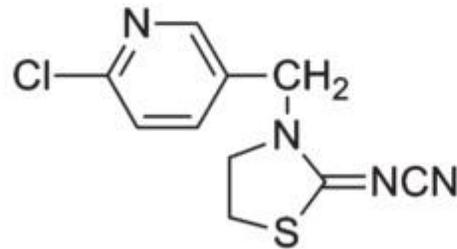
Clotianidina



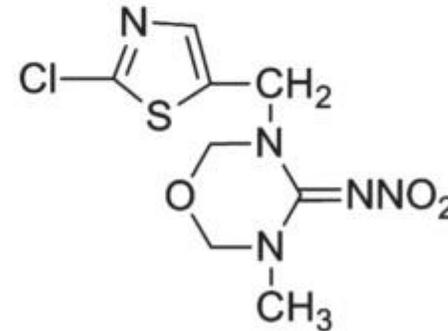
Nitempiram



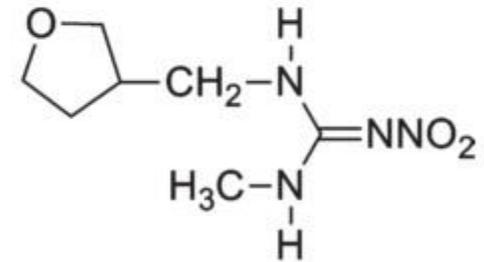
Acetamiprido



Tiacloprido



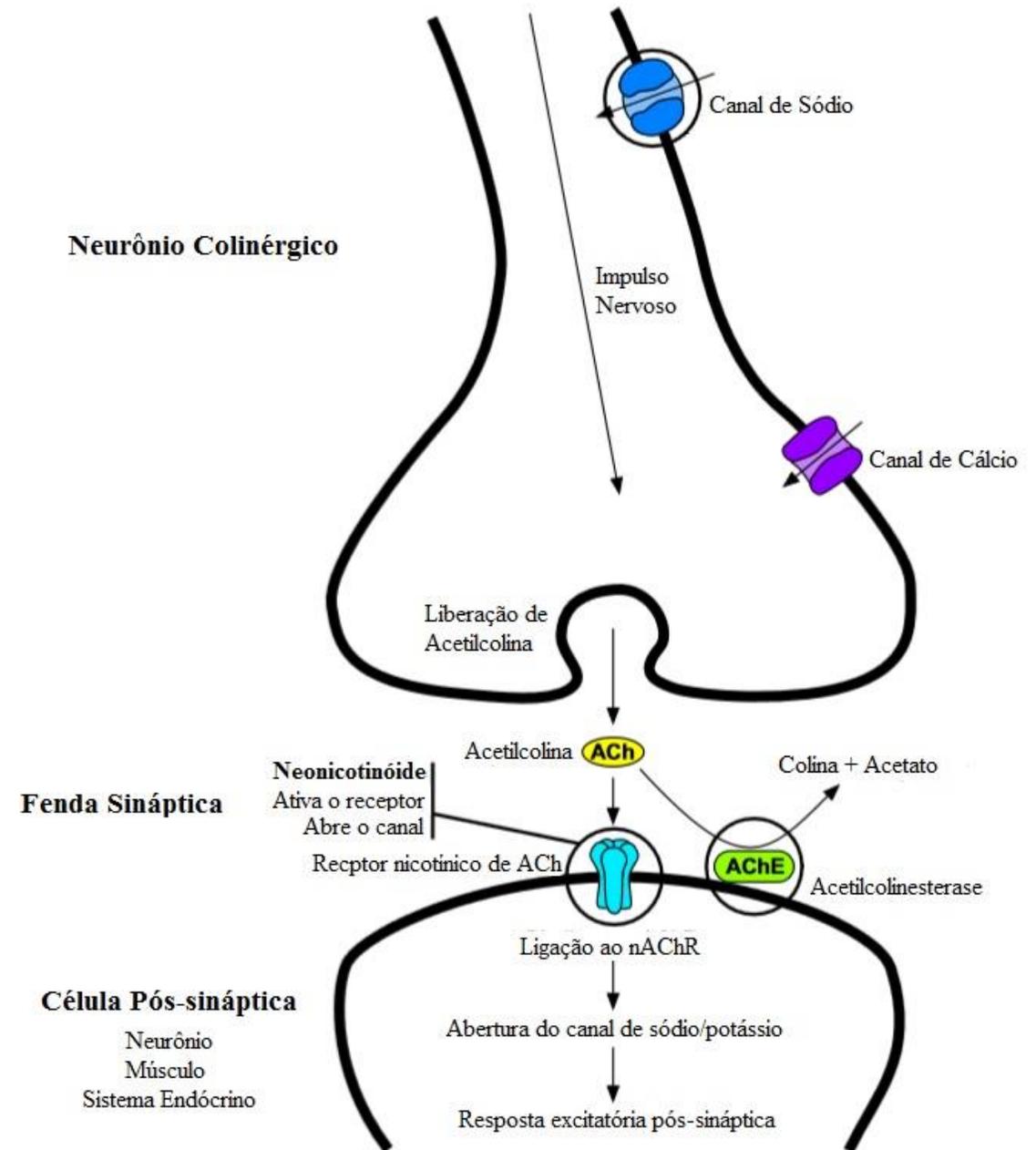
Tiametoxam



Dinotefuram

# Neonicotinóides

- Alta eficiência;
- Versatilidade na aplicação;
- Natureza sistêmica;
- Amplo espectro de ação;
- Alta solubilidade em água;
- Persistência no organismo;
- Toxicidade seletiva a artrópodes.



# Imidacloprido

- Descrito por Shinzo Kagabu e introduzido no mercado em 1991
- 1º inseticida e 2º agrotóxico mais vendido no mundo;
- Uso liberado para mais de 140 tipos de culturas em 120 países;
- Medianamente tóxico (classe III, ANVISA, 2015);
- Banido de alguns países e proibido pela União Europeia;
- Passou por reavaliação pelo Ibama, em 2012;
- Toxicidade de moderada a alta a pássaros;
- Toxicidade moderada a ratos e camundongos;
- Praticamente não tóxico a peixes e anfíbios ( $CL_{50}$  para peixes e anfíbios 1200-366000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

2008

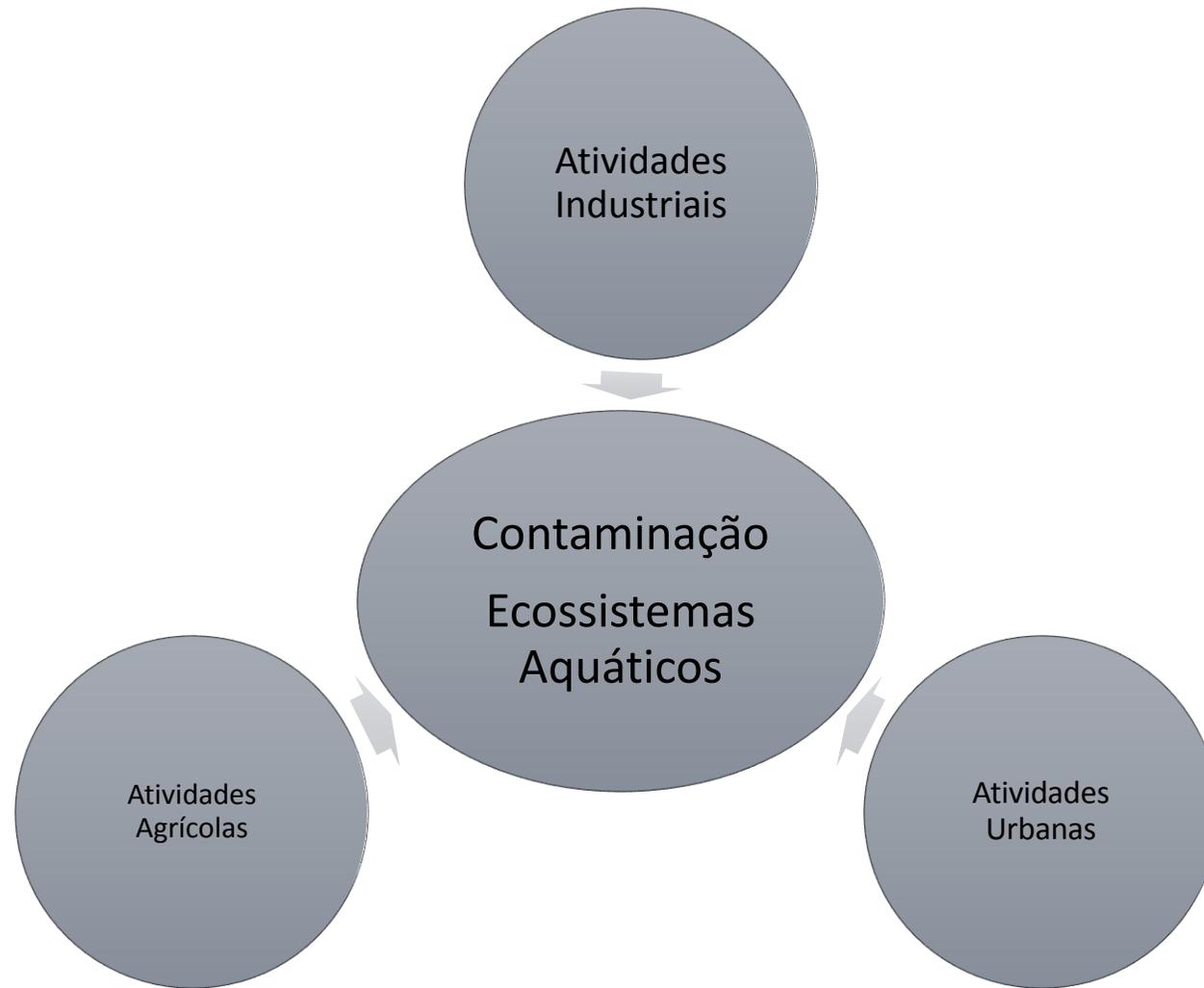
<b>Classe I</b>	<b>Extremamente tóxicos</b>
<b>Classe II</b>	<b>Altamente tóxicos</b>
<b>Classe III</b>	<b>Medianamente tóxicos</b>
<b>Classe IV</b>	<b>Pouco tóxicos</b>

Fonte: Adaptado de Ibama (2013)

Cerca de **72 a 98,4%** dos NNIs aplicados às culturas podem atingir os compartimentos ambientais (ar, solo e água). Devido à **baixa volatilidade e alta persistência no solo**, o IMI pode contaminar os recursos hídricos por meio de **escoamento e lixiviação**, com meia-vida de minutos a semanas (Anderson et al., 2015).

### Concentração de imidacloprido em recursos hídricos no mundo

Estudo	Concentração de IMI ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recurso Hídrico	Local	Período
KREUGER et al., 2010	<b>0,013</b>	Água doce (referência)	<b>Suécia</b>	-
SMIT et al., 2015	<b>0,20</b>		<b>Holanda</b>	-
ANDERSON; DUBETZ; PALACE, 2015	<b>0,23</b>		<b>Canadá</b>	-
	<b>1,05</b>		<b>Estados Unidos</b>	-
MAIN et al., 2014	Concentrações máximas de <b>0,26</b>	Zonas úmidas próximas a áreas de agricultura	Canadá	2012 – 2013
ENSMINGER et al., 2013	0,04-0,05, com máxima de 0,7	Águas superficiais	Califórnia, EUA	2008 – 2011
STARNER; GOH, 2012	0,04-0,7, <b>máxima de 3,29</b>	Zonas agrícolas	Califórnia, EUA	2010 – 2011
BORTOLUZZI et al., 2006	<b>0,38 – 2,18</b>	Bacia hidrográfica	Agudo-RS, Brasil	2003
SÁNCHEZ-BAYO; HYNE, 2014	<b>Concentração máxima de 4,56</b>	Rios	Sydney, Austrália	2013
KREUGER et al., 2010	<b>Máxima de 15</b>	Águas superficiais próximas a áreas de horticultura	Suécia	2008
VAN DIJK, 2010	<b>Acima de 200</b>	Corpos hídricos	Holanda	1998 - 2007



# Análises Químicas

Contaminação  
Ecosistemas  
Aquáticos

Efeitos nos organismos

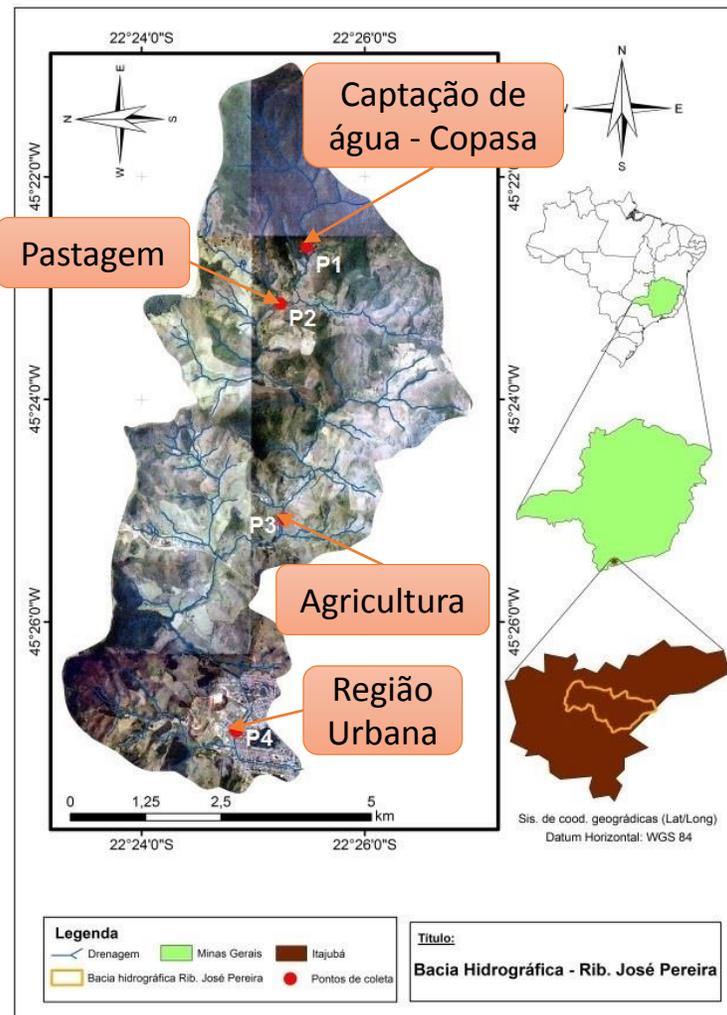
Análises Químicas

The diagram consists of two light blue rounded rectangular boxes stacked vertically. The top box contains the text 'Análises Químicas'. The bottom box contains the text 'Biomonitoramento'. A red plus sign is positioned between the two boxes, centered horizontally. The word 'Contaminação' is written in a smaller font, centered between the two boxes and partially obscured by the red plus sign. The entire diagram is set against a white background with a light gray shadow beneath the bottom box.

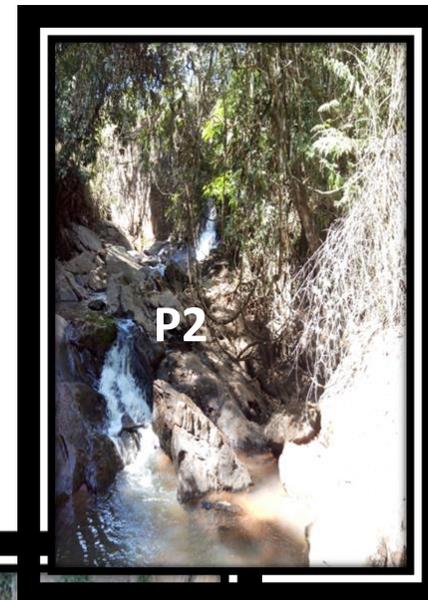
Contaminação

Biomonitoramento

# Análise Inicial – Microbacia do Ribeirão José Pereira



Compostos	LD	LQ	r2	Amostra P2	Amostra P4
Imidacloprido	0.303	1.009	0.992	2.6	3.1
Carbendazim	0.116	0.387	0.999	1.9	14.1
Simazina	0.197	0.656	0.997	<LD	0.8
Carbofurano	0.175	0.585	0.997	3.0	3.0
Hexazinona	0.124	0.412	0.999	1.9	1.1
Tebutiuron	0.062	0.206	0.999	3.3	3.5
Atrazina	0.235	0.785	0.983	1.4	1.6
Diuron	0.409	1.363	0.986	2.6	5.8
Clomazona	1.722	5.741	0.994	2.4	2.4
Ametrina	0.522	1.739	0.958	1.8	1.9
Azoxistrobina	0.134	0.446	0.992	2.8	2.9
Malation	0.863	2.878	0.939	73.0	77.9
2,4D	4.685	15.617	0.997	<LD	<LD
Fipronil	0.353	1.177	0.989	<LD	<LD



# *Astyanax altiparanae* (Garutti e Brittsk, 2000)



Lambari, tambuí e lambari-de-rabo-amarelo:

- Ampla distribuição geográfica;
- Onívoro;
- Atinge de 10 a 15 cm e até 60 gramas;
- Maturidade sexual aos quatro meses de vida.

Tem sido cada vez mais utilizada em estudos de biomonitoramento, pois apresenta grande adaptabilidade a diferentes habitats, sensibilidade às mudanças ambientais e ação tóxica de xenobióticos.

# *Astyanax altiparanae* (Garutti e Brittsk, 2000)



Pode ser utilizado:

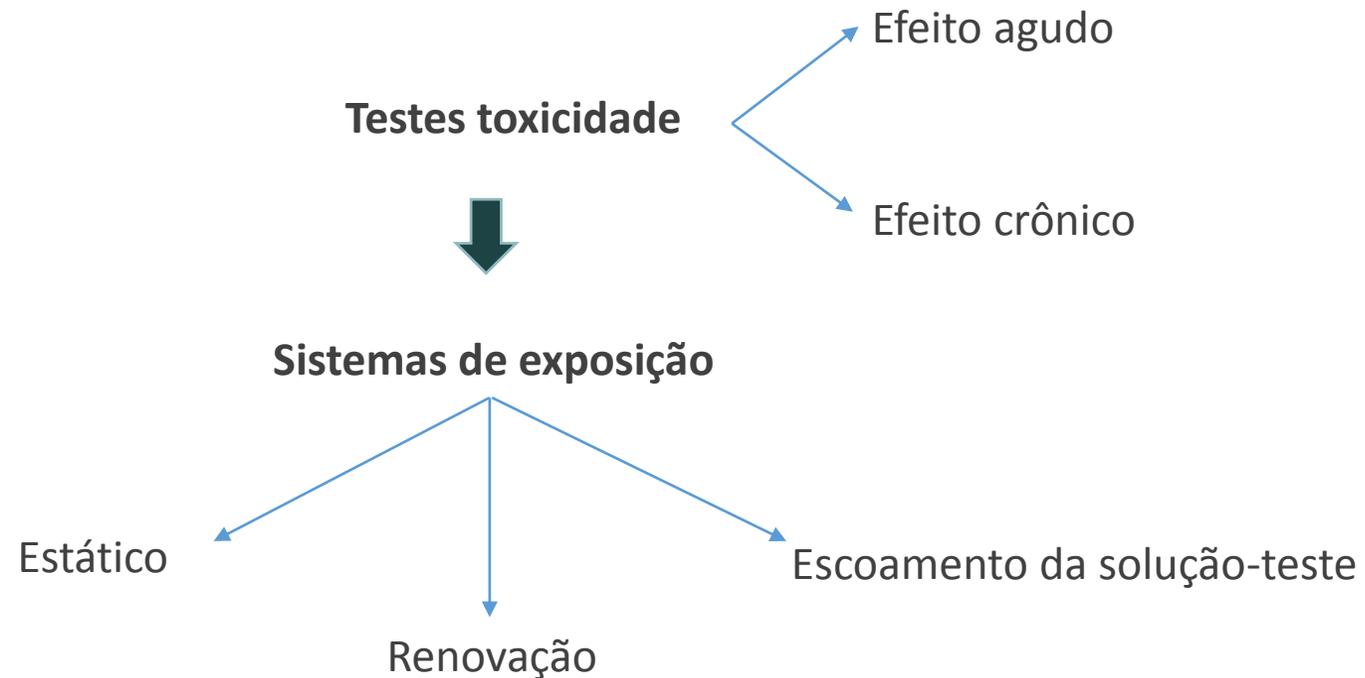
- como alimento (consumo *in natura*);
- isca viva (em pesca profissional ou de lazer);
- servir de alimento para espécies carnívoras;
- em aquarofilia;
- como peixe ornamental.

Desempenha um papel essencial na cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos, servindo como alimento para peixes carnívoros e atuando como predador de larvas de insetos (Rossi et al., 2011).

É um dos gêneros de maior riqueza de espécies na ictiofauna Neotropical (Silva et al., 2017).

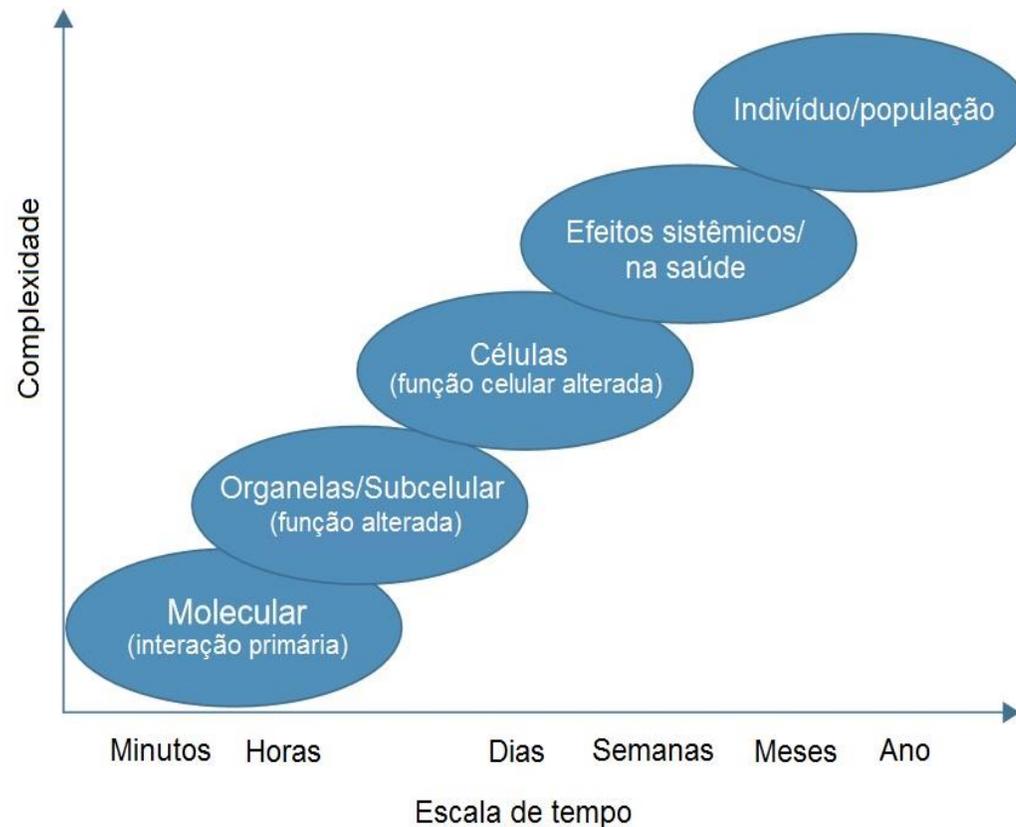
# Testes Ecotoxicológicos

**Ecotoxicologia** ➔ Ciência que avalia os efeitos de agentes tóxicos em ecossistemas naturais e em espécies não-alvo



# Biomarcadores

Medições que evidenciam interações de xenobióticos e outros estressores com sistemas biológicos



Fonte: Gagné (2014).

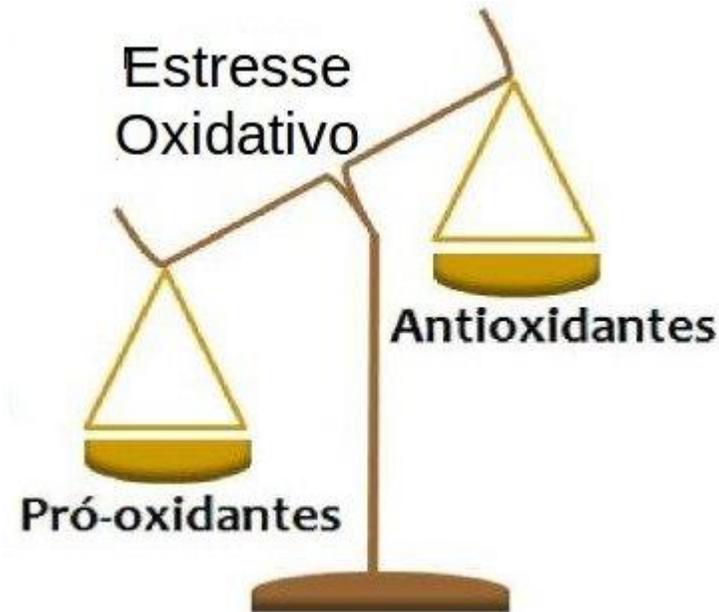
# Biomarcadores Bioquímicos: Biomarcadores de estresse oxidativo

Os organismos aeróbios possuem a vantagem energética de usar o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons na respiração, mas a **liberação de elétrons desacoplados de alta energia** na mitocôndria e nos cloproplastos leva a formação de espécies altamente reativas.

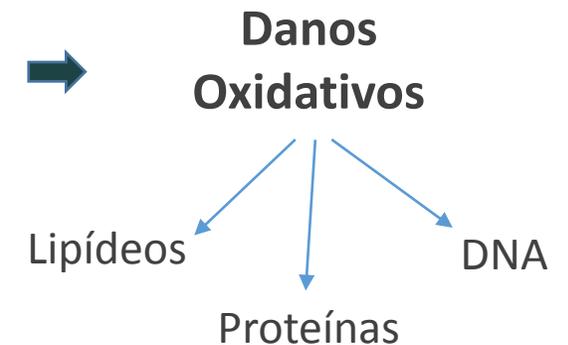


## Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

Radicais	Não-radicais
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrogênio, $H_2O_2$
Hidroperoxila, $HO_2^{\cdot}$	Peroxinitrito, $ONOO^-$
Hidroxila, $OH^{\cdot}$	Ácido peroxinitroso, $ONOOH^a$
Peroxila, $RO_2^{\cdot}$	Peroxicarbonato nitroso, $ONOOCO_2^-$
Oxigênio atômico, $^1O_2$	Oxigênio atômico, $^1O_2$
Alcoxila, $RO^{\cdot}$	Ácido hipocloroso, $HOCl^b$
	Ácido hipobromoso, $HOBr^c$
Carbonato, $CO_3^{\cdot-}$	Ozônio, $O_3$
	Peróxidos Orgânicos, $ROOH$
Dióxido de Carbono, $CO_2^{\cdot-}$	Peroxinitrato, $O_2NOO^{\cdot}$
	Peroximonocarbonato, $HOOCO_2^{\cdot}$



Exposição a pesticidas → ↑ EROS

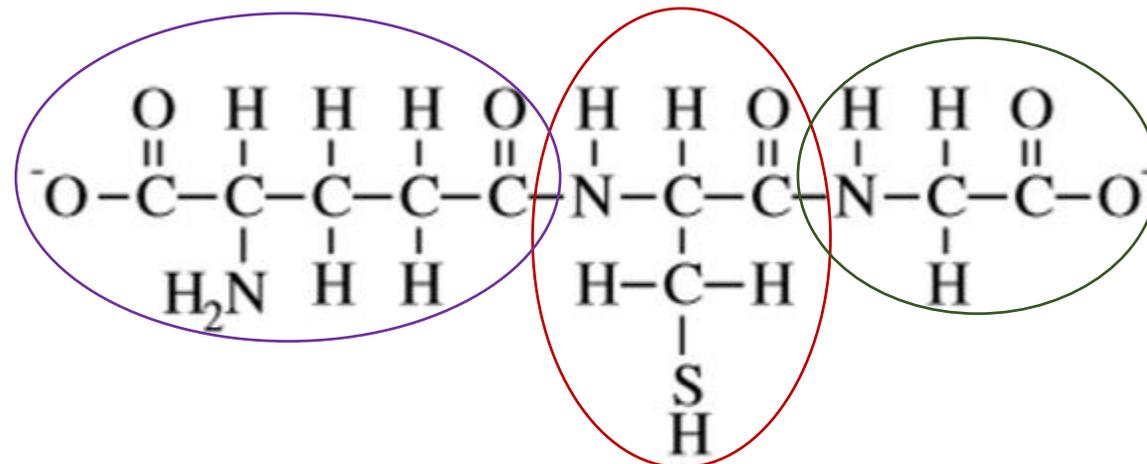


# Biomarcadores de estresse oxidativo

## Glutationa Reduzida (GSH)

Agente conjugante essencial ao organismo, sendo a molécula mais importante dentre os compostos antioxidantes não-enzimáticos.

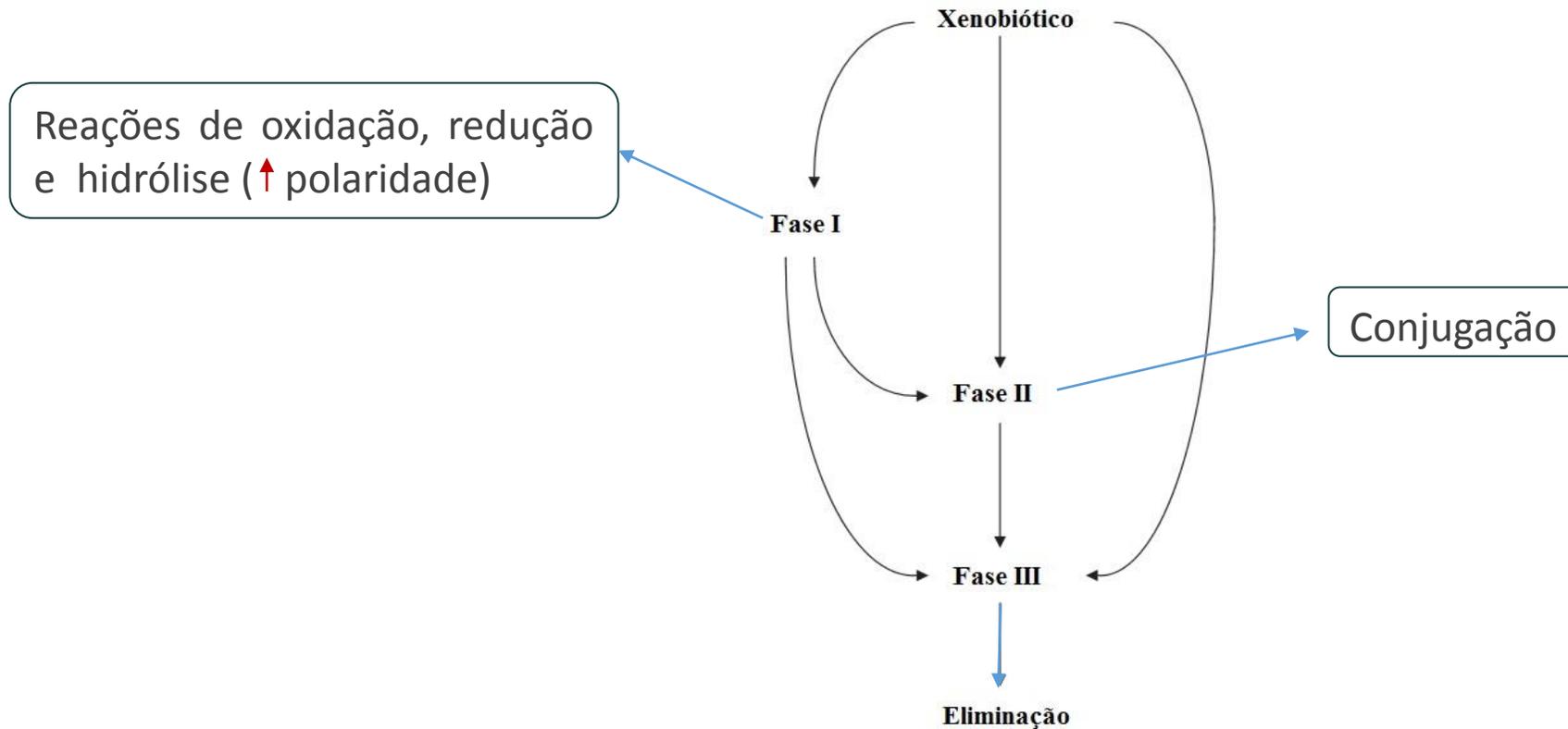
- Tripeptídeo: ácido glutâmico (Glu), cisteína (Cys) e glicina (Gly).
- Forma conjugados que podem ser diretamente excretados ou passar por reações bioquímicas.



# Biomarcador de Biotransformação



Capacidade de eliminar xenobióticos e manter a homeostase



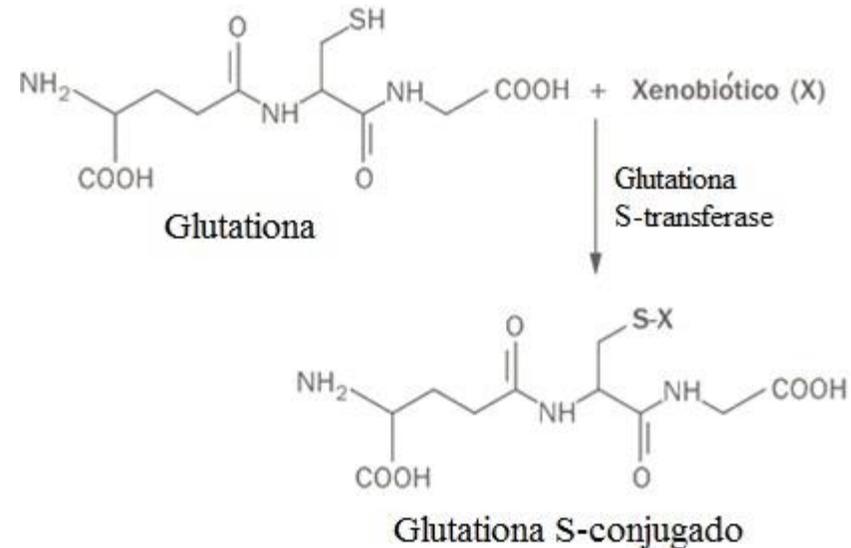
Fonte: Adaptado de Smart e Hodgson (2008).

(MARTINEZ, 2006; GAGNÉ, 2014)

# Glutathione S-transferase (GST)

- As GSTs são uma família de isoenzimas, as quais são encontradas principalmente no fígado, importante órgão detoxificante

A conjugação de xenobióticos polares à glutathione (GSH) representa uma importante via da fase II em invertebrados e peixes



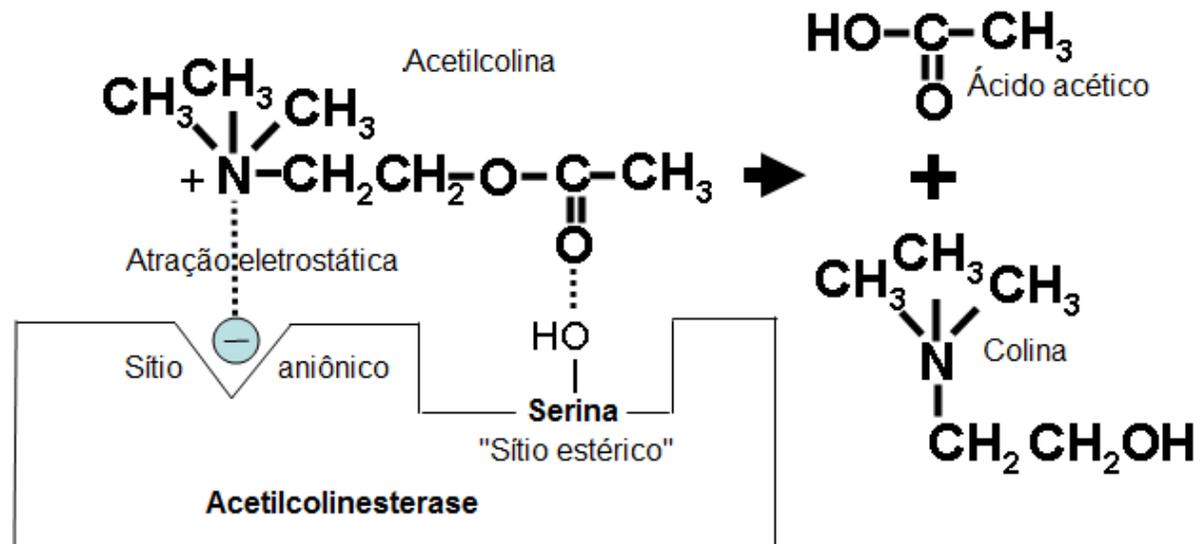
Fonte: Simic et al. (2009).

# Biomarcador de Neurotoxicidade

## Acetilcolinesterase (AChE)

**Neurotoxicidade:** Efeitos na função do sistema nervoso ou de nervos periféricos após a exposição a um ou mais agentes químicos

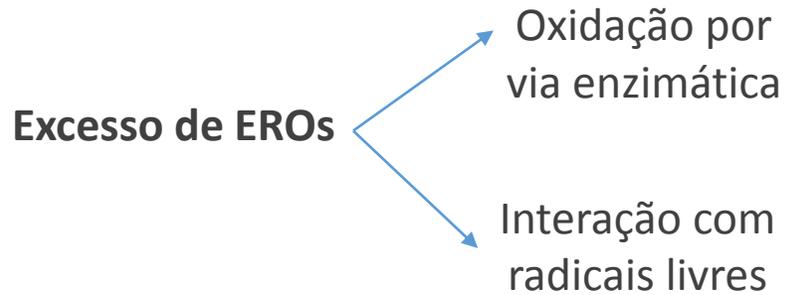
O neurotransmissor mais importante nas junções musculares é a ACh, a qual é hidrolisada pela AChE. Uma mudança na atividade desta enzima pode causar alterações no comportamento e na atividade neuromuscular.



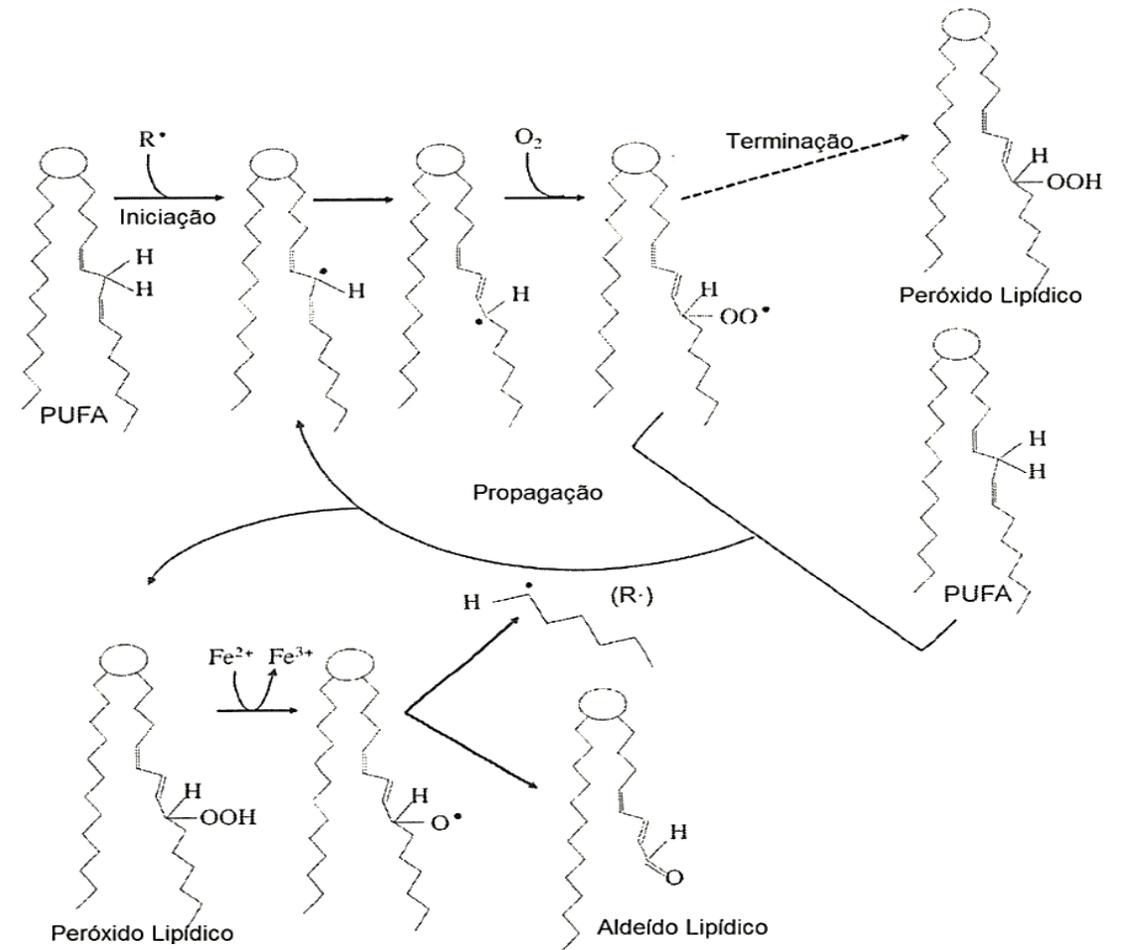
Fonte: Adaptado de ATSDR (2007).

# Biomarcadores de estresse oxidativo – dano oxidativo

## Peroxidação Lipídica (LPO)



Uma das técnicas mais comumente empregadas na determinação de estresse oxidativo em peixes, devido ao fato destes animais possuírem grandes quantidades de lipídios com resíduos de ácidos graxos poli-insaturados em seus organismos.



Fonte: Adaptado de Boelsterli (2007) por Filipak Neto (2014).

# Biomarcadores de estresse oxidativo – dano oxidativo

## Carbonilação Proteica (PCO)

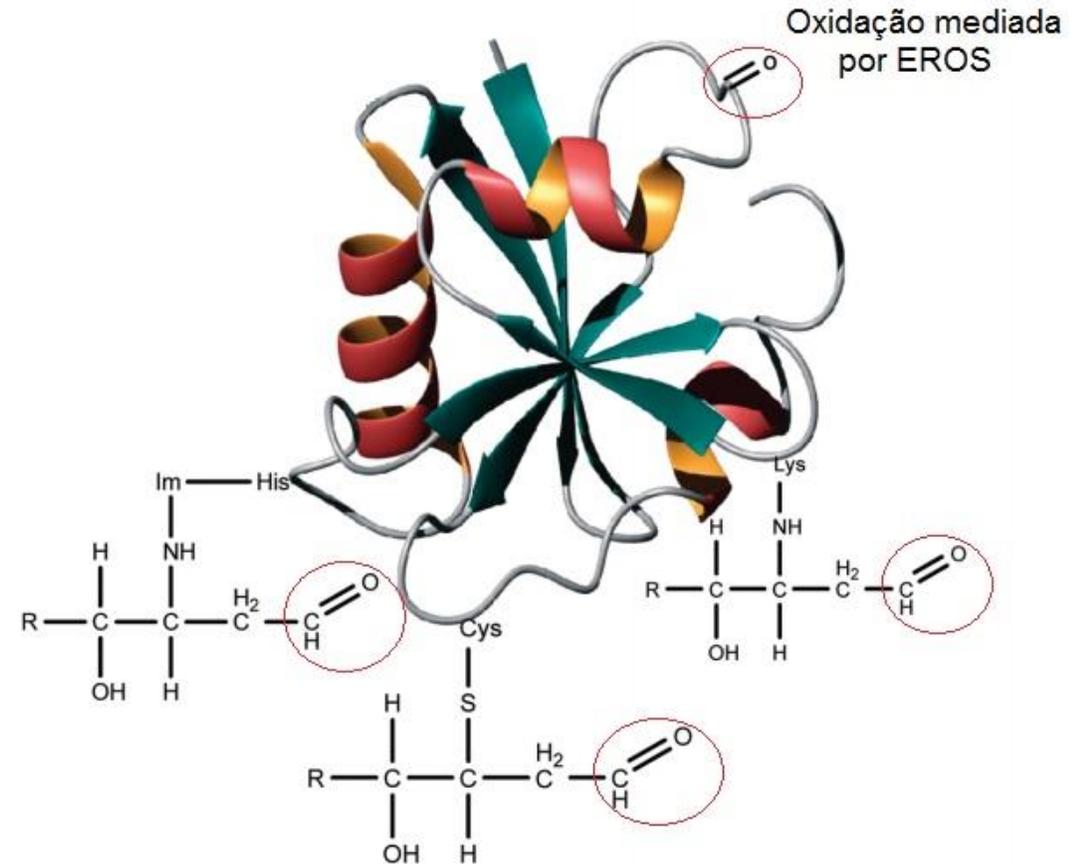
Carbonilas proteicas



Oxidação de aminoácidos

Reações com produtos da lipoperoxidação

Modificação irreversível que leva ao dano da função proteica.



Lipoperoxidação avançada e seus produtos

Fonte: Adaptado de Madian e Regnier (2010).

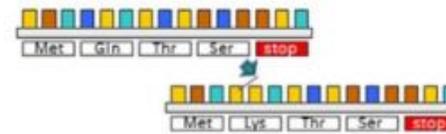
# Biomarcadores de Genotoxicidade:

Quando o IMI passa por uma membrana celular, sua distribuição para outros tecidos ocorre imediatamente pelo sistema circulatório, e as células sanguíneas (como os eritrócitos) podem ser negativamente afetadas por ele (Iturburu et al., 2016).

Eventos genéticos são utilizados em muitos estudos como biomarcadores de exposição a genotóxicos, avaliando a capacidade do organismo em conservar a integridade do DNA e lidar com o dano (PRINTES, 2004).



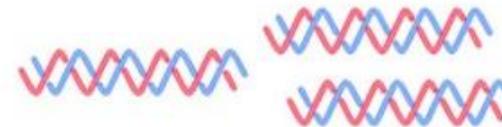
**(A)** Mecanismo de reparo do DNA



**(B)** Mutação pontual



**(C)** Formação de aduto de DNA



**(D)** Fragmentação do DNA



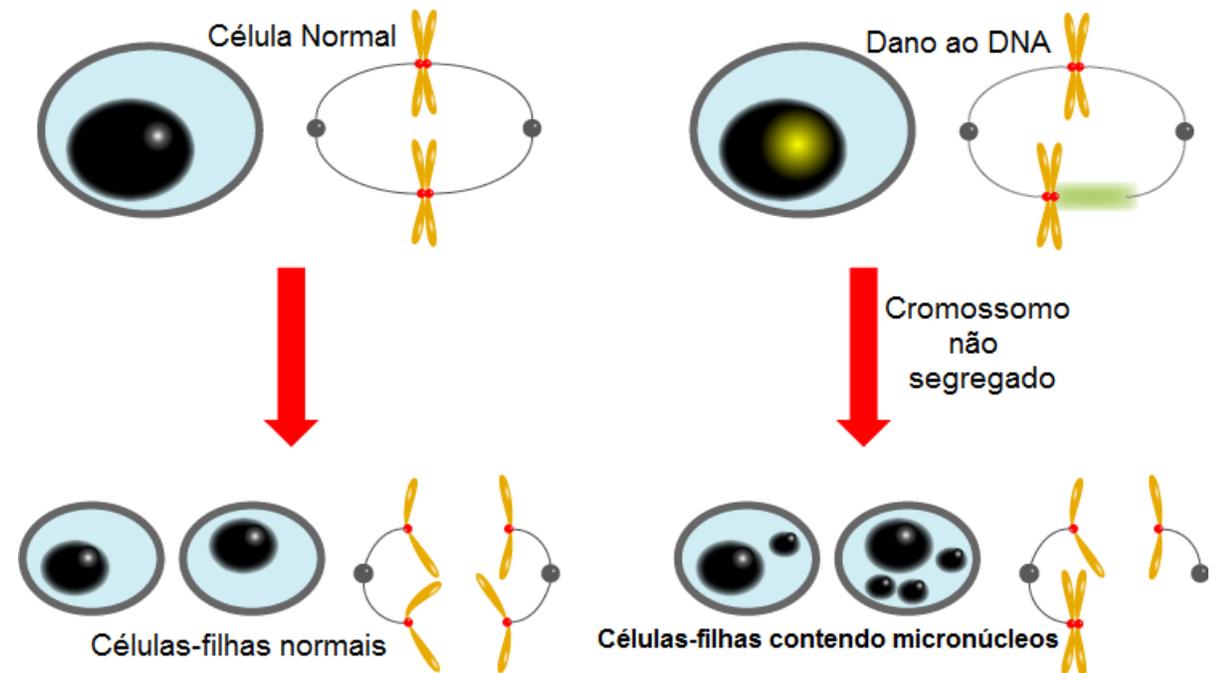
**(E)** Formação de micronúcleo

Quando os mecanismos de reparo do DNA (A) estão sobrecarregados com substâncias tóxicas, há um aumento na ocorrência de mutação (B), o qual pode ser resultado do aumento da formação de aductos de DNA (C). Alterações de maior escala no genoma podem ocorrer devido à (D) fragmentação do DNA ou à formação de micronúcleos (E). Fonte: Adaptado de Nikinmaa (2014).

# Biomarcadores de Genotoxicidade: Micronúcleos (MN)

Consequência de **irregularidades mitóticas**, originando-se de material cromossômico não incorporado pelo núcleo das células-filhas durante a anáfase.

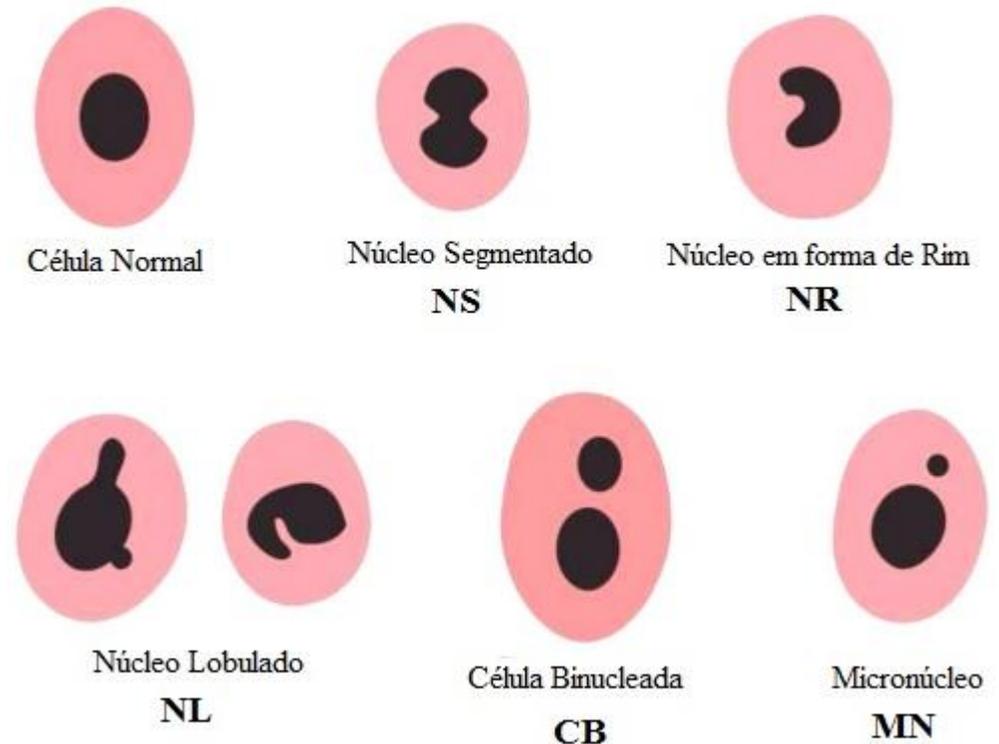
- Estruturas independentes do núcleo celular;
- Máximo: 1/3 do tamanho deste;
- Se localizam no citoplasma.



Fonte: Gentronix (2015).

# Biomarcadores de Genotoxicidade: Alterações Eritrocíticas Nucleares (ENA)

- ENA
- Reparo e eliminação da cromatina em regiões danificadas do DNA
  - Falha no mecanismo apoptótico induzido pela ação de contaminantes
  - Relacionado ao estresse oxidativo (LPO pode aumentar a permeabilidade da membrana nuclear)



Fonte: Adaptado de Carrola et al. (2014).

# Metodologia

## Aclimatação



### Peixes:

Fêmeas;

$11,46 \pm 2,90$  g;

$9,66 \pm 1,03$  cm.

- 5 dias;
- Água de torneira desclorada;
- Renovação periódica (2 dias);
- Aeração constante;
- Alimentação: ração comercial (Laguna) a cada dois dias.

Parâmetros físicos e químicos: T, OD, pH, cond., turb. e SST mensurados diariamente com sonda multiparâmetros

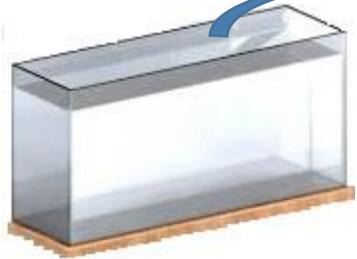
## Exposição



- 96 h;
- 10 peixes por aquário (80 L);
- Imidacloprido: 0.07, 0.63, 5.94 e  $53.95 \mu\text{g L}^{-1}$ ;
- Controle (água de torneira desclorada);
- Renovação periódica (diária);
- Aeração constante;
- Protegidos da incidência de luz.

# Amostragem

**Anestesia**  
(benzocaína 0,1 g L<sup>-1</sup>)



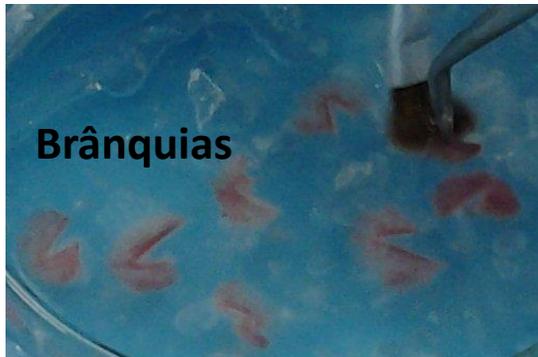
+



**Sangue**



**Ensaio  
Genotóxico**



**Brânquias**



**Fígado**



**Músculo**

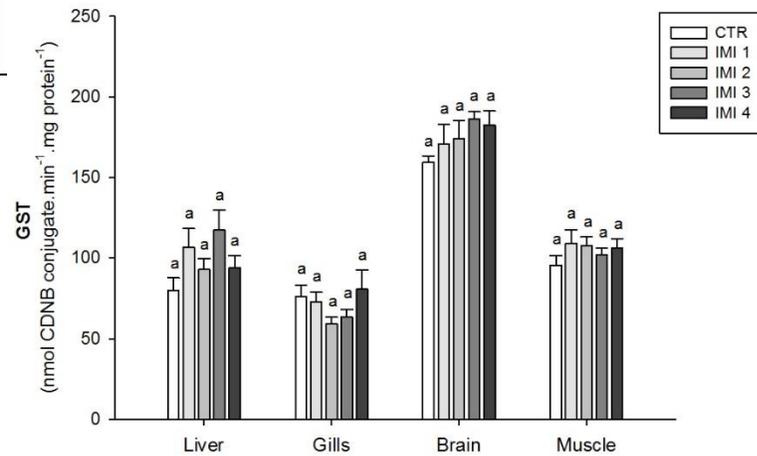
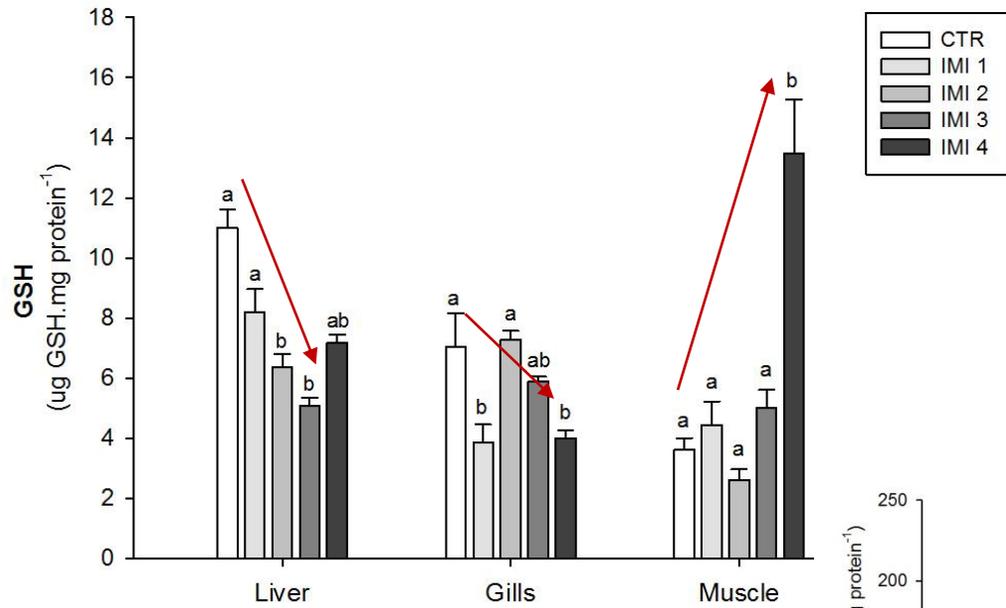


**Cérebro**

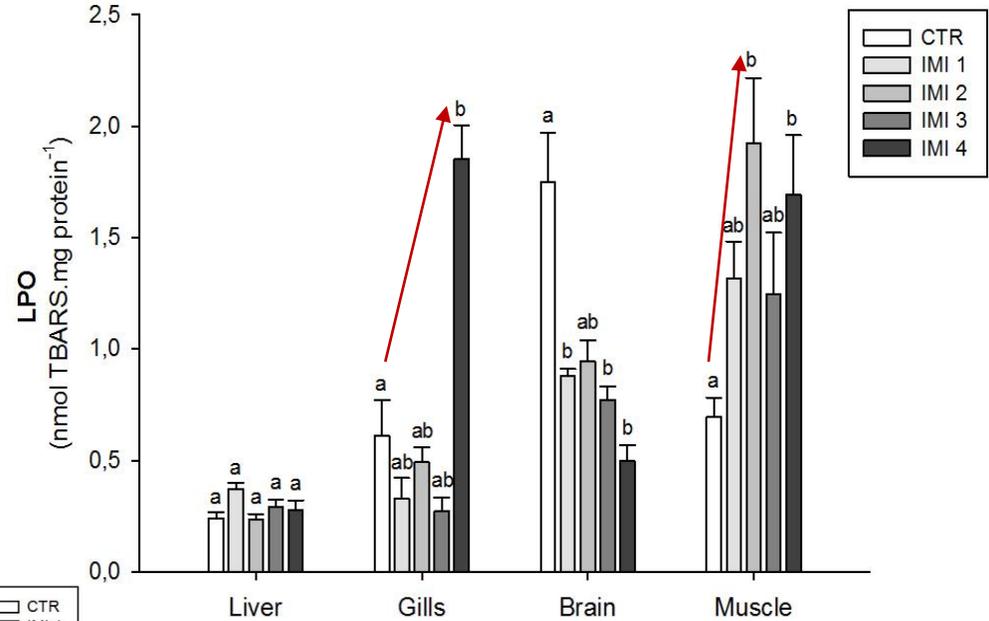
**Ensaio Bioquímicos**

# Resultados

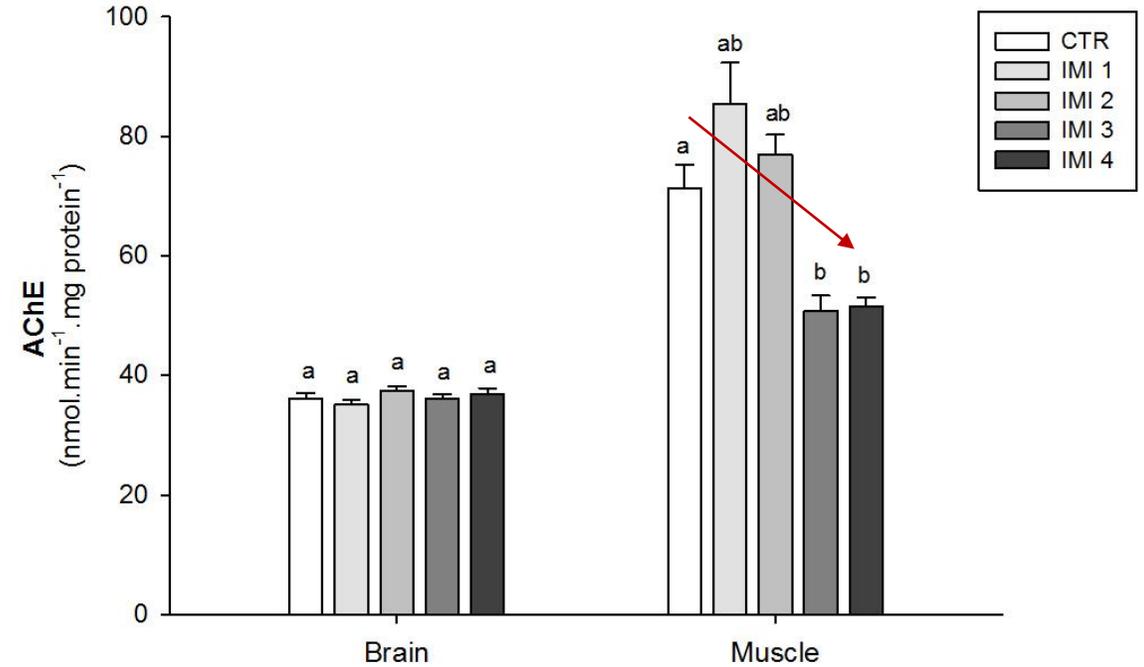
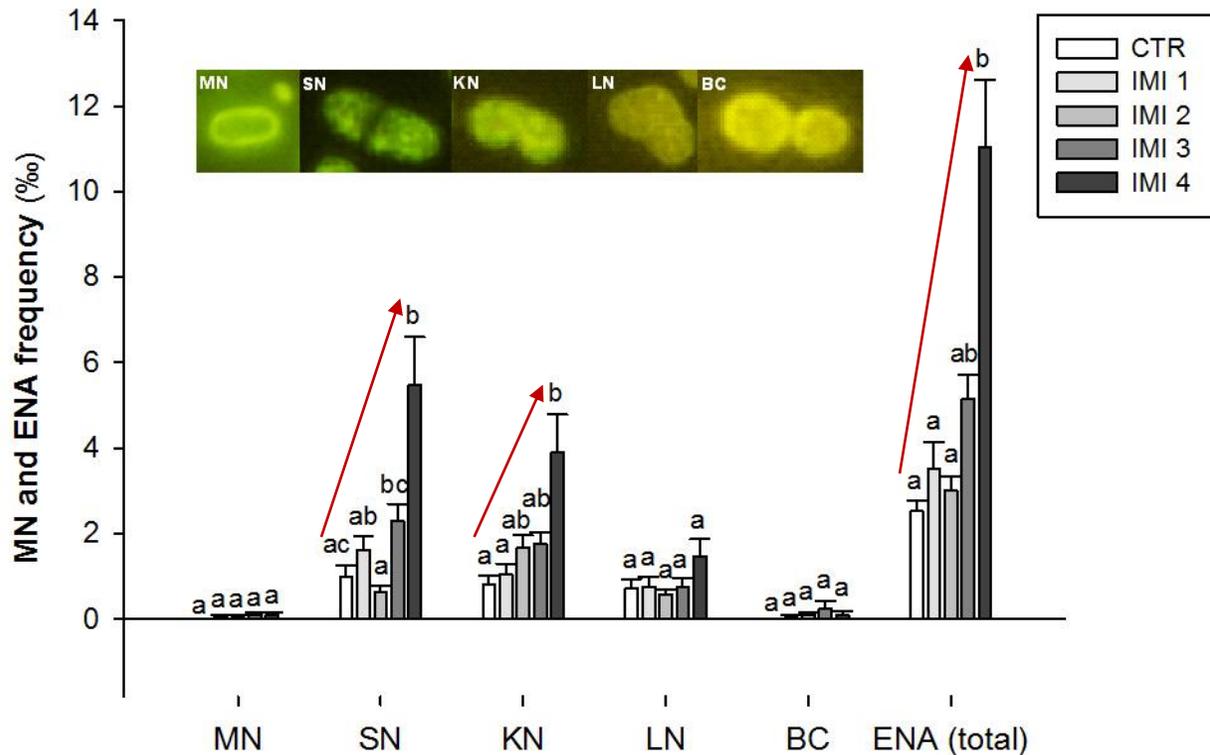
## Defesa antioxidante:



## Dano oxidativo:



# Resultados

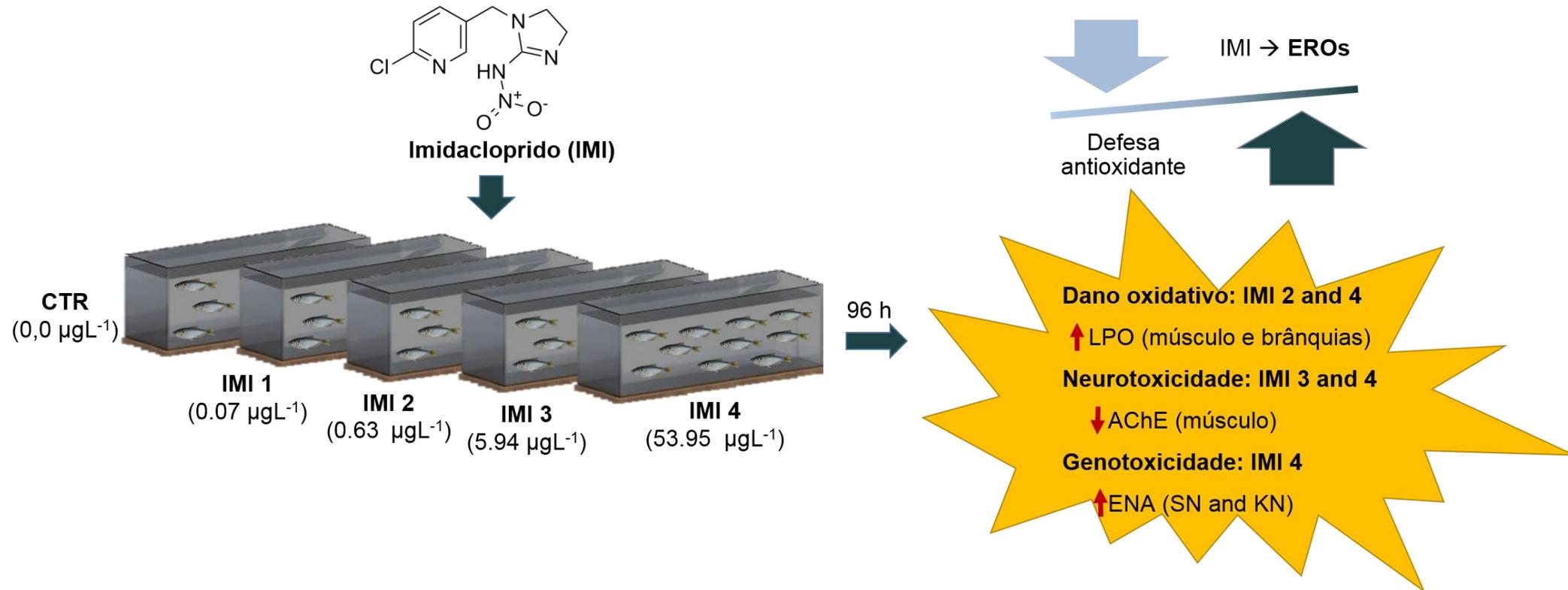


Inibição da atividade da AChE em peixes e invertebrados:

- 20% → exposição a compostos neurotóxicos;
- 20-50% → impactos subletais; → ~30%
- > 70% → associados à mortalidade

(Amiard-triquet et al., 2015)

# Conclusões



Assim, esse neonicotinóide pode afetar a saúde de *A. altiparanae* e, provavelmente, de outros peixes neotropicais.

# Atividade:

Baseado no que foi aprendido nesta disciplina, para avaliar a possível contaminação por agrotóxicos, como você faria o biomonitoramento de um rio localizado em uma zona rural caracterizada pela presença de áreas agrícolas?