UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

FIPRONIL E ETHIPROLE: UM ESTUDO COMPARATIVO EM ORGANISMOS NÃO ALVOS

THAYS DE ANDRADE GUEDES

Agosto - 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

FIPRONIL E ETHIPROLE: UM ESTUDO COMPARATIVO EM ORGANISMOS NÃO ALVOS

THAYS DE ANDRADE GUEDES

Orientadora: Profª Drª Carmem Silvia Fontanetti Christofoletti

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 2019

G924f

Guedes, Thays de Andrade
Fipronil e ethiprole: Um estudo comparativo em organismos não alvos / Thays de Andrade Guedes. -- Rio Claro, 2019
91 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Carmem Silvia Fontanetti Christofoletti

1. Defensivo agrícola. 2. Fenilpirazol. 3. Ecotoxicologia. 4. Curbix®. 5. Regent®. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: FIPRONIL E ETHIPROLE: UM ESTUDO COMPARATIVO EM ORGANISMOS NÃO ALVOS

AUTORA: THAYS DE ANDRADE GUEDES
ORIENTADORA: CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI
Centro de Ciências Agrárias / UFSCar - ARARAS

Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO
CEIS / IB Rio Claro

Profa. Dra. CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI DE FIGUEIREDO
x / Fundação Hermínio Ometto, UNIARARAS

Profa. Dra. ANA CLAUDIA DE CASTRO MARCATO
x / x

Rio Claro, 09 de agosto de 2019

“Presentemente eu posso me considerar um sujeito de sorte
Porque apesar de muito moço me sinto são e salvo e forte
E tenho comigo pensado, Deus é brasileiro e anda do meu lado
E assim já não posso sofrer no ano passado”

Antônio Carlos Belchior

AGRADECIMENTOS

À minha família que, mesmo fisicamente distante, permaneceu tão presente no meu dia a dia. Em especial à mamãe e papai que me ensinaram a ir, tentar e conseguir sem ter medo de cair. À avó e madrinha mais linda do mundo, vovó Ana.

Às minhas primeiras e presentes amizades de Rio Claro Amanda e Carlos por nossas vidas conjugadas, abraçadas, confiadas e por não medirem esforços para me ajudar em tudo o que fosse necessário. À minha irmã, companheira e confidente Elis. Ao Emiliano M. por me dar seu amor e me fazer sorrir diariamente.

Aos amigos que o vôlei me proporcionou, em especial aos que extravasaram a barreira do esporte (Marco, Jesus, Rafaela, Guache, Coxinha, Tico, Precoce, Maori, Léo, Valente, Pixel, Thomás, Arroz e Leticia). Às amigas da república Resta 1 (Caci, Sheilla, Lara, Carol, Nicole, Shiva e Frevo), aos meninos da república Computaria e agregados (Bile, Incosto, Carinha, Spiga, Tchay, Piroca, Matrix, Gi Reis), às minhas amigas-irmãs (Gisela, Rochelle, Cintia, Jessica e Hanna) e aos amigos da república Toka e agregados (João, André, Léo, Mirian, Francisco e Bárbara) pelos ótimos momentos.

Aos amigos que o PDSE 2017 me proporcionou em Madrid: os brasileiros Jaque, Fabricio, Mari, Rafa, Thaisa, Nil e Aninha, às minhas *roommates* Cata, Cris e Sara e aos meus companheiros competentíssimos da Universidade Complutense de Madrid Davi, Bernardo, Irma, José e Arantxa.

A todos os fofoletes com quem convivi e aprendi, em especial aos sobreviventes Ana Matraca, Jorge e Cleiton. Aos queridos amigos de trabalho do Departamento de Biologia, em especial à Natália, Leticia R., Leticia G, Adriana, Nadia, Lais, Franco, Ana Z., Camila, com os quais convivo mais que minha família.

Aos professores do Departamento de biologia, em especial as professoras Márcia, Karen, Maria Isabel e Marin por cederem gentilmente os laboratórios pelos quais são responsáveis para que eu desenvolvesse minha pesquisa.

Agradeço as agências de fomento, CAPES e FAPESP pelo financiamento do projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, bem como pela concessão da bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) - 88881.132874/2016-01 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2012/50197-2.

Por fim, à minha orientadora, psicóloga, mãe-postiça Carmem Silva Christofoletti Fontanetti por ter sido exemplo de pesquisadora competente, empática e justa.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. O fenilpirazol fipronil está dentre os inseticidas mais utilizados na cultura de cana-de-açúcar. Sua molécula é extremamente ativa e um potente desregulador do sistema nervoso central dos insetos. Devido a sua elevada toxicidade, moléculas como o ethiprole estão sendo empregadas na agricultura em busca de uma alternativa mais segura. Produzido a partir da modificação da molécula do fipronil, poucos estudos têm demonstrado que o ethiprole surgiu no cenário agrário como uma alterativa mais segura que o fipronil aos organismos não alvos em geral. O uso de bioindicadores permite o estudo dos possíveis riscos de inseticidas. Entre estes, plantas e organismos aquáticos são excelentes para avaliar efeitos de agrotóxicos no ambiente. No presente estudo, foi avaliada a ação de diferentes concentrações dos inseticidas Regent® e Curbix® em organismos não alvos, por meio de ferramentas macroscópicas em *Allium cepa* e *Lactuca sativa* e microscópicas em *Oreochromis niloticus*. Os testes de germinação de sementes e alongamento radicular em *A. cepa* e *L. sativa* foram utilizados para a avaliação dos efeitos fitotóxicos no desenvolvimento inicial das plantas. As alterações histopatológicas no fígado de *O. niloticus*, a quantificação de peroxidação lipídica (TBARS), localização *in situ* das proteínas de choque térmico (HSP70) e de fragmentação do DNA (TUNEL) foram empregadas para verificar o potencial tóxico dos inseticidas a nível celular. Os resultados das análises fitotóxicas em *A. cepa* demonstraram que o Curbix® induziu a redução da porcentagem de germinação, do índice de velocidade de germinação (IVG) e do alongamento das raízes expostas às maiores concentrações. Em *L. sativa*, as concentrações residuais de ambos os inseticidas estimularam a velocidade em que as sementes germinaram, bem como o alongamento de suas raízes. Também foi observado que as diluições com as maiores concentrações dos dois inseticidas empregadas em *O. niloticus* induziram peroxidação lipídica e alterações teciduais no fígado dos animais. Diante do apresentado, concluímos que o uso do Curbix® como alternativa ao Regent® é perigoso, uma vez que o Curbix® apresentou maior toxicidade que o Regent® em plantas e toxicidade similar a seu análogo em peixes.

Palavras-chave: Curbix®, Regent®, fenilpirazol, ecotoxicologia

ABSTRACT

Brazil is the world's largest sugar cane producer. Phenylpyrazole fipronil is included among the most commonly used insecticides in sugarcane cultivation. Its molecule is extremely active and a powerful deregulator of the central nervous system of insects. Given its high toxicity, molecules such as ethiprole are being employed in agriculture to find a safer alternative. Developed by modifying the Fipronil molecule, few studies have demonstrated whether ethiprole appeared as a safer alternative to Fipronil to non-target organisms in general. The use of bioindicators allows the study of possible risks of insecticides. Among them, plants and aquatic organisms are excellent for assessing the effects of pesticides on the environment. In the present study, it was assessed the effects of different concentrations of Regent® and Curbix® insecticides on non-target organisms, employing macroscopic tools in *Allium cepa* and *Lactuca sativa* and microscopic ones in *Oreochromis niloticus*. Seed germination and root elongation tests on *A. cepa* and *L. sativa* were used to evaluate phytotoxic effects on initial plant development. Histopathological alterations in the liver of *O. niloticus*, quantification of lipid peroxidation (TBARS), *in situ* locations of thermal shock proteins (HSP70), and DNA fragmentation (TUNEL) were used to verify the toxic potential of insecticides at the cellular level. The results of phytotoxic analyses on *A. cepa* showed that Curbix® induced a reduction in germination percentage, germination velocity index (GPI) and root elongation at higher concentrations. In *L. sativa*, the residual concentrations of both insecticides increased the rate at which the seeds germinated, as well as the elongation of their roots. It was also observed that the dilutions with the highest concentrations of the two insecticides used in *O. niloticus* induced lipid peroxidation and tissue alterations in the liver of the animals. In this context, we concluded that the use of Curbix® as an alternative to Regent® is dangerous since Curbix® showed greater toxicity than Regent® in plants and similar toxicity to its analog in fish.

Keywords: Curbix®, Regent®, phenylpyrazol, ecotoxicology

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 5
2.1. FIPRONIL 5
2.2. ETHIPROLE 7
2.3. BIOINDICADORES E FERRAMENTAS BIOMARCADORAS EM ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS 9
2.3.1. PLANTAS COMO BIOINDICADORES E FERRAMENTAS UTILIZADAS 9
2.3.2. PEIXES COMO BIOINDICADORES E FERRAMENTAS UTILIZADAS 11
3. OBJETIVOS 14
4. MATERIAIS E MÉTODOS 15
4.1. MATERIAIS BIOLÓGICOS 15
4.2. INSETICIDAS 15
4.3. BIOENSAIO COM *A. CEPA* E *L. SATIVA* 16
4.3.1. MONTAGEM DO BIOENSAIO 16
4.3.2. ANÁLISES DE FITOTOXICIDADE 17
4.3.2.1. INDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO 17
4.3.2.2. ALONGAMENTO RADICULAR E TAXA DE FITOTOXICIDADE 17
4.4. BIOENSAIO COM *O. NILOTICUS* 17
4.4.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS 17
4.4.2. MONTAGEM DO BIOENSAIO 18
4.4.3. ANÁLISE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA 18
4.4.3.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS 18
4.4.3.2. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS 18
4.4.3.3. DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) 18
4.4.4. IMUNOMARCAÇÃO DA HSP70 (*THE HEAT SHOCK PROTEINS*) 19
4.4.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO TUNEL (*TDT-MEDIATED DUTP-BIOTIN NICK END LABELING*) 20
4.4.6. HISTOLOGIA 20
4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 21
5. RESULTADOS 22
5.1. ARTIGO 1 23
5.2. ARTIGO 2 41
5.3. ARTIGO 3 60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um consumidor assíduo de defensivos agrícolas. Sua relação com esses agentes não é recente; no entanto, dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG) demonstram que nas últimas décadas assumiu proporções preocupantes quando a venda de produtos agrícolas saltou, entre os anos de 2001 e 2008, de um pouco mais de US$ 2 bilhões para mais de US$ 7 bilhões, tornando-se o maior consumidor mundial de defensivos agrícolas. Apesar de manter este título atualmente, um levantamento feito pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, sigla do inglês *Food and Agriculture Organization*) revelou que, quando se considera a área cultivada, e, ainda, o volume de produção agrícola, o Brasil tem feito uso eficiente dos defensivos agrícolas produzindo muito mais e com bem menos defensivos que país de primeiro mundo (SINDIVEG, 2018).

Atualmente, cerca de 81% dos defensivos usados no Brasil tem como destino quatro culturas, sendo elas soja, cana-de-açúcar, milho e algodão (SINDIVEG, 2018). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia, Tailândia e Austrália (UNICA, 2015). Em 2017, tal cultivo foi responsável por 11,7%, em valor (US$), do consumo de defensivos agrícolas no país (SINDIVEG, 2018). O fipronil está entre os principais inseticidas utilizados no cultivo de cana-de-açúcar no país. Sua classificação toxicológica é de classe II (altamente tóxico) e é caracterizado como um composto de contato e ingestão.

O fipronil foi desenvolvido entre os anos 1985 e 1987 (TINGLE et al., 2003), chegou ao mercado em 1993 como o primeiro fenilpirazol para controle de pragas (TOMLIN, 2000) e foi considerado um dos inseticidas mais bem-sucedidos por mais de uma década por ser altamente versátil, menos tóxico aos organismos não-alvos que os utilizados na época e por pertencer, naquele momento, a um novo grupo de pesticidas. Ele é um composto neurotóxico, atuando sobre os receptores GABA (ácido gama-aminobutírico) de insetos (COLE; NICHOLSON; CASIDA, 1993).

Com sua expansão mundial, diversos estudos ecotoxicológicos foram realizados e comprovaram sua toxicidade sobre inúmeros organismos não alvos, como genotoxicidade e interferência no crescimento radicular de plantas (AHEMAD; SAGHIR KHAN, 2011; YILDIRIM; AGAR, 2016; KARAISMAILOGLU, 2017); morte e redução de peso e crescimento de oligoquetas (QIN et al., 2015), atraso no desenvolvimento e comprometimento na reprodução de crustáceos (CHANDLER et al., 2004; GOFF et al., 2017); malformação corporal e lesão na atividade neural de insetos polinizadores (ROAT et

al., 2013; JACOB et al., 2015; SILVA et al., 2015); estresse oxidativo, alterações histopatológicas nas brânquias, encurtamento do eixo longitudinal e comprometimento da natação em peixes (STEHR et al., 2006; BEGGEL et al., 2010; CLASEN et al., 2012; EL-MURR; HAKIM; GHONIMI, 2015; WANG et al., 2016); genotoxicidade em embriões e redução de massa corporal em aves (CONCEIÇÃO; PROTTI, 2012; KITULAGODAGE et al., 2011; KITULAGODAGE; BUTTEMER; ASTHEIMER, 2011); e citotoxicidade em hepatócitos, genotoxicidade em células da amígdala palatina, estresse oxidativo e citotoxicidade em células dopaminérgicas e genotoxicidade em linfócitos de mamíferos (DAS et al., 2006; TISH et al., 2007; KI et al., 2012; ÇELIK et al., 2014).

Visto isto, um levantamento bibliográfico internacional foi apresentado nos últimos anos com o intuito de planejar a supressão progressiva em escala mundial ou, pelo menos, formular planos destinados a reduzir o uso de alguns agroquímicos no mundo, como o fipronil (BONMATIN et al., 2015; PISA et al., 2014; SIMON-DELSO et al., 2015; VAN DER SLUIJS et al., 2015; VAN LEXMOND et al., 2015).

Em paralelo ao contínuo esforço da comunidade científica em elucidar os danos do fipronil sobre os organismos, se encontra o desenvolvimento de resistência nos insetos alvos resultado por seu uso extensivo ao longo dos anos. Neste sentido, Arthur (2002) e Caboni et al. (2003) realizaram estudos sobre efetividade, metabolismo, fotodegradação e ação GABAérgica de um novo membro da família fenilpirazol, o ethiprole. Segundo os autores, apesar de apresentar menor lipofilicidade e menor toxicidade em ratos que o fipronil, o inseticida foi basicamente tão efetivo quanto seu análogo fipronil. Então, em 2010 foi produzido o Curbix®, composto comercial do ethiprole, que segundo o fabricante conta com três grandes diferenciais: rápido efeito de choque, além de pertencer a um novo grupo químico para controle de cigarrinhas (*Mahanarva fimbriolata*) – um dos principais insetos-praga da cana-de-açúcar.

Pouco se sabe sobre seus impactos sobre o meio ambiente, menos ainda quando se apresenta na forma de composto comercial, ou seja, uma mistura de ingrediente ativo e adjuvantes que lhe proporcionam maior solubilidade e o protegem da degradação de modo que, consequentemente, aumente sua meia-vida e melhore sua ação. Por isso, é evidente a importância de estudos sobre os potenciais danos ocasionados por inseticidas como o Curbix®, uma vez que, dependendo da exposição, todos os seres vivos estão sujeitos a seus efeitos deletérios e a seus diferentes componentes.

Para que se possa investigar a possibilidade de substituição de defensivos agrícolas sabidamente tóxicos aos organismos por alternativas mais seguras, são necessárias

ferramentas que deem uma resposta satisfatória e que mensurem seus efeitos nos organismos vivos. Para isso, plantas e animais têm sido utilizados como indicadores biológicos no intuito de determinar o grau de impacto que estes agentes possam causar no meio.

Bioensaios com plantas têm sido utilizados extensivamente ao longo de décadas, sendo estes bem estabelecidos e recomendados em estudos de ecotoxicologia (CHRISTOFOLETTI; PEDRO-ESCHER; FONTANETTI, 2013; GRANT, 1982; RODRÍGUEZ et al., 2015; SCHERER et al., 2019; SILVEIRA et al., 2017). Entre os testes de avaliação de agentes poluentes está o ensaio de germinação e crescimento de raiz. Diferentes espécies são utilizadas, dentre elas estão a alface (*Lactuca sativa*) e a cebola (*Allium cepa*). As análises consistem na exposição de suas sementes a um agente potencialmente tóxico e são observados parâmetros como número de sementes germinadas e alongamento de raiz (LEWIS, 1995). É um teste simples, rápido e confiável, além de ser recomendado para a avaliação do potencial fitotóxico de substâncias (ANDRADE-VIEIRA; PALMIERI; DAVIDE, 2017; BONCIU et al., 2018; VALERIO; GARCÍA; PEINADO, 2007).

Peixes também são ótimos bioindicadores na avaliação de agentes potencialmente tóxicos (ANSOAR-RODRÍGUEZ et al., 2015; CLASEN et al., 2012; FUZINATTO et al., 2013). A espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) possui amplo uso nas avaliações ecotoxicológicas (ARANA et al., 2017; CHRISTOFOLETTI; DAVID; FONTANETTI, 2009; EL-MURR; HAKIM; GHONIMI, 2015). O uso de biomarcadores morfológicos pode ser empregado em vários órgãos de peixes como a tilápia. Quando presente no fígado desses animais promove evidências qualitativas de alterações funcionais advindas da exposição aos contaminantes (FONTANETTI et al., 2011). Diferentes testes podem ser feitos, uma vez que as células hepáticas possuem diversas funções vitais como a metabolização de proteínas, lipídios e carboidratos, processamento e armazenamento dos nutrientes absorvidos no trato digestório, atuam na desintoxicação do organismo e na hematopoese durante a fase larval, além de estarem envolvidos na produção de anticorpos (VERLAG, 1982).

Do mesmo modo, biomarcadores moleculares são excelentes ferramentas para a detecção dos primeiros impactos de poluentes em peixes (BADGUJAR et al., 2016; CLASEN et al., 2018; HEGAZI; ATTIA; ASHOUR, 2010). Dentre os vários ensaios encontrados na literatura, estão a quantificação de peroxidação lipídica, imunomarcação de proteínas ligadas ao estresse celular e de fragmentação do DNA (MOREIRA-DE-SOUSA; SOUZA; FONTANETTI, 2018; REGOLI; GIULIANI, 2014; ROMERO et al., 2016). Esses marcadores são capazes de revelar o estresse oxidativo sofrido pela exposição à determinadas

substâncias, ou seja, o desequilíbrio no balanço redox onde a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por serem altamente reativas e inespecíficas, geralmente oxidam biomoléculas como lipídios, carboidratos, proteínas e DNA e, com isso, prejudicam as funções celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2008). Como outros organismos, os peixes possuem sistema de defesa que compreende processos enzimáticos e não enzimáticos para minimizar o dano celular, eliminando as EROs e as convertendo em espécies menos reativas (KAVIRAJ; GUPTA, 2014). Caso o sistema de defesa não seja suficientemente capaz de atuar na proteção da célula e garantir que o dano gerado pelo agente estressor não acarrete na morte celular, um grande gasto energético será necessário para, então, ativar a cascata apoptótica.

Diante do exposto acima e visando a importância do uso de defensivos agrícolas no cultivo, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, seus impactos na economia mundial e a crescente demanda do mercado por produtos que sejam menos prejudiciais ao meio ambiente, este projeto teve por objetivo investigar e comparar o potencial tóxico de diferentes concentrações dos inseticidas fipronil e ethiprole, por meio de diferentes biomarcadores presentes em plantas (*A. cepa* e *L. sativa*) e em peixes (*O. niloticus*).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fipronil

Em meados dos anos 1990, iniciou-se a busca por novos pesticidas que pudessem substituir os já massivamente usados no momento. Concomitantemente ao lançamento do imidacloprido, em 1993 anunciou-se o fipronil – primeiro composto fenilpirazol. Desenvolvido em 1987 por cientistas da Aventis (antiga Rhône-Poulenc) no Reino Unido (MULROONEY; GOLI, 1999), o fipronil seria "10, 20 ou até 30 vezes menos tóxico que os compostos atualmente presentes no mercado" (MOFFAT, 1993).

O fipronil é comercializado como ingrediente ativo em diversas formulações e tem uso liberado para várias culturas no Brasil, além de ser utilizado no controle de pragas domésticas, como baratas, mosquitos, pulgas, carrapatos e piolhos de cães, gatos e bovinos (AAJOUD; RAVANEL; TISSUT, 2003; CHATON et al., 2002; MYDLARZ; JONES; HARVELL, 2006).

A tabela 1 apresenta resumidamente as culturas em que o fipronil é usado, o modo de aplicação e o Limite Máximo de Resíduo (LMR) permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), ou seja, a quantidade máxima de resíduo de defensivo agrícola oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes (em peso) do defensivo agrícola por milhão de partes de alimento (em peso) (ppm ou mg/kg) permitido do inseticida nos produtos.

Tabela 1. Culturas, modalidade de aplicação e Limite Máximo de Resíduo (LMR) de fipronil permitidos no produto final da cultura no Brasil

Culturas	Modalidade de Aplicação	LMR (mg/kg)
Algodão	Foliar	0,01
Algodão	Sementes	0,01
Amendoim	Sementes	0,01
Arroz	Foliar	0,01
Arroz	Sementes	0,01
Batata	Solo	0,05
Cana-de-açúcar	Foliar	0,03
Cevada	Sementes	0,01
Eucalipto	Foliar	Uso não alimentar
Feijão	Sementes	0,01
Girassol	Sementes	0,01
Milho	Foliar	0,01
Milho	Solo	0,01
Pastagens	Sementes	0,10
Sorgo	Sementes	0,005
Soja	Foliar	0,01
Soja	Sementes	0,01
Trigo	Sementes	0,01

Fonte: ANVISA; LMR: Limite Máximo de Resíduo

O fipronil é uma molécula extremamente ativa e um potente desregulador do sistema nervoso central. A ação tóxica do fipronil é devido à sua capacidade de agir no receptor do ácido γ-aminobutírico (GABA) como um bloqueador não competitivo dos canais de cloreto, levando à morte do inseto por hiperexcitação neuronal e paralisia (ZHAO, 2004). Há três rotas principais de intoxicação por fipronil: oral, dérmica e inalação (FUNG et al., 2003; JENNINGS et al., 2002). Uma vez no sangue, o fipronil e os seus metabólitos são amplamente distribuídos, em particular nos tecidos adiposos, além de ter um elevado nível de recirculação entero-hepática (HAINZL; COLE; CASIDA, 1998; MOHAMED et al., 2004).

A molécula de fipronil é considerada de amplo espectro e de degradação lenta. Por consequência, os produtos da degradação (metabólitos) são mais tóxicos, mais persistentes e menos específicos aos receptores GABA que o composto original, como o fipronil sulfona, produto de sua metabolização no fígado e, o fipronil disulfinil, produto de sua fotodegradação (ROMERO et al., 2016; TINGLE et al., 2003).

Tanto o fipronil como seu metabólito sulfona podem induzir a morte celular em células HepG2 e em hepatócitos humanos (DAS et al., 2006). Vários efeitos adversos do fipronil já foram relatados. De Oliveira et al. (2012) observaram que esse inseticida pode ser

genotóxico e mutagênico em camundongos quando administrado em doses elevadas (50 mg/kg). Terçariol e Godinho (2011) verificaram que, após exposição cutânea de ratos ao fipronil (70, 140 e 280 mg/kg), os animais apresentaram efeitos no comportamento, relacionados principalmente à emotividade, medo e à atividade exploratória. No fígado, estes animais expostos ao fipronil apresentaram alterações ultraestruturais significativas em células hepáticas, como desorganização celular, esteatose hepática, morte celular e aumento das células de Kupffer, sugerindo um aumento da atividade fagocítica do fígado nos animais expostos (DE OLIVEIRA et al., 2012b; FERREIRA et al., 2012).

Além desses efeitos, o fipronil e seus metabólitos têm sido listados como possíveis desreguladores endócrinos (GOFF et al., 2017; OHI, 2004). Hurley et al. (1998) verificaram que o fipronil é capaz de induzir câncer de tireoide em ratos, devido provavelmente a sua capacidade de aumentar o metabolismo dos hormônios tireoidianos e a excreção hepática. Essa alteração parece ser mediada pelo aumento na taxa de eliminação de T4 (tiroxina), devido à maior atividade de enzimas hepáticas (LEGHAIT et al., 2009). Em peixes, animais em estágio embrionário expostos ao fipronil apresentaram curvatura da cauda no seu desenvolvimento corporal. Os autores sugeriram que esse crescimento assimétrico do músculo possa estar relacionado ao aumento da expressão de titina e teletonina, responsáveis pelo desenvolvimento muscular (WAGNER et al., 2017).

Assim como muitos estudos demonstraram a ação do fipronil e de seus metabólitos, também foi comprovada a sua toxicidade quando apresentado como ingrediente ativo em formulações comerciais (TINGLE et al., 2003). Estudo dos efeitos do Frontline® sobre a reprodução de ratos Wistar pôde comprovar que o composto comercial com fipronil altera o sistema endócrino e causa efeitos reprodutivos adversos em ratos fêmeas (OHI, 2004). No mesmo sentido, Margarido et al. (2013) investigaram a influência do Regent® sobre diferentes estágios de desenvolvimento de girinos da espécie *Scinax fuscovarius*; os autores observaram que a exposição dos girinos ao Regent® acarretou no aumento do estresse oxidativo nos animais. Em sequência, Šefčíková et al. (2018) verificaram que o Fipron spot-on®, também afetou o desenvolvimento de células embrionárias de camundongo.

2.2. Ethiprole

O ethiprole também é caracterizado pelo fabricante como um inseticida de contato e ingestão; no entanto, possui classificação toxicológica inferior ao seu análogo fipronil, classe III (medianamente tóxico). Este composto tem sido largamente utilizado em monoculturas como cana-de-açúcar e arroz e comercializado como um inseticida foliar, de solo ou ainda

para o uso do tratamento de sementes (ARTHUR, 2002). Ele é efetivo quando utilizado em manejo integrado de pragas em culturas de arroz, sendo seguro para os predadores utilizados no controle biológico das pragas (KUMARAN et al., 2009; ZHAO et al., 2012).

Como apresentado anteriormente a respeito de seu análogo fipronil, a tabela 2 expõe as culturas nas quais o uso do ethiprole é autorizado, o modo de aplicação e o Limite Máximo de Resíduo (LMR) permitido pela ANVISA. Segundo esta agência, os LMRs referem-se à soma de ethiprole e seus metabólitos 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-(ethylsulfonyl)-pyrazole-3-carbonitrile (RPA 097973) e 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-(ethylsulfonyl)-pyrazole-3-carboxamide (RPA 112916).

Tabela 2. Culturas, modalidade de aplicação e Limite Máximo de Resíduo (LMR) de ethiprole permitidos no produto final da cultura no Brasil

Culturas	Modalidade de Aplicação	LMR (mg/kg)
Algodão	Foliar	0,2
Arroz	Foliar	0,005
Café	Foliar	0,1
Cana-de-açúcar	Foliar	0,005

Fonte: ANVISA; LMR: Limite Máximo de Resíduo

Este inseticida foi produzido a partir da molécula fipronil, por meio da substituição do radical trifluorometil-sulfinil, presente no fipronil, pelo grupo etil-sulfinil presente em sua estrutura (figura 1) (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003). Essa modificação conferiu ao ethiprole redução de toxicidade às células de mamíferos devido a diminuição de lipofilicidade em relação ao fipronil (VIDAU et al., 2009).

Poucos estudos investigaram os efeitos do ethiprole nos organismos. Segundo Vidau et al. (2009), o ethiprole não foi citotóxico em células epiteliais humanas. No entanto, novos estudos têm observado que o ethiprole pode interferir na polinização e no comportamento do forrageamento de abelhas (*Apis mellifera*) (SHARMA; ABROL, 2014), bem como nos parâmetros neurocomportamentais de ratos CD1 (TANAKA; INOMATA, 2017; TANAKA; SUZUKI; INOMATA, 2018).

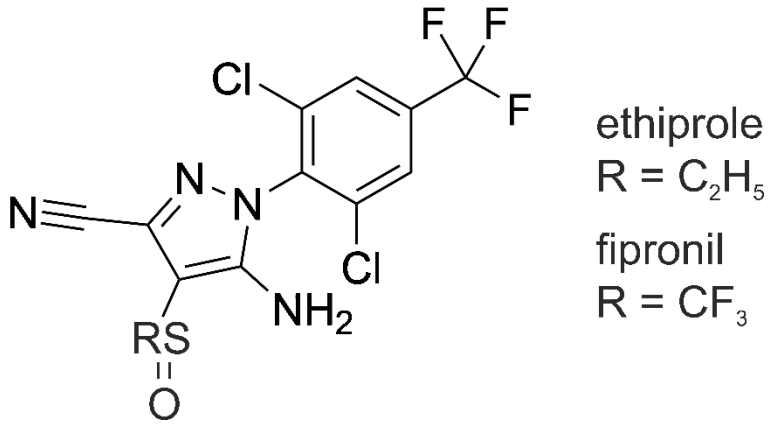

Figura 1. Estruturas do ethiprole (R = C_2H_5) e do fipronil (R = CF_3)

Em 2010 iniciou-se a comercialização do Curbix®, composto comercial do ethiprole, que segundo o fabricante conta com três grandes diferenciais: rápido efeito de choque, manutenção dos níveis de infestação da praga, além de pertencer a um novo grupo químico para controle de cigarrinhas (*Mahanarva fimbriolata*). Guedes e Fontanetti (2014) realizaram estudos sobre os efeitos desse composto comercial. As autoras puderam verificar que o Curbix®, mesmo em concentrações residuais, induz alterações na morfologia nuclear dos eritrócitos de tilápias (*Oreochromis niloticus*), assim como acarreta aberrações cromossômicas e distúrbios mitóticos em raízes de cebola (GUEDES, 2015).

2.3. Bioindicadores e ferramentas biomarcadoras em estudos ecotoxicológicos

O uso de bioindicadores para avaliar o impacto de certas substâncias é crucial em estudos com o objetivo de avaliar o efeito de poluentes em organismos vivos. Várias ferramentas podem ser associadas aos bioindicadores para avaliação de amostras ambientais ou de produtos químicos.

2.3.1. Plantas como bioindicadores e ferramentas utilizadas

As plantas estão entre os modelos disponíveis recomendados por órgãos ambientais, como *International Program em Plant Bioassays* (IPPB), *International Organizaton for Standardization* (ISO), *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) e *US Environmental Protection Agency* (USEPA), para investigar a atividade potencialmente tóxica de produtos lançados no meio ambiente (GRANT, 1982).

Além da vantagem de utilização quanto à abordagem ética, elas se encontram na base da cadeia alimentar e podem responder mais rapidamente à substâncias tóxicas que organismos em níveis tróficos mais altos, são passíveis de bioensaios mais simples

comparados a outras análises ambientais e, ainda, apresentam uma ampla variedade de biomarcadores a serem avaliados (DE SOUZA; GUEDES; FONTANETTI, 2016; FISKESJÖ, 1985). Diferentes plantas tem sido usadas como bioindicadores, tais como *L. sativa* (SILVEIRA et al., 2017)*, A. cepa* (BONCIU et al., 2018), *Tradescantia* sp (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011), *Vicia faba* (YILDIRIM; AGAR, 2016), *Zea mays*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris*, entre outros (DE SOUZA; GUEDES; FONTANETTI, 2016).

A cebola (*A. cepa*) tem sido amplamente utilizada em estudos de avaliação de poluentes ambientais devido a sua sensibilidade de 82% comparada aos modelos animais. São possíveis inúmeras análises nesta espécie. Essa espécie apresenta poucos cromossomos (2n = 16) e de fácil visualização ao microscópio, permitindo a identificação de alterações cromossômicas decorrentes da exposição a agentes tóxicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A alface (*L. sativa*; 2n=18) também recebe destaque entre as espécies utilizadas como bioindicadores, principalmente em estudos ecológicos e de toxicidade de diferentes substâncias (SILVEIRA et al., 2017). Devido à sua rápida germinação, uniformidade e sensibilidade, essa espécie é um excelente bioindicador em estudos de efeitos alelopáticos (TIGRE et al., 2012).

Diferentes estudos podem ser desenvolvidos com as duas espécies. Além disso, o uso de mais de um organismo para avaliar a toxicidade de poluentes ambientais é importante, pois esses dados biológicos podem caracterizar melhor os potenciais efeitos tóxicos de determinadas substâncias.

Dentre as análises microscópicas, estão os testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Essas avaliações permitem estabelecer o mecanismo de ação de uma substância ou composto no material genético. A ação de determinados produtos pode ser definida como aneugênica (resulta em aberrações cromossômicas numéricas) ou clastogênica (relacionado à indução de quebras cromossômicas) (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Além dos testes microscópicos citados acima, testes macroscópicos podem ser usados para verificar o potencial fitotóxico de poluentes por meio de análises das fases iniciais do desenvolvimento da semente, como a germinação e o crescimento radicular, uma vez que, dependendo do modo de aplicação, a raiz pode ser o primeiro órgão do vegetal ao entrar em contato com as substâncias tóxicas (VALERIO; GARCÍA; PEINADO, 2007).

Utilizar a germinação de sementes expostas a contaminantes como ferramenta biomarcadora é uma boa abordagem para entender os mecanismos tóxicos dos contaminantes

ambientais para as plantas (LIU et al., 2012), uma vez que a germinação é uma fase importante no ciclo de desenvolvimento vegetativo (RAHOUI; CHAOUI; FERJANI, 2008). Além disso, segundo Sobrero e Ronco (2004), por meio da inibição da germinação pode ser verificado o efeito letal do poluente ao organismo exposto. Outro parâmetro interessante a ser analisado é o alongamento (ou crescimento) das raízes. Esse parâmetro traz informações de possíveis efeitos subletais do poluente, pois apesar de não acarretar à inibição da germinação, o agente pode agir retardando o alongamento radicular (SOBRERO; RONCO, 2004).

2.3.2. Peixes como bioindicadores e ferramentas utilizadas

Os peixes representam um importante bioindicador de contaminação aquática. Dentre as vantagens de sua utilização em estudos ecotoxicológicos, está o fato de eles poderem estar no último nível da cadeia alimentar no ambiente aquático, sendo diretamente afetados pelos produtores ou os consumidores inferiores e, assim, refletir o estado de todo o ecossistema (ARANA et al., 2017). Além disso, os peixes acumulam substâncias químicas por exposição direta aos poluentes presentes na água dos rios e mares (ATEEQ et al., 2002).

Por serem facilmente expostos a substâncias tóxicas de maneira similar a outros vertebrados superiores, os peixes têm sido extensamente usados na investigação de substâncias que tenham o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos (HARSHBARGER; CLARK, 1990).

A espécie *O. niloticus* (tilápia do Nilo) está entre os peixes com maior importância dentro da aquicultura mundial, perdendo apenas para a cultura de carpas e salmonídeos (AL-SHAMSI; HAMZA; EL-SAYED, 2006; MOUSA; MOUSA, 1999). Ela é originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África e pertence à família Cichlidae (CARVALHO et al., 2006; SANTOS, 1977). Sua capacidade em obter um ótimo desenvolvimento em grandes concentrações populacionais, diminuindo o custo de manutenção per capita, a torna um bom modelo para estudos ecotoxicológicos (PONCE-MARBÁN; HERNÁNDEZ; GASCA-LEYVA, 2006). Diferentes biomarcadores podem ser avaliados em tilápias, como alterações fisiológicas ou de outra natureza, seja nos tecidos ou fluidos corporais, que podem ser associados a um comprometimento de sua saúde ou uma possível doença.

O fígado é um órgão metabolizador de todas as substâncias que vem pela via sanguínea. Em peixes, apresenta hepatócitos grandes, com forma poliédrica, dispostos como túbulos em forma piramidal com suas bases dirigidas para os sinusóides. Os núcleos são redondos bem definidos com um nucléolo característico. Além disso, as células são

intercaladas por sinusóides, nos quais se pode observar os eritrócitos (HAMPTON et al., 1988; HOCHSTEIN; JAIN, 1981a).

Este órgão desempenha um papel chave na desintoxicação xenobiótica por meio da oxidação, redução, conjugação e reações de hidrólise que fazem o armazenamento ou a excreção de toxinas (MAKSYMIV et al., 2015). A utilização de órgãos como o fígado é apropriada para se investigar alterações em nível tecidual, celular e fisiológico (VAN DER VOET; LIFSET; LUO, 2010).

As alterações histológicas são ferramentas úteis para avaliações das relações entre danos em peixes e poluição ambiental, atuando como bons marcadores de estresses ambientais (MAHROUS et al., 2015; VAN DYK; COCHRANE; WAGENAAR, 2012). Para as análises destas alterações histológicas, pode ser utilizado um protocolo semi-quantitativo que oferece informações importantes sobre a funcionalidade do tecido, tendo em conta os diferentes tipos de alterações, frequência e o fator de importância delas (BERNET et al., 1999; MARINHO et al., 2014).

Além das análises morfológicas, parâmetros bioquímicos podem ser utilizados como biomarcadores, os quais oferecem informações importantes dos possíveis riscos, em seu estágio inicial, que os organismos expostos a contaminantes ambientais podem apresentar (ARANA et al., 2017).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, desta forma, os radicais livres podem ser produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2008).

A peroxidação lipídica pode liberar ácidos graxos não saturados, por meio da ação das espécies reativas ao oxigênio (EROs) na desintegração dos fosfolipídios, resultando em vários processos como a ruptura das membranas celulares, a mutação do DNA, a oxidação de lipídios insaturados, o comprometimento dos componentes da matriz extracelular, proteoglicanos, colágeno e elastina e o aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) (HALLIWELL; GUTTERDIGE, 2015).

O MDA é um dos intermediários mais importantes e o aldeído individual mais abundante produzido durante a peroxidação lipídica. Este aldeído é conhecido por sua capacidade de causar reticulação e polimerização de macromoléculas, além de interagir com o DNA (HOCHSTEIN; JAIN, 1981b). Por ser reativo ao ácido tiobarbitúrico (TBA), existem métodos de quantificação de MDA baseado no produto da união do MDA com o TBA,

substâncias conhecidas por TBARS (*Thiobarbituric Acid-Reactive Substances*) (BUEGE; AUST, 1978).

Outra ferramenta que se pode utilizar em estudos de avaliação ambiental com peixes é a presença de proteínas ligadas ao estresse por meio de imunomarcações. Em condições normais, as proteínas HSP (*Heat Shock Proteins*) auxiliam no correto dobramento das proteínas recém-formadas, garantindo que possuam a configuração adequada para realizar suas tarefas no ciclo celular. O aumento na síntese dessas proteínas foi inicialmente relacionado às respostas de choque térmico; no entanto, demonstrou-se que as HSPs podem se envolver em uma ampla lista de tarefas e serem usadas como marcadores de avaliação de poluição e contaminação ambiental (MOREIRA-DE-SOUSA; SOUZA; FONTANETTI, 2018).

A HSP70 é uma chaperona molecular efetiva, desempenhando um papel na proteção celular de danos em resposta a estímulos de estresse (PADMINI; USHA RANI, 2008). Os níveis de expressão do seu gene em peixes tendem a aumentar quando expostos à poluentes. Exemplo disso é a verificação no aumento da HSP70 em organismos expostos à poluentes ambientais (ANSOAR-RODRÍGUEZ et al., 2016; COELHO et al., 2018).

Além de ferramentas que avaliem o estresse causado por agentes tóxicos por meio da morfologia, da quantificação de peroxidação lipídica e da presença de proteínas de estresse são necessárias ferramentas que identifiquem quando o dano excede a capacidade de reparo ao DNA, fazendo com que as lesões possam culminar em morte celular ou em mutações no genoma (COSTA, 2003; EVANS; COOKE, 2004).

A morte celular programada promove balanço da divisão celular e confere o equilíbrio celular dos tecidos (WYLLIE, 1997), além de participar do processo de remoção de células afetadas por exposição a agentes nocivos (SALMENA, 2003). No processo de apoptose uma série de eventos ocorre, dentre eles a quebra de DNA e a condensação cromatínica, porém, a quebra de DNA é um evento que ocorre logo no início do processo de apoptose, enquanto que a condensação ocorre no final desse processo (LOCKSHIN; ZAKERI, 1990). A reação de TUNEL (*Transferase terminal de deoxinucleotídeos Biotina-dUTP Nick End Labeling*) é uma boa ferramenta para a detecção de pequenos fragmentos de DNA (~50 pares de base) gerados pelo aumento da atividade de endonucleases durante o programa apoptótico (ENARI et al., 1998; SAKAHIRA; ENARI; NAGATA, 1998). Essa ferramenta tem sido considerada um método eficaz na detecção de corpos apoptóticos em fígado (CHOI et al., 2010; LOGHMAN, 2012; TAS et al., 2013).

3. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo geral realizar um estudo comparativo quanto a toxicidade de dois inseticidas comerciais a base de ethiprole e fipronil em diferentes organismos não alvos, mesmo em doses residuais, a fim de determinar se o ethiprole, juntamente com os adjuvantes presentes na formulação comercial, é uma alternativa segura ao fipronil.

Os objetivos específicos consistiram em:

- Investigar se os inseticidas teriam efeitos letais sobre as espécies *A. cepa* e *L. sativa*.
- Verificar quais os efeitos subletais que os inseticidas poderiam gerar no desenvolvimento inicial de *A. cepa* e *L. sativa.*
- Analisar histologicamente as possíveis alterações morfológicas no fígado de *O. niloticus* após exposição dos peixes aos inseticidas.
- Observar se os inseticidas influenciariam a atividade enzimática e a peroxidação lipídica em *O. niloticus.*
- Verificar o estresse celular causado pelos inseticidas em *O. niloticus* por meio da aplicação da técnica de imunomarcação de HSP70.
- Avaliar o efeito citotóxico dos inseticidas em hepatócitos de *O. niloticus* por meio do teste de morte celular (TUNEL).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais biológicos

Para os testes de fitotoxicidade foram utilizadas sementes de *L. sativa* variedade *capitata* (alface), marca Isla, lote 117023-001-52, e de *A. cepa* variedade baia periforme (cebola), marca Isla, lote 117182-009-52.

Para os testes de toxicidade foram usados peixes da espécie *O. niloticus* (Perciformes, Cichlidae), popularmente conhecidos como tilápia do Nilo, obtidas da Piscicultura Santa Cândida, Santa Cruz da Conceição, São Paulo, Brasil. Para evitar diferenças intraespecíficas foram selecionados indivíduos com 10 centímetros de tamanho médio. Os indivíduos passaram por 15 dias de aclimatação em tanques com sistema de filtração, aeração suplementar e temperatura controlada (22ºC±1) e mantidos sob alimentação diária com ração comercial para peixes (Laguna – Ocialis) por até 24 horas antes da montagem do bioensaio.

O experimento com peixes foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da UNESP- Rio Claro, São Paulo, sob protocolo nº 8214 de 30.09.2015 e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 1676.899 de 15 de julho de 2009.

4.2. Inseticidas

Os inseticidas Curbix® 200 SC e Regent® 800 WG foram obtidos por meio de representantes comerciais e estocados em local seco e escuro. Para realização dos bioensaios, os compostos comerciais foram diluídos em água mineral (pH 8,0; 13,40 mg/L de cálcio; 3,93 mg/L de potássio; 0,03 mg/L de nitrato; 35,20 mg/L de sódio) a fim de alcançar as concentrações desejadas para cada teste realizado. As concentrações foram estipuladas a partir de duas premissas: (1) Doses mínimas indicadas para uso em plantios novos de cana-de-açúcar pelos fabricantes dos inseticidas, no qual o ethiprole encontra-se à 10mM e o fipronil à 1,22mM; (2) CL_{50} fipronil para *O. niloticus* em 96 horas de exposição: 0,042 mg/L (USEPA, 2011). Buscamos simular as condições nas quais os organismos bioindicadores aqui escolhidos poderiam sofrer no meio ambiente mesmo que, em alguns casos, fossem legalmente permitidas e consideravelmente baixas. Dessa forma, as diluições de ambos os inseticidas utilizadas nos bioensaios estão demonstradas na tabela 3.

Tabela 3. Concentrações dos compostos comerciais e seus respectivos ingredientes ativos utilizados nos bioensaios realizados neste projeto

	Bioensaio com *A. cepa* e *L. sativa*		Bioensaio com *O. niloticus*	
	Composto	Ingrediente ativo	Composto	Ingrediente ativo
Regent®	1000 mg/L	2,28 mM	0,04 mg/L	0,061 µM
	667 mg/L*	1,22 mM	0,02 mg/L	0,036 µM
	100 mg/L	228,8 µM	0,005 mg/L	0,01 µM
	10 mg/L	22,88 µM		
	1 mg/L	2,28 µM		
	0,1 mg/L	0,228 µM		
	0,05 mg/L	0,114 µM		
	0,025 mg/L	0,057 µM		
Curbix®	20 mL/L*	10mM	0,08 µL/L	0,037 µM
	1000 µL/L	500 µM	0,04 µL/L	0,023 µM
	100 µL/L	50 µM	0,02 µL/L	0,011 µM
	10 µL/L	5 µM		
	1 µL/L	0,5 µM		
	0,1 µL/L	0,05 µM		
	0,05 µL/L	0,025 µM		
	0,025 µL/L	0,0125 µM		

* Diluição pronta para aplicação em campo a partir de dose mínima indicada pelo fabricante para uso em plantios novos de cana-de-açúcar.

4.3. Bioensaio com *A. cepa* e *L. sativa*

4.3.1. Montagem do bioensaio

As sementes foram dispostas em placas de Petri com 9 cm de diâmetro contendo papel filtro impregnado com 4 mL de água como controle negativo – C(–), sulfato de zinco heptaidratado (0,05 M) como controle positivo – C(+) e diferentes soluções dos compostos estudados apresentadas na tabela 2. As placas foram mantidas de forma aleatória sob temperatura controlada de 22ºC±1, sem fotoperíodo, em incubadora BOD (Demanda bioquímica de oxigênio). Cada modelo experimental contou com cinco réplicas com 30 sementes cada. As sementes foram expostas diretamente às soluções por um período de 120 horas.

4.3.2. Análises de fitotoxicidade

A metodologia utilizada para as análises de fitotoxicidade foi recomendada por Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) (1996) e Torres (2003).

4.3.2.1. Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação

Durante o bioensaio foi observado o número de sementes germinadas nos períodos de 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas para *L. sativa* e 24, 32, 40, 56, 64, 72, 80, 88 e 96 horas para *A. cepa.* A partir dos dados obtidos foi calculado o índice de velocidade de germinação (IVG), por meio da fórmula $(N1\times1)+(N2-N1)\times1/2+(N3-N2)\times1/3+...(Ny-(Ny-1))\times1/y$, onde Ny corresponde ao número de sementes germinadas em um dado período e y representa ao número total da avaliação de *time-points* (PALMIERI et al., 2014). Ao final das 120 horas, foram contabilizadas as sementes germinadas. Para determinação da porcentagem de germinação das sementes foi utilizada a fórmula: total de sementes germinadas/total de sementes por tratamento x 100.

4.3.2.2.Alongamento radicular e taxa de fitotoxicidade

Ao término da exposição, as placas foram mantidas por 48 horas em freezer -20ºC para posterior medição. Então, foram fotografadas e cada semente germinada foi medida por meio do programa de processamento de imagens ImageJ. A taxa de fitotoxicidade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula adaptada de Chou e Lin (1976) e Chou et al. (1981): [(média do comprimento do C(–) - média comprimento do tratamento)/(média do comprimento das raízes do C(–))] x 100.

4.4. Bioensaio com *O. niloticus*

4.4.1. Análises físico-químicas

Foram realizadas, por Bioagri Laboratórios LTDA – Mérieux NutriSciences, análises físico-químicas das águas contendo as diferentes concentrações dos inseticidas estudados nos quais os peixes foram expostos. A amostragem foi realizada conforme os seguintes métodos: pH: SMWW, 22ª Edição, 2012 - Método 4500H+ B; Metais (ICP-MS): Det.: SMWW, 22ª Edição, 2012, Método 3125 B / Preparo: EPA 3010 A: 1992 e EPA 3005: 1992; fipronil e ethiprole: POP PA 076 - Rev. 15. Além da concentração de cada inseticida nos aquários, foram determinados parâmetros como: pH e metais totais. As amostras de água foram coletadas no início do experimento e no final, decorridas as 96 horas de bioensaio.

4.4.2. Montagem do bioensaio

Peixes (n=70) de comprimento médio de 10 cm foram distribuídos aleatoriamente em 14 aquários de 40 L, sendo divididos em: controle, contendo água de poço artesiano; três diferentes concentrações de Regent® e três diferentes concentrações de Curbix®, apresentadas na tabela 2. Em cada aquário foram colocados cinco peixes. O bioensaio durou um período de 96 horas, em sistema estático com aeração contínua – sem renovação de água, com temperatura (22ºC±1) e pH dos tanques controlados. Os peixes foram mantidos em jejum durante o bioensaio. Para a coleta do fígado, os espécimes foram anestesiados com benzocaína, eutanasiados e dissecados. Para as análises moleculares, os órgãos foram retirados, lavados em solução salina e congelados imediatamente a -80ºC até serem processados para uso. Para a análise histológica, o fígado foi fixado em solução Bouin ou paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas; em seguida, os materiais foram mergulhados em tampão fosfato de sódio pH=7,4 e mantidos em geladeira.

4.4.3. Análise de peroxidação lipídica

4.4.3.1. Preparação das amostras

Foram elegidos aleatoriamente três animais de cada tratamento para a aplicação das ferramentas moleculares. O tecido hepático foi primeiramente pesado e, então, homogeneizado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas em 1000 rpm à 4ºC. O sobrenadante foi congelado em freezer -80ºC para a realização das técnicas. As técnicas foram aplicadas individualmente nos animais de cada tratamento, bem como os testes estatísticos e, então, a média e desvio padrão foram obtidos para apresentação dos dados.

4.4.3.2. Quantificação da concentração de proteínas totais

Para a determinação de proteínas totais, uma curva de calibração foi pré-estabelecida a partir de diferentes concentrações de albumina 22%. A dosagem de proteínas foi realizada por meio do método de Bradford (1976). As absorbâncias, obtidas à 595 nm, foram inseridas na equação da reta, o que permitiu a determinação da concentração de proteína para o fígado dos animais expostos aos tratamentos.

4.4.3.3. Determinação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A quantificação da peroxidação lipídica foi realizada por meio do *TBARS Assay Kit* (*Cayman Chemical*), respeitando-se as orientações do fabricante. O malondialdeído (MDA) foi utilizado como indicador de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica foi determinada pela medida da quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas durante a decomposição de hidroperóxidos lipídicos, a maioria formada a partir de MDA. A absorbância foi mensurada colorimetricamente à 532 nm usando um leitor de microplacas. O conteúdo de MDA foi calculado para cada amostra a partir de uma curva padrão.

4.4.4. Imunomarcação da HSP70 (*Heat Shock Proteins*)

Para aplicação da técnica, os órgãos sofreram desidratação em série crescente de álcool à 4ºC (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100%) durante 20 minutos cada banho. Em seguida, passou por banhos de xilol + álcool, xilol (I) e (II) por mais 20 minutos cada. Após isso, os materiais foram embebidos e incluídos em parafina líquida (Paraplast). Secções de 4µm de espessura foram cortadas em série com o auxílio de um micrótomo e recolhidas em lâminas. A técnica foi realizada segundo o protocolo adaptado proposto por Silva-Zacarin et al. (2012). Primeiramente, as lâminas foram desparafinizadas em soluções de xilol, xilol+álcool e álcool absoluto por 10 minutos cada e, então, gradualmente reidratadas em série decrescente de álcool (95, 80, 70, 50%) e água destilada. As secções foram permeabilizadas com Triton X-100 para garantir o livre acesso do anticorpo ao seu antígeno e, em seguida, lavadas com PBS. Para a imunomarcação da HSP70, foram utilizados o anticorpo primário monoclonal *anti heat shock protein 70* - HSP70 (Sigma-Aldrich) e o anticorpo secundário *anti mouse IgG* molécula inteira conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), incubados em câmara úmida a 37ºC, após etapa de bloqueio dos sítios inespecíficos para ligação com os respectivos anticorpos. Para a revelação da imunomarcação foi utilizado o *kit EnVision (Dako™) G|2 System/AP Rabbit/Mouse (Permanent Red)*. Nas lâminas para controle da técnica, o anticorpo primário foi omitido e não houve marcações, atestando a eficiência da detecção imuno-histoquímica de HSP70 nas demais lâminas. Os resultados obtidos foram fotografados em fotomicroscópio por meio do programa de captura de imagens Leica Qwin Standard v.28 e analisados por meio do software ImageJ, que forneceu a porcentagem de área imunomarcada intensamente detectada em relação à área total do material analisado em cada secção histológica. Considera-se marcação positiva quando se observa uma cor vermelho-rosada representada pela deposição do cromógeno nos sítios de ligação antígeno-anticorpo, podendo ser de intensidade maior ou menor conforme a

quantidade de proteínas da família HSP70 presente nas células e negativa quando não se observa qualquer marcação nesta coloração.

4.4.5. Aplicação do método TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)

A aplicação do método TUNEL foi realizada por meio do *In situ Cell Death Detection Kit*. Primeiramente, os materiais foram incluídos em agarose e, posteriormente, seccionados em vibrátomo. Os cortes foram recobertos com solução de proteinase K (20 µg/mL em 10Mm Tris-HCl, pH 7,5) por 30 minutos, à 60°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, quatro vezes por 2 minutos. Depois disso, foi adicionada a solução de TUNEL sobre as secções histológicas tratadas, enquanto que a lâmina com o controle da técnica recebeu solução sem a enzima. As secções foram mantidas em câmara úmida por 60 minutos a 37ºC e depois lavadas em PBS, três vezes por 2 minutos. As lâminas foram montadas com o meio de montagem Prolong Gold. Para a realização desta técnica foram feitos controles positivo e negativo. No controle positivo, foi adicionada a DNase, para que houvesse a quebra "forçada" do DNA e ocorresse marcação. Já no controle negativo, foi adicionado apenas o anticorpo, sem a enzima, a fim de testar o kit e verificar sua viabilidade e funcionalidade. A análise das lâminas foi realizada por meio de um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5 II). A aquisição das imagens foi feita por meio do software Leica Application Suite-AF. Todos os materiais foram fotografados com os mesmos parâmetros, sendo eles Smart Gain: 850 V; Smart Offset: (-1); Pinholi: 67.9 µm; Line: 8; Frame: 2; Resolução: 1024x1024; Velocidade: 40Hz; Lazer 10% Standy; Número de steps: 5 e Z-volume = 50 µm.

4.4.6. Histologia

Os materiais coletados foram desidratados em série alcoólica por 20 minutos cada concentração (15%, 25%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), colocados em resina de embebição por no mínimo 24 horas e, finalmente, incluídos em resina contendo catalisador. Após polimerização, os blocos foram seccionados com espessura de até 4 µm, com auxílio de micrótomo. Os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina de acordo com Junqueira e Junqueira (1983). As lâminas foram mergulhadas em hematoxilina de Harris por 6 minutos e, então, colocadas em água por 4 minutos para que a reação ocorra. Logo em seguida, as lâminas foram mergulhadas em eosina aquosa por 5 minutos, lavadas com água corrente, secas e

montadas com bálsamo do Canadá. Duas lâminas com oito secções foram analisadas para cada peixe, com n = 5 para cada tratamento.

A descrição e a avaliação das alterações histológicas foram baseadas nos protocolos de Bernet et al. (1999) e Marinho et al. (2014). Fatores de importância (*w*) foram determinados para cada lesão, com base em sua importância patológica, de acordo com a forma como ela afeta a função do órgão e a sobrevivência dos peixes. As alterações foram previamente classificadas em três fatores de importância: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível com o fim da exposição ao toxicante, (2) importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos, quando o estressor é neutralizado e (3) alta importância patológica, a lesão geralmente é irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão. As alterações histopatológicas também foram pontuadas (*a*) em uma escala de 0 a 6, dependendo do nível e extensão da alteração, como segue: (0) nenhuma ocorrência, (2) ocorrência leve, (4) ocorrência moderada e (6) ocorrência severa. Além disso, valores intermediários também foram incluídos. O índice de alteração foi calculado multiplicando-se o fator de importância pelo escore. O índice total de cada indivíduo, correspondente à avaliação das alterações histopatológicas no fígado de cada animal examinado, foi calculado como: $\mathbf{Índice_{ind} = \sum (\mathit{w} \times \mathit{a})}$

4.5. Análises estatísticas

Todas as avaliações realizadas neste trabalho sofreram análise de variância (p= 0.05). A normalidade e a homogeneidade dos dados foram analisadas a partir dos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. O teste estatístico ANOVA com *post hoc* Dunnett foi aplicado quando a distribuição foi normal e homogênea. Caso contrário, aplicou-se o teste Kruskal Wallis. As análises foram performadas no software IBM SPSS statistics 25.

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de artigos científicos.

- ARTIGO 1: Fitotoxicidade de formulações comerciais a base de fenilpirazóis sobre o desenvolvimento inicial dos bioindicadores vegetais *A. cepa* e *L. sativa*

- ARTIGO 2: Diluições residuais de dois inseticidas contendo fipronil e ethiprole induzem estresse oxidativo em peixes

- ARTIGO 3: Ação citoprotetora e antiapoptótica da proteína de estresse HSP70 em *Oreochromis niloticus* expostos a diluições residuais de inseticidas com fipronil e ethiprole

  - Artigo submetido em *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wast*

ARTIGO 1

Fitotoxicidade de formulações comerciais a base de fenilpirazóis sobre o desenvolvimento inicial dos bioindicadores vegetais *A. cepa* e *L. sativa*

Thays de A. Guedes [a]; Raphael Bastão de Souza [b]; Carmem Silvia Fontanetti [a]

[a]*UNESP (São Paulo State University) Instituto de Biociências, Rio Claro, São Paulo, Brazil.*

[b]*Escola de Engenharia Civil, Arquitetura e Design Urbano, Universidade de Campinas, Campinas, Brasil.*

RESUMO

O fipronil é um composto neurotóxico que atua sobre os receptores GABA (ácido gama-aminobutírico) de insetos. Foi considerado um dos inseticidas mais bem-sucedidos por mais de uma década. Sua toxicidade em diversos organismos não alvos levou a produção de um novo membro da família fenilpirazol com rápido efeito de choque, o ethiprole. Neste interim, pouco se sabe sobre seus impactos sobre o meio ambiente, menos ainda quando se apresenta na forma de composto comercial. Diferentes espécies podem ser utilizadas para investigar os efeitos dos inseticidas em plantas, dentre elas estão a alface (*Lactuca sativa*) e a cebola (*Allium cepa*). Desta forma, este estudo almejou investigar os efeitos de diferentes concentrações dos inseticidas Curbix® 200 SC e Regent® 800 WG, formulações comerciais contendo ethiprole e fipronil, respectivamente, sobre o desenvolvimento inicial das espécies *L. sativa* e *A. cepa*. Os testes em *A. cepa* demonstraram que o Curbix® induziu a redução na porcentagem de germinação, no índice de velocidade de germinação (IVG) e no alongamento das raízes expostas às maiores concentrações. Em *L. sativa*, as concentrações residuais de ambos os inseticidas estimularam a velocidade em que as sementes germinaram, bem como o alongamento das mesmas. Os resultados apresentados evidenciam que o Curbix® não demonstrou ser uma alternativa mais segura ao Regent® sobre os bioindicadores utilizados.

Palavras-chave: ethiprole, fipronil, *Allium cepa*, *Lactuca sativa*

1. INTRODUÇÃO

O monitoramento dos impactos ecológicos dos pesticidas é uma necessidade global, especialmente quando se considera o seu aumento em uso, demanda e liberação legal no meio ambiente (KOHLER; TRIEBSKORN, 2013). Estudos demonstram que o uso de pesticidas sistêmicos como o fipronil têm contaminado os mais diversos níveis tróficos (JACOB et al., 2015; MAZZO et al., 2018; MOSSA; SWELAM; MOHAFRASH, 2015; QIN et al., 2015; ŠEFČÍKOVÁ et al., 2018; SILVA et al., 2015; YILDIRIM; AGAR, 2016).

O fipronil é um inseticida fenilpirazol de amplo espectro que, devido a sua longa persistência e alta toxicidade aos invertebrados, foi considerado um dos inseticidas de maior sucesso no controle de pragas domésticas e agrícolas desde sua introdução no mercado (OZOE et al., 2015); contudo, atualmente, tem sido gradativamente suprimido ao redor do mundo por seus efeitos deletérios nos organismos não alvos (BONMATIN et al., 2015; PISA et al., 2014; SIMON-DELSO et al., 2015; VAN DER SLUIJS et al., 2015; VAN LEXMOND et al., 2015). A partir de uma pequena modificação em sua estrutura foi produzido o ethiprole, conferindo menor lipofilicidade e, assim, toxicidade reduzida comparada ao fipronil (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003; VIDAU et al., 2009).

O ethiprole é um inseticida de contato e ingestão que possui classificação toxicológica inferior ao seu análogo fipronil, classe III (medianamente tóxico). É comercializado como um inseticida foliar, de solo e eficaz no tratamento de sementes armazenadas (ARTHUR, 2002).

Apesar de poucos estudos, observou-se que este fenilpirazol pode interferir na polinização e no comportamento do forrageamento de abelhas (*Apis mellifera*) (SHARMA; ABROL, 2014) e nos parâmetros neurocomportamentais de ratos CD1, tanto em adultos como na prole em período de lactação (TANAKA; INOMATA, 2017; TANAKA; SUZUKI; INOMATA, 2018). O inseticida ainda pode alterar a morfologia nuclear dos eritrócitos de tilápias (*Oreochromis niloticus*), mesmo em concentrações muito baixas (GUEDES; FONTANETTI, 2014).

A avaliação dos impactos que inseticidas como o fipronil e o ethiprole nos organismos podem causar ao meio ambiente ocorre por meio de diversas metodologias. O uso de protocolos que possuem amparo de órgãos mundialmente reconhecidos como *International Program em Plant Bioassays* (IPPB), *International Organizaton for Standardization* (ISO), *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) e *US Environmental Protection Agency* (USEPA) traz maior confiabilidade para

um teste, além de garantir a sua reprodutibilidade. O uso de plantas como bioindicadores é muito comum nos estudos toxicológicos, uma vez que estes organismos podem responder mais rapidamente à substâncias tóxicas que organismos em níveis tróficos mais altos; são passíveis de bioensaios mais simples comparados a outras análises ambientais e, ainda, apresentam uma ampla variedade de biomarcadores a serem avaliados (DE SOUZA; GUEDES; FONTANETTI, 2016; FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1982).

As espécies *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola) são muito utilizadas em testes de germinação e crescimento radicular de sementes (ANDRADE-VIEIRA; PALMIERI; DAVIDE, 2017; SCHERER et al., 2019; SILVEIRA et al., 2017). O uso desses parâmetros tem sido cada vez mais reportado, uma vez que a germinação pode fornecer informações sobre os efeitos letais de um composto, assim como a subletalidade pode ser verificada por meio do acompanhamento da emissão de suas raízes (BONCIU et al., 2018; SOBRERO; RONCO, 2004).

Considerando o exposto e levando em conta que o ethiprole foi lançado no mercado como um inseticida menos tóxico que o fipronil e com a mesma eficácia, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de diferentes concentrações dos inseticidas Curbix® 200 SC e Regent® 800 WG sobre o desenvolvimento inicial das espécies *L. sativa* e *A. cepa*. Objetivou-se também averiguar se o ethiprole em conjunto com os adjuvantes presentes no composto comercial é uma alternativa mais segura para o meio ambiente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparação dos compostos comerciais a serem testados

Curbix® 200 SC e Regent® 800 WG foram obtidos por representantes comerciais e diluídos em água mineral (pH 8,0; 13,40 mg/L de cálcio; 3,93 mg/L de potássio; 0,03 mg/L de nitrato; 35,20 mg/L de sódio) a fim de alcançar as concentrações desejadas para cada teste realizado. As concentrações foram estipuladas levando em conta as doses mínimas indicadas para uso em plantios novos de cana-de-açúcar pelos fabricantes dos inseticidas, no qual o ethiprole encontra-se à 10mM e o fipronil à 1,22mM. Primeiramente foi realizado um bioensaio com diferentes concentrações dos inseticidas com o intuito de, a partir de uma possível curva de regressão, estipular o IC_{50} (metade da concentração inibitória máxima) de cada composto sobre os bioindicadores utilizados (bioensaio 1). As doses utilizadas foram: 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,05 e 0,025 μL/L de Curbix® e 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,05 e 0,025 mg/L de Regent®. Por fim, outro bioensaio foi performado com

a concentração mínima indicada da calda (composto diluído em água pronto para a aplicação em campo) de cada inseticida a fim de investigar a exposição direta que as plantas podem sofrer dos inseticidas estudados, sendo 667 mg/L de Regent® e 20 mL/L de Curbix® (bioensaio 2). As diluições utilizadas de cada composto comercial, juntamente com a concentração molar de seu respectivo ingrediente ativo, estão representadas na tabela 1.

2.2. Exposição dos modelos aos compostos comerciais

Sementes de *L. sativa* variedade *capitata* (alface), lote 117023-001-52, e de *A. cepa* variedade baia periforme (cebola), lote 117182-009-52, compradas da ISLA®, foram dispostas em placas de Petri com 9 cm de diâmetro contendo papel filtro impregnado com 4 ml de água como controle negativo – C(–), sulfato de zinco heptahidratado, $ZnSO_4$-$7H_2O$, (0.05 M) como controle positivo – C(+) e diferentes soluções dos compostos estudados. As placas foram mantidas de forma aleatória sob temperatura controlada de 22ºC±1, sem fotoperíodo, em incubadora BOD. Cada modelo experimental contou com cinco réplicas com 30 sementes cada. As sementes foram expostas diretamente às soluções por um período de 120 horas.

2.3. Análises de germinação, Índice de Velocidade de Germinação (IVG), alongamento radicular e taxa de fitotoxicidade

Durante o bioensaio foi observado o número de sementes germinadas nos períodos de 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas para alface (*L. sativa*). Para a cebola (A.cepa), as sementes germinadas foram contadas nos períodos de 24, 32, 40, 56, 64, 72, 80, 88 e 96 horas para *A. cepa.*

A partir dos dados obtidos, foi calculado o índice de velocidade de germinação (GSI), por meio da fórmula $(N1\times1)+(N2-N1)\times1/2+(N3-N2)\times1/3+...(Ny-(Ny-1))\times1/y$, onde Ny corresponde ao número de sementes germinadas em um dado período e y representa o número total da avaliação de time-points (PALMIERI et al., 2014). Ao final das 120 horas, foram contabilizadas as sementes germinadas. Para determinação da porcentagem de germinação das sementes foi utilizada a fórmula: total de sementes germinadas/total de sementes por tratamento x 100.

Ao término da exposição, as placas foram mantidas por 48 horas em freezer -20ºC para posterior medição. Então, foram fotografadas e cada semente germinada foi medida por meio do programa de processamento de imagens ImageJ. A taxa de fitotoxicidade foi

calculada de acordo com a seguinte fórmula adaptada de Chou e Lin (1976) e Chou et al. (1981): [(média do comprimento do C(–) - média comprimento do tratamento)/(média do comprimento das raízes do C(–))] x 100.

2.4. Análises estatísticas

Todas as avaliações realizadas neste trabalho sofreram análise de variância (p= 0.05). A normalidade e a homogeneidade dos dados foram analisadas a partir dos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. O teste estatístico ANOVA com *post hoc* Dunnett foi aplicado quando a distribuição foi normal e homogênea. Caso contrário, aplicou-se o teste Kruskal Wallis. As análises foram performadas no software IBM SPSS statistics 25.

3. RESULTADOS

Os resultados da exposição de sementes de *A. cepa* e *L. sativa* às diferentes de Regent® e Curbix® encontram-se na tabela 2 e nas figuras 1, 2 e 3.

Neste estudo, o C(–) obteve germinação média superior à 80% das sementes de *A. cepa* e *L. sativa* em ambos os bioensaios, possibilitando a continuação e a confiabilidade dos testes realizados. O C(+) não inibiu a germinação das sementes em ambas as espécies. No entanto, após germinadas, o desenvolvimento das raízes foi inibido em *L. sativa* e retardado em *A. cepa* em relação ao C(–). O alongamento de raiz e a porcentagem de germinação foram analisados ao fim de 120 horas.

3.1. Bioensaios com *A. cepa*

Ao término de 5 dias da exposição do bioensaio 1, nenhuma diferença significativa foi observada tanto na germinação como no IVG das sementes expostas às diferentes concentrações de Regent®. Por outro lado, a exposição às concentrações 1000, 100 e 10 µL/L de Curbix® acarretou uma queda significativa na porcentagem de germinação das sementes, bem como na velocidade em que as sementes germinaram (IVG) (tabela 2). O Regent® tampouco interferiu no alongamento das raízes e, consequentemente, nenhuma dose avaliada apresentou taxa de fitotoxicidade significativa. Em contrapartida, as sementes que foram expostas às concentrações 1000, 100, 10 e 1 µL/L de Curbix® apresentaram redução significativa no seu comprimento radicular, acarretando na significância da taxa de fitotoxicidade dessas diluições. Os

dados obtidos pelas concentrações elegidas não possibilitaram uma curva de regressão e, tampouco, o cálculo da IC_{50} de ambos os inseticidas sobre *A. cepa*.

Os resultados obtidos pelo bioensaio 2 revelaram que a concentração de 667 mg/L de Regent® não atuou sobre nenhum dos parâmetros avaliados (figura 2). Em compensação, quando comparadas ao C(–), as sementes submetidas à 20 mL/L de Curbix® apresentaram redução no IVG e no alongamento de raiz e taxa de fitotoxicidade significativa (figura 3).

3.2. Bioensaios com *L. sativa*

Segundo os dados obtidos no bioensaio 1, os inseticidas não interferiram na porcentagem de germinação das sementes de alface (tabela 2). As sementes expostas à 100 mg/L de Regent® apresentaram redução no IVG. Já as menores concentrações de ambos os inseticidas (0,1, 0,05 e 0,025 mg/L de Regent® e 0,1, 0,05 e 0,025 µL/L de Curbix®) apresentaram aumento no IVG. Da mesma forma, as concentrações 1000, 0,1, 0,05 e 0,025 mg/L de Regent® e 0,1, 0,05 e 0,025 µL/L de Curbix® estimularam um alongamento significativamente maior das raízes em relação ao C(–). Na análise da taxa de fitotoxicidade, apenas o tratamento com 1000 µL/L de Curbix® foi significativa sobre as sementes de alface.

No bioensaio 2, os parâmetros porcentagem de germinação e IVG não apresentaram valores significativos em ambos os inseticidas (figura 3). O Regent® não agiu sobre o comprimento das raízes. Já o alongamento radicular das sementes expostas ao Curbix® foi significativamente menor que no C(–).

4. DISCUSSÃO

O uso combinado de diferentes organismos para avaliar a toxicidade de poluentes ambientais é importante, pois esses dados biológicos podem melhor caracterizar os potenciais efeitos tóxicos dessas substâncias. Este estudo avaliou a ação fitotóxica de formulações comerciais com os inseticidas fenilpirazóis fipronil e ethiprole no desenvolvimento inicial de alface e cebola.

O crescimento de um órgão está intimamente relacionado a sucessivos ciclos de divisão celular. Sendo assim, se o agente interferir na transição das fases do ciclo mitótico, a proliferação celular é afetada, bem como o comprimento da raiz (HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010). Os efeitos do Curbix® em células meristemáticas de raízes de cebola foram anteriormente investigados por Guedes (2015). Os resultados demonstraram

que o inseticida foi genotóxico às células meristemáticas, induzindo aberrações cromossômicas. Além disso, as concentrações testadas induziram aumento no índice mitótico que, segundo as autoras, pode ter ocorrido por estímulo da proliferação celular por parte do inseticida. No presente estudo, as sementes de alface expostas às menores concentrações de Regent® e Curbix® sofreram aumento na velocidade em que as sementes de alface germinaram (IVG) e no alongamento das raízes. A capacidade dos dois inseticidas em estimular esses parâmetros possivelmente está relacionada a sua ação no ciclo celular. Esse efeito pode ter ocorrido tanto pelos princípios ativos em si quanto pela interação princípio ativo-adjuvantes que pode interferir na toxicidade dos compostos comerciais estudados. Para a elucidação destas questões, estudos comparativos necessitariam ser feitos, uma vez que não é disponibilizado pelas empresas fabricantes quais são os agentes presentes no conteúdo adjuvante ao princípio ativo dos compostos.

Entre as diversas modalidades de aplicação do fipronil na agricultura, está o tratamento de sementes, principalmente em culturas de arroz (CONNELLY, 2001; SCHLENK et al., 2001). Similarmente ao seu análogo, os primeiros estudos sobre o ethiprole também recomendaram este inseticida para o tratamento de sementes (ARTHUR, 2002). No presente estudo, os tratamentos com ambas as espécies expostas ao Regent® tiveram germinação similar ao controle negativo. Em contrapartida, as maiores concentrações de Curbix® induziram em sementes de cebola a redução de diferentes parâmetros em relação ao controle negativo, tais como a porcentagem de germinação, IVG e o alongamento das raízes. Segundo Sobrero e Ronco (2004), por meio da inibição da germinação pode ser verificado o efeito letal de uma substância. Da mesma forma, a análise do alongamento de raiz fornece informações sobre os efeitos subletais de um produto, pois apesar de não acarretar à inibição da germinação, o agente pode agir retardando o alongamento radicular (SOBRERO; RONCO, 2004). Posto isso, no presente estudo, o Curbix induziu efeitos subletais às cebolas, mas não induziu efeitos letais, pois, apesar de reduzir significativamente a germinação de sementes, a inibição de germinação só pode ser considerada um efeito letal quando ao final do experimento não houver germinação de raiz (SOBRERO; RONCO, 2004).

De acordo com os dados obtidos do bioensaio 2, os tratamentos expostos ao Regent® apresentaram resultados similares ao controle em todos os parâmetros analisados, demonstrando que a exposição aguda das concentrações testadas de Regent®, ou seja, o fipronil juntamente com os aditivos contidos no composto comercial, não desencadeou efeitos tóxicos nas espécies *A. cepa* e *L. sativa*. O Curbix® agiu de maneira

distinta nos bioindicadores, porém, negativamente em ambas as espécies. O composto afetou todos os parâmetros, reduzindo significativamente o IVG e o alongamento de raiz, refletindo, na expressiva taxa de fitotoxicidade. Já na alface, a ação do Curbix® foi somente sobre o alongamento de raiz, consequentemente, na taxa de fitotoxicidade.

O ethiprole foi produzido a partir da substituição do radical trifluorometil-sulfinil, presente no fipronil, pelo grupo etil-sulfinil presente no ethiprole. Esta mudança altera a lipofilia e propriedades eletrônicas e também o destino fotoquímico e metabólico, eficácia e toxicologia (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003). Segundo Vidau (2009), a redução de sua lipofilicidade conferiu menor toxicidade ao ethiprole em relação ao fipronil. Interessantemente, os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que Curbix®, contendo 20% de ethiprole, foi mais danoso em relação ao fipronil ao desenvolvimento inicial da alface e da cebola em todos os parâmetros avaliados. Sabendo-se que, assim como o fipronil, o ethiprole também pode ser utilizado no tratamento de sementes, maiores estudos sobre a interação do ethiprole com os agentes adjuvantes presente no Curbix® são necessários a fim de compreender se há sinergismo entre eles.

5. CONCLUSÃO

Os ensaios realizados neste estudo são constituídos por parâmetros confiáveis para avaliação de fitotoxicidade de agrotóxicos. As menores concentrações avaliadas de Regent® estimularam o crescimento das raízes em concentrações residuais. Já o inseticida Curbix® acarretou tanto em fitotoxicidade quanto redução do alongamento de raiz nas maiores concentrações em cebola, bem como estímulo da velocidade de germinação e do crescimento de raiz nas concentrações residuais em alface. Os resultados demonstraram que o Curbix® apresentou efeitos mais severos sobre as plantas que o Regent® em diversos parâmetros. Devido a isso, o Curbix® não demonstra ser uma alternativa mais segura ao Regent® sobre plantas como *A. cepa* e *L. sativa*.

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; PALMIERI, M. J.; DAVIDE, L. C. Effects of long exposure to spent potliner on seeds, root tips, and meristematic cells of *Allium cepa* L. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 10, p. 489, 2017.

ARTHUR, F. H. Efficacy of ethiprole applied alone and in combination with conventional insecticides for protection of stored wheat and stored corn. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 6, p. 1314–1318, 2002.

BONCIU, E.; FIRBAS, P.; FONTANETTI, C. S.; WUSHENG, J.; KARAISMAILOĞLU, M. C.; LIU, D.; MENICUCCI, F.; PESNYA, D. S.; POPESCU, A.; ROMANOVSKY, A. V.; SCHIFF, S.; ŚLUSARCZYK, J.; DE SOUZA, C. P.; SRIVASTAVA, A.; SUTAN, A.; PAPINI, A. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191–209, 2018.

BONMATIN, J. M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E. A.; NOOME, D. A.; SIMON-DELSO, N.; TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35–67, 2015.

CABONI, P.; SAMMELSON, R. E.; CASIDA, J. E. phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: Ethiprole compared with fipronil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7055–7061, 2003.

CHOU, C.-H.; LIN, H.-J. Autointoxication mechanism of *Oryza sativa* I. Phytotoxic effects of decomposing rice residues in soil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, n. 3, p. 353–367, 1976.

CHOU, C.; HUANG, A.; HUANG, Y.; LIN, W.; LEE, C. Impacts of water-pollution on crop growth in Taiwan. The detrimental effects of industrial-waste waters from dye, livestock, plating, leather, synthetic-fiber, food, and fertilizer factories in Taiwan. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 22, n. 1, p. 9–33, 1981.

CONNELLY, P. Environmental fate of fipronil. **Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency**, p. 1–17, 2001.

DE SOUZA, C. P.; GUEDES, T. de A.; FONTANETTI, C. S. Evaluation of herbicides action on plant bioindicators by genetic biomarkers: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 12, p. 694, 2016.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in allium. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273–291, 1982.

GUEDES, T. A. **Investigação dos efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Curbix® 200SC (ethiprole) em organismos não alvos**. Universidade Estadual Paulista, 2015.

GUEDES, T.; FONTANETTI, C. Investigation of the action of ethiprole in non-target

organisms using *Oreochromis niloticus* as a bioindicator. **Toxicology Letters**, v. 229, p. S130–S131, 2014.

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current opinion in plant biology,** v. 13, n. 1, p. 66-74, 2010.

JACOB, C. R.; SOARES, H. M.; NOCELLI, R. C.; MALASPINA, O. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Pest Management Science**, v. 71, n. 1, p. 114-122, 2015.

KOHLER, H.-R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we track effects to the population level and beyond? **Science**, v. 341, n. 6147, p. 759–765, 2013.

MAZZO, M.; BALIEIRA, K. V. B.; BIZERRA, P. F. V.; MINGATTO, F. E. Fipronil-induced decrease in the epididymal sperm count: oxidative effect and protection by vitamin E. **Animal Reproduction**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 1223–1230, 2018.

MOSSA, A.-T. H.; SWELAM, E. S.; MOHAFRASH, S. M. M. Sub-chronic exposure to fipronil induced oxidative stress, biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of male albino rats. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 775–784, 2015.

OZOE, Y.; OZOE, F.; KITA, T.; RAHMAN, M. M.; LIU, G.; HISANO, K.; TAKASHIMA, M.; NAKATA, Y. Multiple sites of insecticidal action in ionotropic GABA receptors. In: ACS SYMPOSIUM SERIES, 2015.

PALMIERI, M. J.; LUBER, J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVIDE, L. C. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 763, p. 30–35, 2014.

PISA, L. W.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; DOWNS, C. A.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; MCFIELD, M.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; SETTELE, J.; SIMON-DELSO, N.; STARK, J. D.; VAN DER SLUIJS, J. P.; VAN DYCK, H.; WIEMERS, M. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68–102, 2014.

QIN, F.; GAO, Y.; XU, P.; GUO, B.; LI, J.; WANG, H. Enantioselective bioaccumulation and toxic effects of fipronil in the earthworm *Eisenia foetida* following soil exposure. **Pest Management Science**, v. 71, n. 4, p. 553-561, 2015.

SCHERER, M. D.; SPOSITO, J. C. V.; FALCO, W. F.; GRISOLIA, A. B.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M.; MACHADO, G.; NASCIMENTO, V. A.;

GONÇALVES, D. A.; WENDER, H.; OLIVEIRA, S. L.; CAIRES, A. R. L. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of Allium cepa roots: A close analysis of particle size dependence. **Science of The Total Environment**, v. 660, p. 459–467, 2019.

SCHLENK, D.; HUGGETT, D. B.; ALLGOOD, J.; BENNETT, E.; RIMOLDI, J.; BEELER, A. B.; BLOCK, D.; HOLDER, A. W.; HOVINGA, R.; BEDIENT, P. Toxicity of fipronil and its degradation products to Procambarus sp.: Field and laboratory studies. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 325–332, 2001.

ŠEFČÍKOVÁ, Z.; BABEĽOVÁ, J.; ČIKOŠ, Š.; KOVAŘÍKOVÁ, V.; BURKUŠ, J.; ŠPIRKOVÁ, A.; KOPPEL, J.; FABIAN, D. Fipronil causes toxicity in mouse preimplantation embryos. **Toxicology**, v. 410, n. March, p. 214–221, 2018.

SHARMA, D.; ABROL, D. Effect of insecticides on foraging behaviour and pollination role of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) on toria (*Brassica campestris* var. toria) crop. **Egyptian Journal of Biology**, v. 16, n. 1, p. 79–86, 2014.

SILVA, C. A. S.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; DOMINGUES, C. E. C.; ABDALLA, F. C.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Fipronil effect on the frequency of anomalous brood in honeybee reared in. In: JULIUS-KÜHN-ARCHIV 2015, Ghent (Belgium)**:** Hazards of pesticides to bees - 12th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, 2015.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B. Dos; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and Lactuca sativa L. **Chemosphere**, [s. l.], v. 178, p. 359–367, 2017.

SIMON-DELSO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C. H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J. P.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5–34, 2015.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga

(*Lactuca sativa* L.). **Ensayos toxicológicos ymétodos de evaluación de calidad de aguas: standerización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Mexico: IMTA**, 2004.

TANAKA, T.; INOMATA, A. Reproductive and neurobehavioral effects of ethiprole administered to mice in the diet. **Birth Defects Research**, v. 109, n. 19, p. 1568–1585, 2017.

TANAKA, T.; SUZUKI, T.; INOMATA, A. Reproductive and neurobehavioral effects of maternal exposure to ethiprole in F1 -generation mice. **Birth Defects Research**, v. 110, n. 3, p. 259–275, 2018.

VAN DER SLUIJS, J. P.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BIJLEVELD VAN LEXMOND, M. F.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C. A.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; SIMON-DELSO, N.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Conclusions of the worldwide integrated assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 148–154, 2015.

VAN LEXMOND, M. B.; BONMATIN, J. M.; GOULSON, D.; NOOME, D. A. Worldwide integrated assessment on systemic pesticides global collapse of the entomofauna: Exploring the role of systemic insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 1–4, 2015.

VIDAU, C.; BRUNET, J. L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 4, p. 589–597, 2009.

YILDIRIM, N.; AGAR, G. Determination of genotoxic effects of fipronil in *Vicia faba* using random amplified polymorphic DNA analysis. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 8, p. 1450–1455, 2016.

Tabela 1. Concentrações dos compostos comerciais e seus respectivos ingredientes ativos utilizados neste estudo

	Composto comercial	Ingrediente ativo
Regent® 200 SC	1000 mg/L	2,28 mM
	667 mg/L*	1,22 mM
	100 mg/L	228,8 µM
	10 mg/L	22,88 µM
	1 mg/L	2,28 µM
	0,1 mg/L	0,228 µM
	0,05 mg/L	0,114 µM
	0,025 mg/L	0,057 µM
Curbix® 800 WG	20 mL/L*	10mM
	1000 µL /L	500 µM
	100 µL /L	50 µM
	10 µL/L	5 µM
	1 µL/L	0,5 µM
	0,1 µL/L	0,05 µM
	0,05 µL/L	0,025 µM
	0,025 µL/L	0,0125 µM

* Diluição pronta para aplicação em campo a partir de doses mínimas indicadas para uso em plantios novos de cana-de-açúcar pelo fabricante de ambos os inseticidas.

Tabela 2. Porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e taxa de fitotoxicidade de sementes das espécies *A. cepa* e *L. sativa* após exposição à diferentes concentrações dos inseticidas Regent® e Curbix® por 96 h.

	Tratamentos	*A. cepa*			*L. sativa*		
		Germinação (%)	IVG	Taxa de fitotoxicidade	Germinação (%)	IVG	Taxa de fitotoxicidade
	C(–)	88,67±9,01	27,33±2,13	0	100,00	8,25±0,42	0
	C(+)	72,00±6,06	22,84±1,92	#	97,29±4,49	10,46±1,04*	#
Regent®	1000	83,33	24,21±0,42	-2,49±8,23	97,33±2,79	8,29±0,50	-48,55±30,52
(mg/L)	667	83,33±3,33	26,05±1,00	0,47±13,04	98,89±1,92	7,55±0,59	6,40±6,63
	100	77,33±10,90	23,41±3,53	1,42±9,76	93,98±2,76	6,60±0,62*	5,88±21,40
	10	88,04±9,63	27,68±3,50	-3,30±8,24	97,38±2,71	8,21±0,03	-30,83±12,47
	1	90,00±7,20	27,94±1,75	0,35±10,36	96,74±3,23	8,72±0,70	-46,66±8,83
	0,1	80,00±2,72	25,21±2,25	7,71±4,81	99,17±1,67	9,55±0,69*	9,48±17,44
	0,05	83,33±7,82	27,19±2,54	2,58±3,60	98,62±1,89	10,13±0,23*	1,20±23,17
	0,025	79,33±9,55	25,84±2,97	5,41±9,64	100,00	9,61±0,56*	-10,75±29,44
Curbix®	20000	73,66±11,90	21,75±2,32	46,01±4,67*	98,89±1,92	6,67±0,89	22,62±12,86
(μL/L)	1000	52,00±18,94*	15,51±6,16*	37,97±16,84*	100,00	8,65±0,54	28,87±10,49*
	100	50,00±11,30*	15,71±3,41*	32,54±11,03*	100,00	8,20±0,61	23,10±15,40
	10	46,94±10,85*	15,26±0,57*	32,53±16,11*	97,40±1,46	8,71±0,63	-17,83±6,63
	1	66,85±21,03	21,07±7,68	35,05±13,44*	98,92±1,86	8,03±0,65	-1,46±5,10
	0,1	74,90±7,24	24,39±2,11	6,78±4,85	98,00±1,83	9,44±0,40*	16,16±18,07
	0,05	84,00±5,48	26,61±0,51	-0,86±9,08	98,67±1,83	9,29±0,42*	15,17±36,85
	0,025	81,33±6,91	26,63±2,29	0,24±8,16	98,67±1,83	10,00±0,62*	6,77±16,05

C(–): Controle negativo; C(+): Controle positivo. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada com o controle negativo.

(#) Parâmetro não avaliado

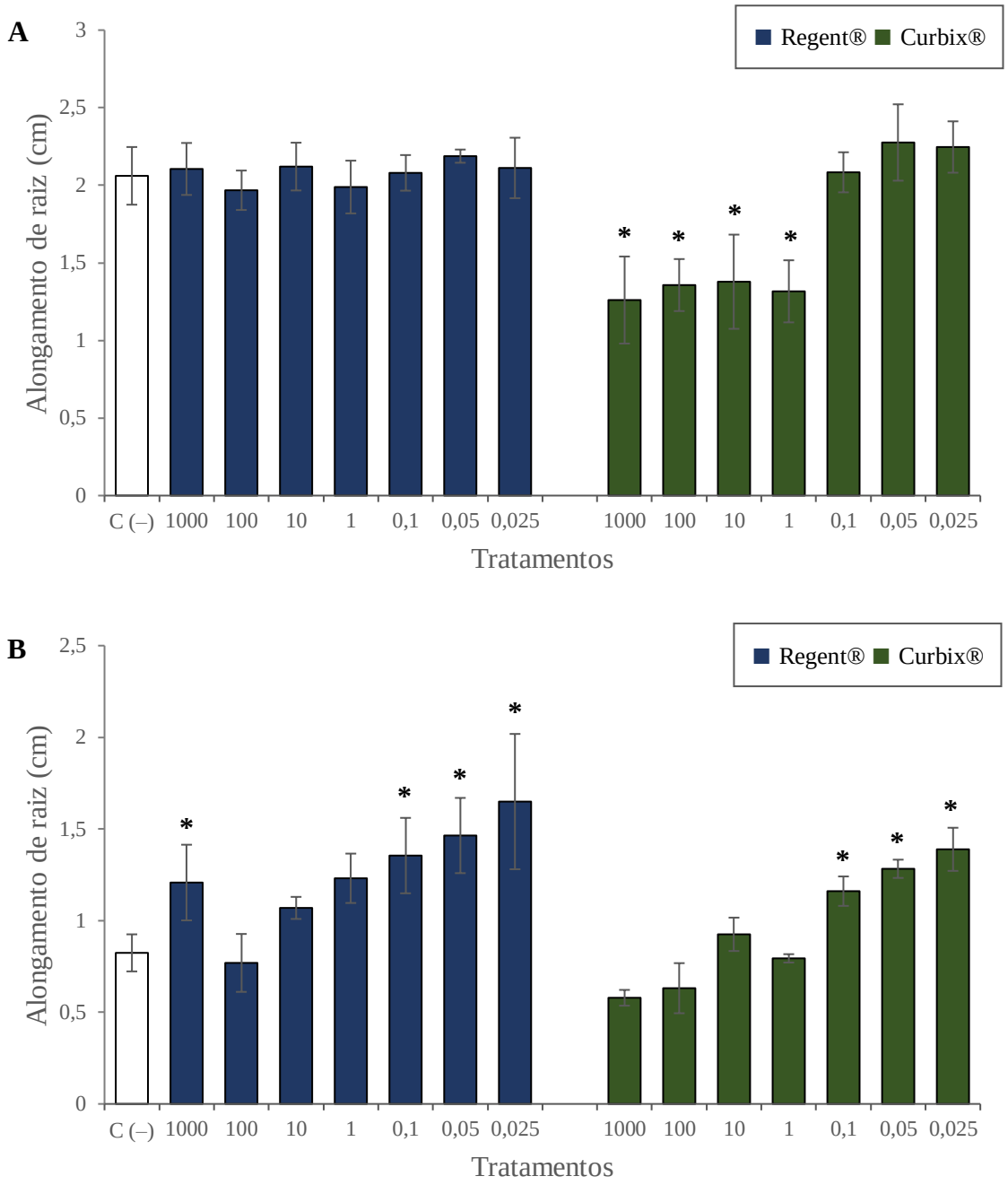

Figura 1. Efeito de diferentes concentrações dos inseticidas Regent® (mg/L) e Curbix® (µL/L) sobre o alongamento das raízes de *A. cepa* (A) e *L. sativa* (B). Os dados representam a média ± desvio padrão. (*) Diferença estatisticamente significativa (P<0,05) quando comparada com o controle negativo, C(–).

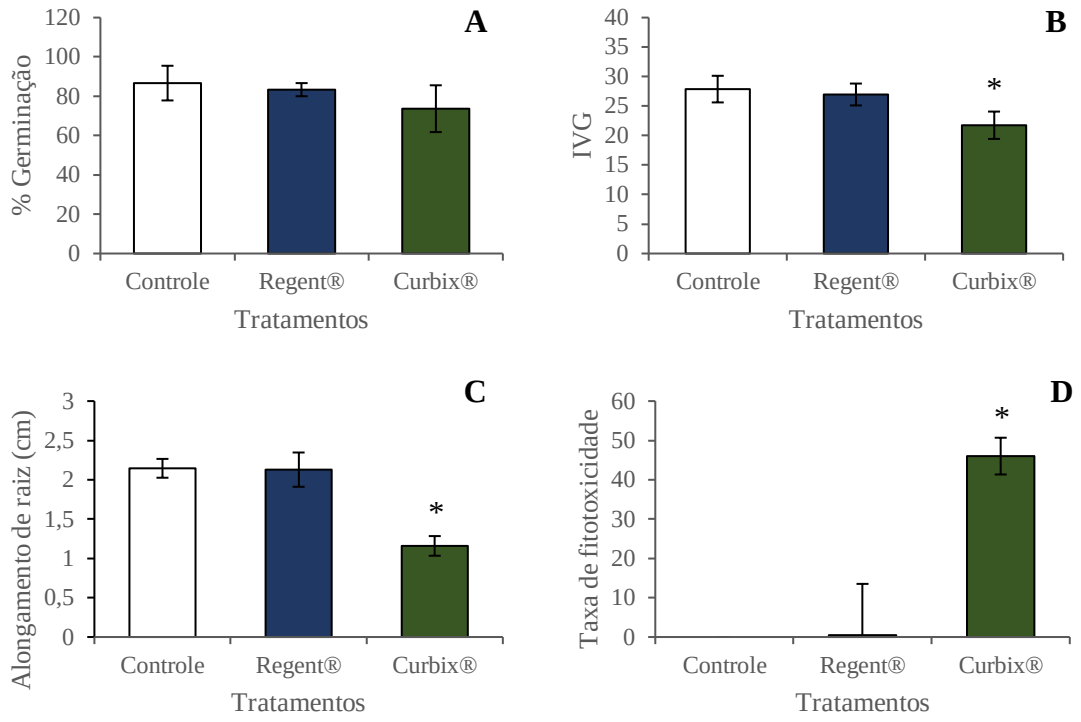

Figura 2. Média e desvio padrão de germinação (A), índice de velocidade de germinação – IVG (B), alongamento de raiz (C) e taxa de fitotoxicidade (D) de sementes de *A. cepa* expostas às doses mínimas indicadas para uso em plantios novos de cana-de-açúcar pelos inseticidas Regent® (667 mg/L) e Curbix® (20 mL/L) por 96h. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada com o controle negativo, C(–).

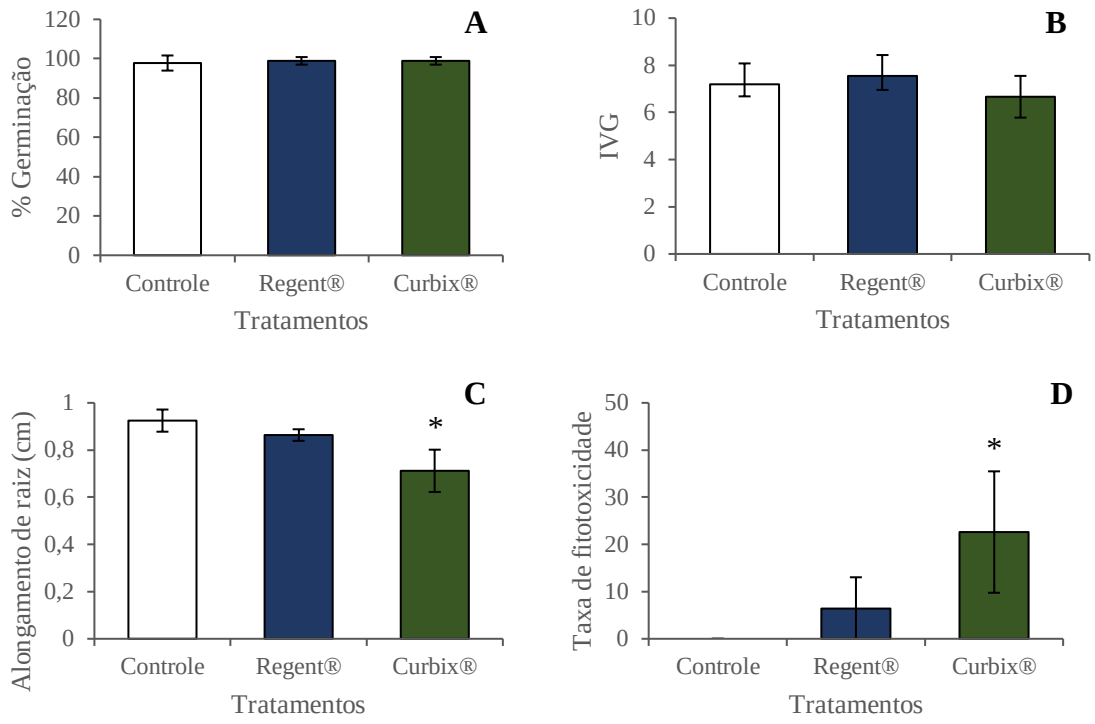

Figura 3. Média e desvio padrão de germinação (A), índice de velocidade de germinação – IVG (B), alongamento de raiz (C) e taxa de fitotoxicidade (D) de sementes de *L. sativa* expostas às doses mínimas indicadas para uso em plantios novos de cana-de-açúcar pelos inseticidas Regent® (667 mg/L) e Curbix® (20 mL/L) por 96h. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada com o controle negativo, C(–).

ARTIGO 2

Diluições residuais de dois inseticidas contendo fipronil e ethiprole induzem estresse oxidativo em peixes

Thays de Andrade Guedes[a]; Ana Claudia de Castro Marcato; Jorge Evangelista Correia[a]; Maria Paula Mancini Coelho; Armindo Antônio Alves[b]; Carmem Silvia Fontanetti[a]

[a]*UNESP (São Paulo State University), IB (Instituto de Biociências), Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil*

[b]*Fundação Hermínio Ometto (UNIARARAS), Av. Dr. João Maximiliano Baruto, 500, Jardim Universitário, CEP 13607-339, Araras, SP, Brazil*

RESUMO

O malondialdeído é um dos produtos da oxidação lipídica gerada pelo estresse oxidativo que pode ser causado por inseticidas como o fipronil. Ele é um inseticida neurotóxico e sistêmico que atua como um bloqueador não competitivo dos canais de cloreto, levando à morte do inseto por hiperexcitação neuronal e paralisia. O fipronil foi considerado um dos inseticidas mais bem-sucedidos por mais de uma década e, atualmente, tem sido suprimido em diversos países em virtude de sua toxicidade em organismos de todos os níveis tróficos, inclusive os humanos. Por isso, compostos que sejam mais seguros aos organismos não alvos, e mais específicos em sua ação biocida, estão sendo empregados na agricultura. Pouco se sabe sobre os efeitos do ethiprole nos organismos e, tampouco, quando utilizado juntamente com os adjuvantes nas formulações comerciais. Desta forma, levando em conta que compostos como o fipronil e o ethiprole alcançam o meio ambiente por meio de misturas e que o ethiprole surgiu como alternativa menos tóxica ao fipronil, o objetivo deste estudo foi investigar se concentrações residuais dos compostos comerciais Regent® e Curbix® induzem danos oxidativo e histopatológico em fígado de peixes *Oreochromis niloticus* e, ainda, se o Curbix® é uma alternativa segura em relação ao Regent®. Foram estudadas as diluições 0,04, 0,02 e 0,005 mg/L de Regent® e 0,08, 0,04 e 0,02 μL/L de Curbix®. De acordo com os resultados, as maiores diluições avaliadas de ambos os inseticidas induziram o aumento dos níveis de MDA, um produto

da peroxidação lipídica. Paralelamente, aumento das alterações histopatológicas foi observado nos fígados expostos aos inseticidas. A presença de núcleos picnóticos foi significativa nos animais que receberam a maior diluição de Regent®. Os resultados demonstraram que doses residuais de ambas as formulações comerciais induziram danos oxidativos e teciduais, fornecendo informações de que a substituição do Regent® pelo Curbix® pode não ser uma alterativa segura aos organismos aquáticos.

Palavras-chave: peroxidação lipídica, histopatologia, tilápia, fenilpirazol

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo gera produtos de oxidação lipídica, sendo o malondialdeído (MDA), produto secundário dessa oxidação, o mais estudado na avaliação da peroxidação. Esse metabólito é um dos principais responsáveis pelos processos de envelhecimento, mutação e morte celular nos organismos. É importante compreender os efeitos resultantes da exposição de agentes estressantes nos organismos; permitindo, assim, relacionar os danos a níveis bioquímicos/celulares aos impactos observados no organismo em geral. Desta forma, o uso de biomarcadores bioquímicos como o MDA tem sido empregado para a detecção dos primeiros impactos de poluentes em peixes (BADGUJAR et al., 2016; CLASEN et al., 2018; HEGAZI; ATTIA; ASHOUR, 2010).

Paralelamente, biomarcadores morfológicos promovem evidências qualitativas de adaptações funcionais advindas da exposição aos contaminantes. A análise qualitativa de danos em diferentes tecidos e células antes da morte do organismo é uma ferramenta utilizada para indicar um nível inicial de toxicidade (FONTANETTI et al., 2011). A utilização de órgãos como o fígado é apropriada para se investigar alterações em nível tecidual, celular e fisiológico. O fígado desempenha um papel crucial nos processos de desintoxicação e biotransformação; além disso, devido à sua função, posição e suprimento sanguíneo, o fígado é um dos órgãos mais afetados pela presença de poluentes da água (VAN DER VOET; LIFSET; LUO, 2010) e tem sido usado como referência para análise de tecidos e danos causados por compostos tóxicos ambientais (ANSOAR-RODRÍGUEZ et al., 2016; COELHO et al., 2018).

Os inseticidas têm sido extensamente consumidos atualmente na agricultura. Estes compostos possuem características tóxicas específicas para as pragas, mas que podem causar efeitos indesejáveis a outros organismos não alvos mesmo em baixas concentrações (SINGER et al., 2010). Na cultura da cana-de-açúcar estão aprovados 11

ingredientes ativos. Dentre eles, o fipronil, uma molécula extremamente ativa e um potente desregulador do sistema nervoso central. A ação tóxica do fipronil é devido à sua capacidade de agir no receptor do ácido γ-aminobutírico (GABA) como um bloqueador não competitivo dos canais de cloreto, levando à morte do inseto por hiperexcitação neuronal e paralisia (ZHAO, 2004)

A molécula de fipronil é considerada de amplo espectro e de degradação lenta, por consequência, o produto de sua degradação (metabólitos) é mais tóxico e persistente do que o composto original (TINGLE et al., 2003). Tanto o fipronil como seu metabólito sulfona podem induzir a morte celular em células de hepatócitos humanos HepG2 (DAS et al., 2006). Vários efeitos adversos do fipronil já foram relatados (BONMATIN et al., 2015; PISA et al., 2014; SIMON-DELSO et al., 2015; VAN DER SLUIJS et al., 2015; VAN LEXMOND et al., 2015). Animais expostos ao fipronil apresentam alterações ultraestruturais significativas em células hepáticas, como desorganização celular, esteatose hepática, morte celular e aumento das células de Kupffer, sugerindo um aumento da atividade fagocítica do fígado nos animais expostos (DE OLIVEIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012).

Desde sua introdução no mercado de defensivos agrícolas nas últimas décadas, diversos estudos têm demonstrado seu potencial tóxico em diversos organismos. Por isso, moléculas como a do ethiprole foram desenvolvidas a fim de serem tão efetivas quanto o fipronil e que possuam menor toxicidade aos insetos não-alvos. O ethiprole atua no receptor GABA como bloqueador não competitivo do canal de cloreto controlado pelo GABA e o seu grupo funcional é o 1-fenilpirazole (ZHAO et al., 2010). O ethiprole é muito semelhante ao fipronil na estrutura química, fotoquímica, atividade metabólica e atividade inseticida (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003), porém, segundo é classificado como moderadamente tóxico, diferentemente do fipronil que é considerado altamente tóxico.

A toxicidade do ethiprole em organismos não alvos não é tão conhecida como a do fipronil. Vidau et al. (2009) investigaram o potencial citotóxico dos fenilpirazóis em células epiteliais humanas. Depois de 72 horas de exposição, o ethiprole não foi citotóxico para as células expostas a 150 µM do produto. Os autores concluíram que o ethiprole, produzido a partir do fipronil, é menos danoso às células devido a sua baixa lipofilicidade mais baixa e a substituição do radical trifluorometil-sulfinil, presente no fipronil, pelo grupo etil-sulfinil para a formulação deste inseticida. Tendo isso em vista, é de

fundamental importância estudos que avaliem o potencial tóxico do ethiprole em comparação ao fipronil, utilizando diversos bioindicadores e biomarcadores.

A toxicidade no meio aquático proveniente de produtos utilizados na agricultura é uma das principais preocupações dos ambientalistas. Os peixes são excelentes organismos para este tipo de estudo, pois possuem a capacidade de retirar, estocar e bioacumular compostos e/ou poluentes em seus organismos (STREIT, 2012); por possuírem essas propriedades, eles podem sinalizar o potencial perigo de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental.

Diante do exposto acima e visando a importância do uso de agrotóxicos no cultivo, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, seus impactos na economia mundial e a crescente demanda do mercado por produtos que sejam menos prejudiciais ao meio ambiente, este estudo teve por objetivo investigar e comparar o potencial tóxico de doses residuais de dois inseticidas comerciais pertencentes ao grupo dos fenilpirazóis, por meio de biomarcadores histológicos e moleculares para estresse oxidativo empregados em peixes da espécie *O. niloticus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Foram utilizados peixes da espécie *O. niloticus* (Perciformes, Cichlidae), popularmente conhecidos como tilápia do Nilo, com 10 centímetros de tamanho médio. Os animais foram aclimatados em tanques com sistema de filtração e aeração suplementar e foram mantidos sob alimentação diária com ração comercial para peixes (Laguna – Ocialis) por até 24 horas antes da montagem do bioensaio.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da UNESP- Rio Claro, São Paulo, sob protocolo nº 8214 de 30.09.2015 e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n 1676.899 de 15 de julho de 2009.

2.2. Inseticidas

Os inseticidas Curbix® 200 SC e Regent® 800 WG foram diluídos em água mineral (pH 8,0; 13,40 mg/L de cálcio; 3,93 mg/L de potássio; 0,03 mg/L de nitrato; 35,20 mg/L de sódio) a fim de alcançar as diluições desejadas para cada teste realizado. As diluições foram estipuladas a partir das doses mínimas indicadas para uso em plantios novos de cana-de-açúcar pelos fabricantes dos inseticidas. Dessa forma, as diluições

utilizadas nos bioensaios foram 0,04, 0,02 e 0,005 mg/L de Regent® e 0,08, 0,04 e 0,02 μL/L de Curbix®.

2.3. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas das águas contendo as diferentes concentrações dos inseticidas foram realizadas por Bioagri Laboratórios LTDA – Mérieux NutriSciences, Piracicaba, São Paulo. A amostragem foi realizada conforme os seguintes métodos: pH: SMWW, 22ª Edição, 2012 - Método 4500H+ B; Metais (ICP-MS): Det.: SMWW, 22ª Edição, 2012, Método 3125 B / Preparo: EPA 3010 A: 1992 e EPA 3005: 1992; fipronil e ethiprole: POP PA 076 - Rev. 15. Além da concentração de cada inseticida nos aquários, foram determinados parâmetros como: pH e metais totais. As amostras de água foram coletadas no início do experimento e no final, decorridas as 96 horas de bioensaio.

2.4. Bioensaio

Peixes de comprimento médio de 10 cm foram distribuídos aleatoriamente em 14 tanques de 40 L, sendo divididos em: controle, contendo água de poço artesiano; três diluições de Regent® e três diluições de Curbix®. O bioensaio foi performado por um período de 96 horas, em sistema estático com aeração contínua – sem renovação de água, com temperatura e pH dos tanques controlados. Os peixes foram mantidos em jejum durante o bioensaio. Para a coleta do fígado, os espécimes foram anestesiados com benzocaína, eutanasiados e dissecados. Para as análises moleculares, os órgãos foram retirados, lavados em solução salina e congelados imediatamente a -80ºC até serem processados para uso. Para a histologia, o fígado foi fixado em solução Bouin por aproximadamente 24 horas; em seguida, os materiais foram mergulhados em tampão fosfato de sódio pH=7,4 e mantidos em geladeira.

2.5. Análise de peroxidação lipídica

2.5.1. Preparação das amostras

Foram elegidos aleatoriamente três animais de cada tratamento para a aplicação das ferramentas moleculares. O tecido hepático foi homogeneizado e a dosagem de proteínas foi realizada por meio do método de Bradford (1976). As absorbâncias, obtidas à 595 nm, foram inseridas na equação da reta, o que permitiu a determinação da concentração de proteína para o fígado dos animais expostos aos tratamentos. Então, as amostras foram congeladas em freezer -80ºC até a realização das técnicas.

2.5.2. Determinação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A quantificação da peroxidação lipídica foi realizada por meio do TBARS Assay Kit (Cayman Chemical), respeitando-se as orientações do fabricante. A absorbância foi mensurada colorimetricamente à 532 nm usando um leitor de microplacas. O conteúdo de malondialdeído (MDA) foi calculado para cada amostra a partir de uma curva padrão.

2.6. Histologia

Os materiais coletados foram desidratados em série alcoólica por 20 minutos cada concentração (15, 25, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%), colocados em resina de embebição por no mínimo 24 horas e, incluídos em resina contendo catalisador. Após polimerização, os blocos foram seccionados com espessura de até 4 µm, com auxílio de micrótomo. Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina de acordo com Junqueira e Junqueira (1983). Duas lâminas com oito seções foram analisadas para cada peixe, com n = 5 para cada tratamento.

A descrição e a avaliação das alterações histológicas foram baseadas nos protocolos de Bernet et al. (1999) e Marinho et al. (2014). Fatores de importância (*w*) foram determinados para cada lesão, com base em sua importância patológica, de acordo com a forma como ela afeta a função do órgão e a sobrevivência dos peixes. As alterações foram previamente classificadas em três fatores de importância: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível com o fim da exposição ao toxicante, (2) importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos, quando o estressor é neutralizado e (3) alta importância patológica, a lesão geralmente é irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão. As alterações histopatológicas também foram pontuadas (*a*) em uma escala de 0 a 6, dependendo do nível e extensão da alteração, como segue: (0) nenhuma ocorrência, (2) ocorrência leve, (4) ocorrência moderada e (6) ocorrência severa. Além disso, valores intermediários também foram incluídos. O índice de alteração foi calculado multiplicando-se o fator de importância pelo escore. O índice total de cada indivíduo, correspondente à avaliação das alterações histopatológicas no fígado de cada animal examinado, foi calculado como:

$$\textbf{Índice}_{\textbf{ind}} = \sum (w \times a)$$

Desta maneira, as principais alterações encontradas, e seus respectivos fatores de importância, estão descritos na tabela 1.

2.7. Análises estatísticas

Todas as avaliações realizadas neste trabalho sofreram análise de variância (p= 0.05). A normalidade e a homogeneidade dos dados foram analisadas a partir dos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. O teste estatístico ANOVA com post hoc Dunnett foi aplicado quando a distribuição foi normal e homogênea. Caso contrário, aplicou-se o teste Kruskal Wallis. As análises foram performadas no software IBM SPSS statistics 25.

3. RESULTADOS

3.1. Análises físico-química

As análises de metais totais juntamente com a quantificação da concentração de ingrediente ativo presente em cada aquário estão representadas na tabela 2. Nenhum elemento foi encontrado em concentração acima do permitido para corpos d'água e águas subterrâneas, estabelecido pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) e pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

3.2. Peroxidação lipídica

Após o período de 96 horas de bioensaio, a quantificação de MDA foi realizada tanto nos peixes do controle quanto nos peixes expostos aos tratamentos com Regent® e Curbix® (figura 1). O aumento nos níveis de MDA não sucedeu de forma concentração-dependente. As diluições 0,005 e 0,02 mg/L de Regent® e 0,02 e 0,04 μL/L de Curbix® não produziram aumento significativo nos níveis de MDA. No entanto, o Regent® à 0,04 mg/L e o Curbix®, na diluição de 0,08 μL/L, induziram aumento significativo nos níveis de MDA dos peixes expostos.

3.3. Análise histológica

Os animais submetidos ao bioensaio de toxicidade, tanto o grupo controle quanto os grupos submetidos às diferentes diluições, apresentaram arquitetura padrão do tecido hepático de peixes teleósteos. O tecido apresenta hepatócitos dispostos em fileiras com núcleos bem definidos, apresentando citoplasma homogêneo ou ocasionalmente menos corado, intercalados por sinusóides (figura 2A). Observa-se distribuído no parênquima hepático, o tecido pancreático.

Os animais expostos aos defensivos apresentaram algumas alterações conhecidamente encontradas no fígado como degeneração hidrópica (figura 2B), citoplasma vacuolizado e desorganização do tecido (tabela 3). Estas alterações foram espaçadamente observadas também no grupo controle. Além das alterações já observadas em todos os grupos, os animais expostos ao Regent® e ao Curbix® apresentaram ainda núcleo picnótico (figura 2C) e perda de limite celular (figura 2D). A presença de núcleo picnótico foi estatisticamente significativa nos animais expostos à 0,04 mg/L de Regent®.

4. DISCUSSÃO

A peroxidação lipídica tem sido sugerida como um dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade induzida por pesticidas (KEHRER, 1993). O presente estudo investigou a ação de concentrações residuais dos inseticidas Regent® e Curbix® sobre tilápias. Os resultados demonstraram que os níveis de MDA foram significativamente aumentados nas células tratadas com as maiores diluições de ambos os inseticidas.

O MDA é um dos intermediários mais importantes produzidos durante a peroxidação lipídica, ele é conhecido por sua capacidade de causar reticulação e polimerização de macromoléculas, além de interagir com o DNA (HOCHSTEIN; JAIN, 1981). Por ser reativo ao ácido tiobarbitúrico (TBA), existem métodos de quantificação de MDA baseado no produto da união do MDA com o TBA, substâncias conhecidas por TBARS (*Thiobarbituric Acid-Reactive Substances*) (BUEGE; AUST, 1978)

O aumento dos níveis de MDA é apenas um dos produtos da ação deletéria da peroxidação lipídica. A liberação de ácidos graxos não saturados, por meio da ação das espécies reativas ao oxigênio (ERO) na desintegração dos fosfolipídios, pode resultar na ruptura das membranas celulares, na mutação do DNA, na oxidação de lipídios insaturados e no comprometimento dos componentes da matriz extracelular, proteoglicanos, colágeno e elastina (HALLIWELL; GUTTERDIGE, 2015), podendo, assim, levar á falência de diferentes órgãos e ao comprometendo da saúde do organismo.

De acordo com as análises histológicas, as diluições avaliadas não foram capazes de produzir danos significativos nos animais expostos, com exceção da presença de núcleos picnóticos. No entanto, apesar de não apresentarem diferenças significativas em relação ao controle, foram encontradas alterações adicionais nos tratamentos com os inseticidas. A perda de limite celular pode estar relacionada ao aumento dos níveis de MDA, uma vez que, como anteriormente citado, a peroxidação lipídica pode agir rompendo membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERDIGE, 2015).

A presença de núcleos picnóticos, estatisticamente significativa na maior diluição de Regent® neste estudo pode ser resultado da peroxidação lipídica acarretada pelo inseticida; essa alteração também foi observado em trabalhos que avaliaram os efeitos da vinhaça de cana-de-açúcar (MARINHO et al., 2014; COELHO et al., 2018), dos herbicidas diquat (HENARES et al., 2008) e glifosato (JIRAUNGKOORSKUL, et al., 2003) e do inseticida imidacloprido (ANSOAR-RODRÍGUEZ et al., 2016) também em fígados de tilápia do Nilo. É provável que esta condensação da cromatina indique que as células se tornaram hipofuncionais em um possível processo de morte celular em resposta ao potencial tóxico do Regent® decorrente da interação do MDA com o DNA da célula (FANTA et al., 2003).

Embora o fipronil tenha uma baixa solubilidade na água (0,0024 g/L), os compostos adjuvantes presentes nas formulações comerciais como o Regent® atuam tornando-o mais solúvel, permitindo que o fipronil induza aumento na produção de ERO, resultando no estresse oxidativo. Por outro lado, a molécula de ethiprole é altamente solúvel em água (9,2 g/L). Apesar dessa característica lhe conferir menor toxicidade, opostamente ao fipronil, os compostos adjuvantes provavelmente protegem o ethiprole da degradação, conferindo aumento de sua meia-vida e ação tóxica similar ao fipronil.

No entanto, a comprovação da ação protetiva sobre a integridade da molécula do ethiprole proporcionada pelos compostos adjuvantes e o consequente aumento na toxicidade do composto, quando comparado ao ingrediente ativo puro, seria possível por meio de estudos comparativos entre o composto comercial e o ethiprole puro.

Além disso, análises futuras poderão elucidar quais vias antioxidantes foram ativadas para que os danos causados pelas maiores diluições de ambos os inseticidas não tenham acarretado em alterações teciduais significativas, uma vez que a peroxidação lipídica é o resultado da reação geradora de radical hidroxila que possui como substrato o F^{+2}, convertido a partir do F^{+3}, e essa conversão é acelerada pelo acúmulo de H_2O_2, um dos produtos iniciais do estresse oxidativo, que pode ser expulso por enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

Consequentemente, a redução na atividade enzimática poderia indicar que a capacidade antioxidante foi superada pela quantidade de peroxidação lipídica dos produtos hidroperóxidos que pode ser detectada pelos níveis de MDA no tecido, como apresentado no presente estudo. Tal processo tem como resultado a perda das funções

biológicas e/ou o desequilíbrio homeostático, em decorrência dos danos induzidos às células e/ou tecidos.

5. CONCLUSÃO

Os inseticidas Regent® e Curbix® induziram aumento da peroxidação lipídica em *O. niloticus* nas maiores diluições avaliadas. Além disso, foram observadas alterações histopatológicas nos tratamentos com os inseticidas, com presença significativa de núcleos picnóticos nos animais expostos a maior diluição do Regent®. Produzido como uma alternativa menos tóxica que o fipronil, o ethiprole presente no Curbix® induziu danos moleculares similares ao composto a base de fironil . Os resultados demonstraram que o Curbix® pode não ser uma alternativa segura ao Regent® para peixes.

6. REFERÊNCIAS

ABRASCO, Asociacao Brasileira de Saúde Coletiva. **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na Saúde**.**Dossiê ABRASCO parte 1: agrotóxicos, segurança alimentar e nutricional e saúde**, 2015.

ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; CORREIA, J. E.; DE SOUZA, R. B.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; MARCATO, A. C. de C.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; FONTANETTI, C. S. Liver alterations in *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: Histopathology and heat shock protein in situ localization. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 51, n. 12, p. 881–887, 2016.

BADGUJAR, P. C.; CHANDRATRE, G. A.; PAWAR, N. N.; TELANG, A. G.; KURADE, N. P. Fipronil induced oxidative stress involves alterations in SOD1 and catalase gene expression in male mice liver: Protection by vitamins E and C. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 9, p. 1147-1158, 2016.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25–34, 1999.

BONMATIN, J. M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E. A.; NOOME, D. A.; SIMON-DELSO, N.; TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35–67, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n 1-2, p. 248-254, 1976.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in enzymology**. Elsevier, 1978. v. 52 p. 302–310.

CABONI, P.; SAMMELSON, R. E.; CASIDA, J. E. Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: Ethiprole compared with fipronil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7055–7061, 2003.

CARVALHO, C. dos S.; BERNUSSO, V. A.; ARAÚJO, H. S. S. De; ESPÍNDOLA, E. L. G.; FERNANDES, M. N. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, n. 1, p. 60–69, 2012.

CHEN, Q.; NIU, Y.; ZHANG, R.; GUO, H.; GAO, Y.; LI, Y.; LIU, R. The toxic influence of paraquat on hippocampus of mice: Involvement of oxidative stress. **NeuroToxicology**, v. 31, n 3, p. 310-316, 2010.

CLASEN, B.; LORO, V. L.; MURUSSI, C. R.; TIECHER, T. L.; MORAES, B.; ZANELLA, R. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 737 -743, 2018.

COELHO, M. P. M.; CORREIA, J. E.; VASQUES, L. I.; MARCATO, A. C. de C.; GUEDES, T. de A.; SOTO, M. A.; BASSO, J. B.; KIANG, C.; FONTANETTI, C. S. Toxicity evaluation of leached of sugarcane vinasse: Histopathology and immunostaining of cellular stress protein. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 165, n. April, p. 367–375, 2018.

DAS, P. C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R. L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, n. 3, p. 200–214, 2006.

DE OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Cytotoxicity of fipronil on mice liver cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 1, p. 28–35, 2011.

FERREIRA, M.; DE OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; MATHIAS, M. I. C. Action of the chemical agent fipronil (active ingredient of acaricide Frontline®) on the liver of mice: An ultrastructural analysis. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 2, p. 197–205, 2012.

FONTANETTI, C. S.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; PEREZ, D. G.;

MAZIVIERO, G. Bioindicators and biomarkers in the assessment of soil toxicity. In: PASCUCCI, S. (Ed.). **Soil Contamination**. Rijeka: InTech, 2011. p. 143–168.

HALLIWELL, B.; GUTTERDIGE, J. M. C. **Free radicals in biology & medicine**. Fifth ed. United Kingdom: Oxford University Press, 2015. v. 5 ed

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen radicals and the nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 8, p. 22–26, 1985.

HEGAZI, M. M.; ATTIA, Z. I.; ASHOUR, O. A. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 99, n. 2, p. 118–125, 2010.

HOCHSTEIN, P.; JAIN, S. K. Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. **Federation proceedings**, v. 40, n. 2, p. 183–8, 1981.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. Técnicas básicas de citologia e histologia. In: JUNQUEIRA, G. J. P. (Ed.). **São Paulo: Santos**. Santos: São Paulo, 1983. p. 102.

KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 23, n 1, p. 21-48, 1993.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3–4, p. 463–471, 1999.

MARINHO, J. F. U.; CORREIA, J. E.; MARCATO, A. C. de C.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239–245, 2014.

PISA, L. W.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; DOWNS, C. A.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; MCFIELD, M.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; SETTELE, J.; SIMON-DELSO, N.; STARK, J. D.; VAN DER SLUIJS, J. P.; VAN DYCK, H.; WIEMERS, M. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68–102, 2014.

ROMERO, A.; RAMOS, E.; ARES, I.; CASTELLANO, V.; MARTÍNEZ, M. A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; ANADÓN, A.; MARTÍNEZ, M. A. Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. **Toxicology Letters**, v. 252, p. 42-4, 2016.

SHIBAO, F. Y.; MOORI, R. G.; SANTOS, M. R. Dos. A logística reversa e as

embalagens vazias de defensivos agrícolas no Brasil. In: 17º SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 2010

SIMON-DELSO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C. H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J. P.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5–34, 2015.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. De. Monitoramento do risco ambiental do agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente**, 2004.

STREIT, B. Bioaccumulation of contaminants in fish. In: **Fish Ecotoxicology**. Birkhäuser, Basel, 1998. p. 353-387.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. In: WARE, G. W. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews**. New York, NY: Springer New York, 2003. p. 1–66.

VAN DER SLUIJS, J. P.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BIJLEVELD VAN LEXMOND, M. F.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C. A.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; SIMON-DELSO, N.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Conclusions of the worldwide integrated assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 148–154, 2015.

VAN DER VOET, E.; LIFSET, R. J.; LUO, L. Life-cycle assessment of biofuels, convergence and divergence. **Biofuels**, v. 1, n. 3, p. 435–449, 2010.

VAN LEXMOND, M. B.; BONMATIN, J. M.; GOULSON, D.; NOOME, D. A. Worldwide integrated assessment on systemic pesticides global collapse of the

entomofauna: Exploring the role of systemic insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 1–4, 2015.

VIDAU, C.; BRUNET, J. L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 4, p. 589–597, 2009.

ZHAO, X. Fipronil Is a Potent Open Channel Blocker of Glutamate-Activated Chloride Channels in Cockroach Neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.

ZHAO, Q.; LI, Y.; XIONG, L.; WANG, Q. Design, synthesis and insecticidal activity of novel phenylpyrazoles containing a 2,2,2-trichloro-1-alkoxyethyl moiety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4992–4998, 2010.

Tabela 1. Principais alterações encontradas em fígado de *O. niloticus* expostos aos inseticidas Regent® e Curbix® e seus respectivos fatores de importância

	Características analisadas	Fator de importância
Hepatócitos	Citoplasma vacuolizado	1
	Degeneração hidrópica	2
	Perda de limite celular	3
	Núcleo picnótico	3
Parênquima hepático	Desorganização do tecido	2

Tabela 2. Valores dos parâmetros avaliados na caracterização da água e das diluições dos inseticidas Regent® e Curbix® nas quais os peixes *O. niloticus* foram submetidos

Parâmetros		Regent® 200 SC			Curbix® 800 WG		
	Controle	0,04 mg/L	0,02 mg/L	0,005 mg/L	0,08 µL/L	0,04 µL/L	0,02 µL/L
Ingrediente ativo	-	26,8 µg/L	15,8 µg/L	3,85 µg/L	14,7 µg/L	9,05 µg/L	4,25 µg/L
pH	7,72	7,90	7,94	7,83	8,04	7,91	7,89
Prata (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Alumínio (mg/L)	0,027	0,022	0,028	0,021	0,022	0,018	0,023
Arsênio (mg/L)	0,018	0,016	0,016	0,016	0,016	0,017	0,016
Boro (mg/L)	0,006	0,006	0,007	0,007	0,006	0,006	0,007
Bário (mg/L)	0,029	0,032	0,031	0,033	0,033	0,034	0,034
Berílio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bismuto (mg/L)	< LQ	0,012	0,013	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cálcio (mg/L)	8,50	8,42	8,23	8,63	8,36	8,82	8,69
Cádmio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cobalto (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cromo (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cobre (mg/L)	< LQ	< LQ	0,001	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Ferro (mg/L)	0,018	0,011	0,020	0,028	0,024	0,014	0,022
Potássio (mg/L)	0,809	0,843	0,752	0,836	0,792	0,835	0,843
Lítio (mg/L)	0,010	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013
Magnésio (mg/L)	3,10	3,16	3,01	3,19	3,07	3,29	3,16
Manganês (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Molibdênio (mg/L)	0,001	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001
Sódio (mg/L)	28,6	28,7	27,2	28,3	27,4	29,1	28,3
Níquel (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Mercúrio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Chumbo (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Antimônio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Selênio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Silício (mg/L)	12,0	11,9	11,7	12,0	11,9	12,2	12,1
Estanho (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Estrôncio (mg/L)	0,039	0,041	0,040	0,042	0,041	0,043	0,042
Titânio (mg/L)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Tálio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Urânio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Vanádio (mg/L)	0,001	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001
Zinco (mg/L)	< LQ	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005

(Método 1060 e POP LB 010 para matrizes liquidas, CETESB 6300

Tabela 3. Frequência de ocorrência de alterações hepáticas encontradas em peixes da espécie *O. niloticus* expostos aos inseticidas Regent® e Curbix®

Tratamentos		Degeneração hidrópica	Perda de limite celular	Núcleo picnótico	Citoplasma vacuolizado	Desorganização do tecido
	Controle	1,55±2,12	0	0	0,80±1,10	2,64±1,61
Regent®	0,04 mg/L	0,79±1,64	1,20±2,55	3,21±2,71*	0,60±0,87	1,59±2,20
	0,02 mg/L	3,20±1,81	3,60±3,29	3,61±5,27	0	2,40±2,19
	0,005 mg/L	2,40±1,98	2,40±3,29	0	1,20±1,73	0
Curbix®	0,08 µL/L	1,60±2,19	1,20±2,68	1,20±2,68	1,21±1,73	1,60±3,58
	0,04 µL/L	1,61±1,53	0	0	0,80±1,65	1,20±1,79
	0,02 µL/L	2,00±3,46	0	0	0,80±1,10	0,80±1,79

Dados apresentados como média ± desvio padrão.
(*) Valor estatisticamente significativo quando comparado com o Controle, de acordo com ANOVA ($p<0,05$)

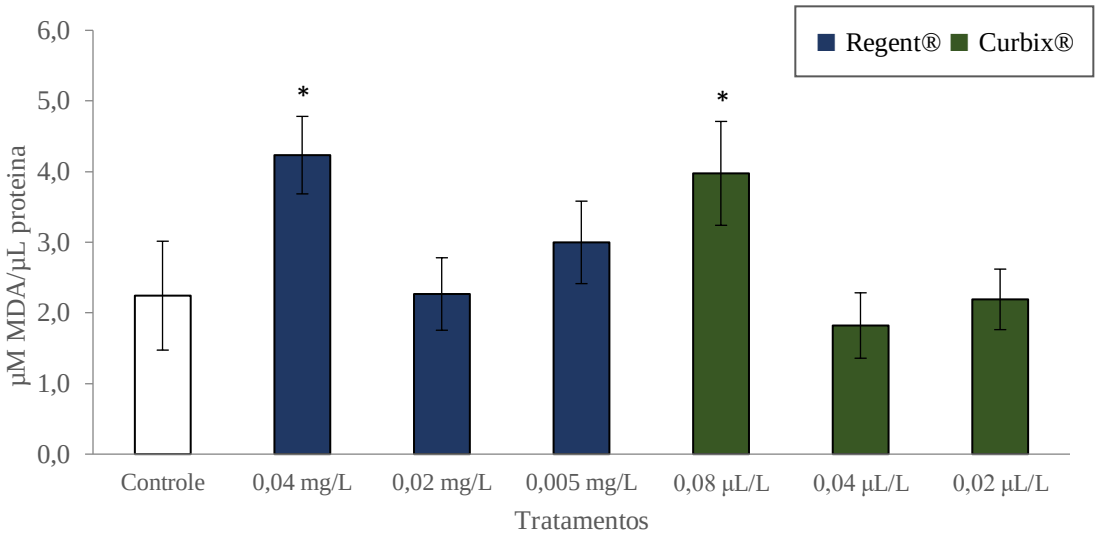

Figura 1. Concentrações de MDA em *O. niloticus* expostos aos inseticidas Regent® e Curbix®. * Diferença estatisticamente significativa (P<0,05) quando comparada ao grupo controle.

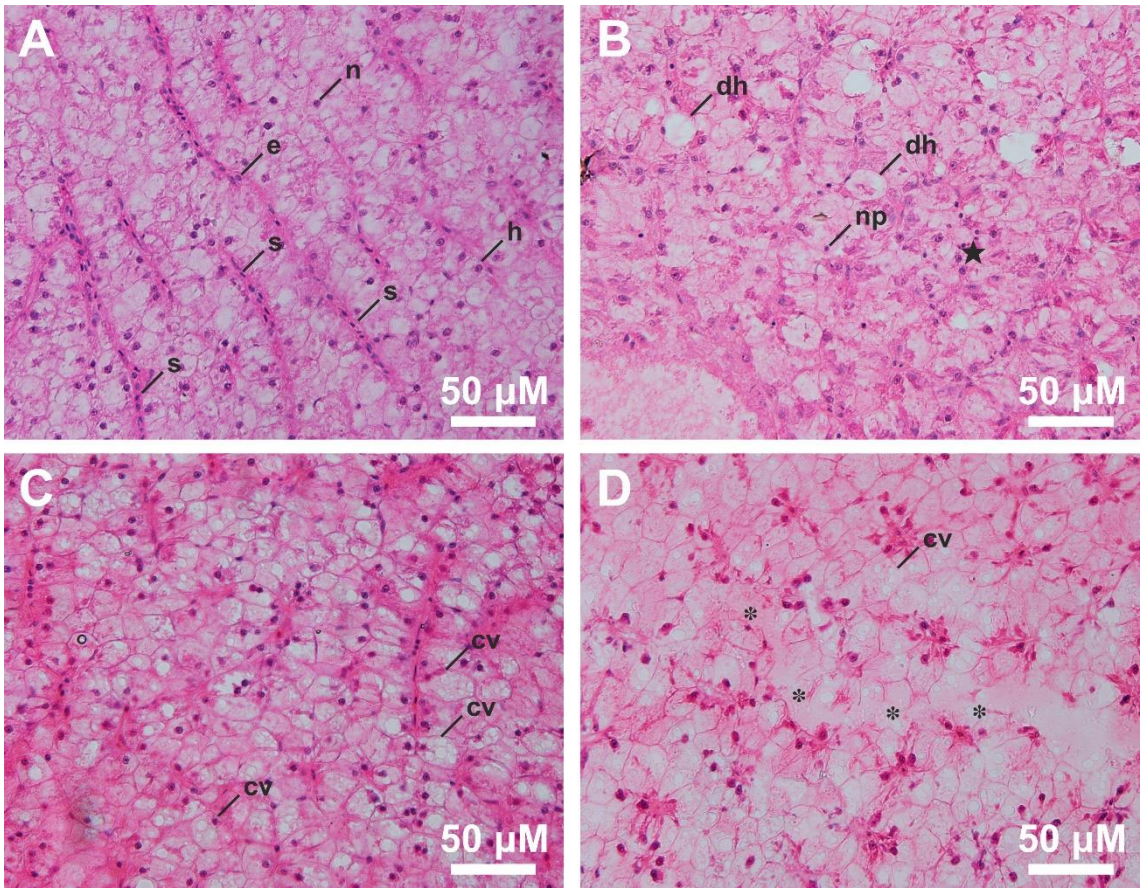

Figura 2. Secções hepáticas de *O. niloticus* expostos coradas com hematoxilina-eosina. Grupo controle (A) e grupos dos tratamentos (B, C e D). h: hepatócitos; n: núcleos; e: eritrócitos; s: sinusóides; dh: degeneração hidrópica; np: núcleo picnótico; cv: citoplasma vacuolizado; *: perda de limite celular; ★: desorganização do tecido.

ARTIGO 3

Ação citoprotetora e antiapoptótica da proteína de estresse HSP70 em *Oreochromis niloticus* expostos a diluições residuais de inseticidas com fipronil e ethiprole

Thays de Andrade Guedes; Cristina Moreira-de-Sousa; Hellen Maria Soares Lima; Tatiane Caroline Grella; Priscila Cintra Socolowski; Carmem Silvia Fontanetti

UNESP (São Paulo State University), IB (Instituto de Biociências), Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil

RESUMO

O fipronil é um inseticida neurotóxico da família fenilpirazol que tem sido usado extensivamente por todo o mundo nos últimos 10 anos. Entretanto, esta molécula tem sido controlada e banida gradativamente devido a sua toxicidade comprovada em diversos organismos não alvos. Nesse contexto, o ethiprole foi criado a partir de uma pequena modificação da estrutura de seu análogo fipronil, com intuito de minimizar sua toxicidade por meio da redução de sua lipofilicidade. O uso desses inseticidas no campo pode ter como destino final o ambiente aquático. Comercializados na forma de misturas, pouco se sabe sobre os efeitos moleculares das doses residuais de seus compostos comerciais. Por esta razão, o presente estudo almejou avaliar os efeitos celulares que as diluições com concentrações residuais de dois compostos comerciais contendo fipronil e ethiprole poderiam apresentar no fígado de *Oreochromis niloticus* (tilápia). Para este fim, os peixes foram expostos às concentrações 0,04, 0,02 e 0,005 mg/L de Regent® e 0,08, 0,04 e 0,02 μL/L de Curbix®, contendo, respectivamente, fipronil e ethiprole, por 96 horas. Amostras do fígado foram coletadas e processadas de acordo com o protocolo estabelecido para a técnica de imunomarcação da HSP70, bem como para o método de TUNEL. As diluições avaliadas de ambos os compostos comerciais não foram capazes de causar danos moleculares significativos ao tecido hepático dos animais expostos a ambos os inseticidas, porém, foi observado aumento de fragmentação do DNA em vários grupos. Embora poucos danos moleculares tenham sido induzidos por ambos os inseticidas nas dosagens avaliadas, é necessário cautela no uso, uma vez que as doses reais utilizadas no campo são maiores.

Palavras-chave: TUNEL, proteínas de estresse, tilápias, imunomarcação

1. INTRODUÇÃO

O uso extensivo de inseticidas tem provocado consequências sérias como a evolução da resistência dos insetos alvos. Isso acarreta na necessidade do aumento da dosagem do produto e, assim, pode implicar na perda de um composto ou até mesmo de toda a sua classe. [1, 2] Este fenômeno pode ser observado dentro de uma classe, relativamente nova, que surgiu na década de 1990 com a necessidade de se produzir compostos menos tóxicos e de diferentes modos de ação nos insetos-alvos – os fenilpirazóis. [3]

Essa classe é formada por compostos neurotóxicos que atuam nos receptores GABA (Ácido gama-aminobutírico) dos insetos, impedindo o bloqueio da passagem de íons de cloreto após o impulso nervoso. A ausência de inibição sináptica causa hiperexcitação do sistema nervoso central e provoca a morte do organismo. [4] O fipronil foi o primeiro fenilpirazol utilizado como alternativa extremamente eficiente aos inseticidas organoclorados e organofosforados. [3, 5, 6] Em contrapartida à sua efetividade inseticida, há uma gama de estudos que demonstram a toxicidade do fipronil em diversos organismos não-alvos como plantas, [7, 8] abelhas, [9, 10] crustáceos, [11, 12] peixes, [13-16] roedores, [3, 17, 18] aves [19, 20] e em humanos. [21, 22]

Com base nesta problemática, houve a necessidade de se elaborar novas substâncias que apresentassem eficácia similar ao fipronil, porém que induzissem menor toxicidade e menos danos ambientais. Nesse cenário surge o ethiprole, um inseticida de contato e ingestão fabricado para o controle de pragas de algodão, arroz, café e cana-de-açúcar com menor lipofilicidade. [23] Essa característica lhe proporciona uma toxicidade reduzida comparada ao fipronil. [24] Apesar de poucos, já existem estudos que demonstrem seus efeitos deletérios em abelhas africanizadas, [25] roedores [26, 27] e em peixes. [28]

A aplicação de agrotóxicos como o fipronil e o ethiprole é realizada principalmente no ecossistema terrestre. Desta maneira, os organismos ali presentes sofrem exposição direta aos seus diversos efeitos. No entanto, os ambientes aquáticos atuam como receptores finais de muitos desses xenobióticos. Essa "capacitação" pode ocorrer de diferentes maneiras: via aérea, carreamento superficial e derramamentos acidentais, deriva e/ou lixiviação. No caminho entre a aplicação e o ambiente aquático,

transformações físico-químicas e biológicas podem acontecer em um composto e, ainda, seu destino pode ser governado por processos de retenção e de transformação como sorção, degradação biológica e decomposição química. [29, 30]

A partir desta conjuntura, torna-se necessário atrelar aos estudos existentes com os ingredientes ativos, investigações que avaliem os efeitos desses agrotóxicos nos organismos aquáticos, uma vez que, parte dessas substâncias quase sempre encontra seu destino final em recursos hídricos. Soma-se a isso o fato de os agrotóxicos serem uma mistura, ou seja, coquetéis com adjuvantes (também chamados de outros ingredientes, inertes, co-formulantes) que proporcionam ao ingrediente ativo maior solubilidade e o protegem da degradação de modo que, consequentemente, aumente sua meia-vida e melhore sua ação pesticida. [31, 32]

Uma forma eficaz de investigar o impacto que um agrotóxico pode causar ao ambiente aquático é por meio da utilização integrada de bioindicador e biomarcador. [33] Desta forma, diminui-se a probabilidade de interpretação incorreta das informações fornecidas e oferece-se uma simulação mais realística de uma condição ambiental. [34]

Dentre os bioindicadores aquáticos destacam-se os peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), o qual tem demonstrado ser um excelente indicador ambiental mundialmente utilizado na avaliação de poluentes. [35-37] A espécie tem sido empregada na detecção de proteínas de estresse (HSPs) e de fragmentação no DNA, biomarcadores moleculares que oferecem importantes informações sobre a toxicidade dos agrotóxicos. [38-41]

Paralelo ao uso de eficientes bioindicadores, é interessante selecionar qual ferramenta de análise fornecerá as melhores respostas diante do contato com os agentes estressores e, nesse sentido, as ferramentas moleculares têm apresentado respostas bastantes satisfatórias em avaliações ambientais. As proteínas HSPs (*the heat shock proteins*) têm demonstrado participar na resposta a diversos processos fisiológicos como em casos de isquemia, aos efeitos deletérios de endotoxinas, à exposição à radiação ultravioleta, às doenças infecciosas e autoimunes, ao processo de apoptose e até em alterações homeostáticas. Por este motivo, a família HSP70, composta por chaperonas altamente conservadas, é um eficiente biomarcador por seu papel citoprotetor e por sua capacidade de sinalizar os efeitos que agentes proteotóxicos podem manifestar nos organismos a eles expostos. [39, 42-46]

Outra ferramenta de análise de contaminação ambiental que tem apresentado resultados interessantes é a avaliação de apoptose, ou morte programada da célula. Este

é um processo natural que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na homeostase dos organismos. [47] Uma de suas principais características é a clivagem do DNA genômico em pequenos fragmentos. [48, 49] De maneira geral, o método *TdTmediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL) é uma ferramenta capaz de detectar os núcleos contendo esses fragmentos de DNA através da marcação da ponta terminal dos ácidos nucleicos. [50, 51] À vista disso, o método TUNEL vem sendo empregado em trabalhos de avaliação ambiental a fim de observar esse processo de morte celular em organismos aquáticos expostos a diversos contaminantes. [52-54]

Com o intuito de simular condições realísticas da introdução de defensivos agrícolas no ambiente aquático aos agrotóxicos, esse trabalho objetivou avaliar se diluições com concentrações residuais dos compostos comerciais Regent® 800 WS e Curbix® 200 SC contendo, respectivamente, fipronil e ethiprole como ingredientes ativos, podem provocar alterações nas respostas moleculares do bioindicador aquático *O. niloticus* utilizando-se de ferramentas investigativas que avaliem a expressão da proteína de estresse HSP70 e o processo de morte celular por meio do método de TUNEL.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação dos compostos comerciais

Curbix® 200 SC e Regent® 800 WG foram comprados por meio de representantes comerciais e diluídos nos aquários em água de poço artesiano (tabela 1). As diluições foram estipuladas a partir das doses mínimas indicadas para uso em plantios novos de cana-de-açúcar pelos fabricantes dos inseticidas, no qual o ethiprole se encontra à 10mM e o fipronil à 1,22mM. Dessa forma, com o intuito de investigar doses residuais, as diluições utilizadas nos bioensaios foram 0,04, 0,02 e 0,005 mg/L de Regent® e 0,08, 0,04 e 0,02 μL/L de Curbix®.

2.2. Análises físico-químicas

Por meio da Bioagri Laboratórios LTDA – Mérieux NutriSciences, Piracicaba, São Paulo, foram realizadas análises físico-químicas das águas contendo as diferentes diluições dos inseticidas estudados nos quais os peixes foram expostos. Além da diluição de cada inseticida nos aquários, foram determinados parâmetros como: pH e metais totais. A amostragem foi realizada conforme os seguintes métodos: pH: SMWW, 22ª Edição, 2012 - Método 4500H+ B; Metais (ICP-MS): Det.: SMWW, 22ª Edição, 2012, Método

3125 B / Preparo: EPA 3010 A: 1992 e EPA 3005: 1992; fipronil e ethiprole: POP PA 076 - Rev. 15. As amostras de água foram coletadas no final, decorridas as 96 horas de bioensaio.

2.3. Animais

Tilápias do Nilo, *O. niloticus*, foram obtidas da Piscicultura Santa Cândida, Santa Cruz da Conceição, São Paulo, Brasil. Os indivíduos passaram por 15 dias de aclimatação em tanques com sistema de filtração e aeração suplementar e mantidos sob alimentação diária com ração comercial para peixes (Laguna – Ocialis) por até 24 horas antes da montagem do bioensaio.

2.4. Desenho experimental

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da UNESP- Rio Claro, São Paulo, protocolo nº 8214 de 30.09.2015 e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n 1676.899 de 15 de julho de 2009. Os peixes (n=70) de comprimento médio de 10 cm foram distribuídos em 14 tanques de 40 L, sendo divididos em: grupo controle – NC, contendo água mineral; três grupos com diferentes diluições de Regent® (0,04, 0,02 e 0,005 mg/L) e três grupos com diferentes diluições de Curbix® (0,08, 0,04 e 0,02 µL/L). O bioensaio foi realizado em réplica, por um período de 96 horas, em sistema estático com aeração contínua, sem renovação de água, com temperatura e pH dos tanques controlados. Os peixes foram mantidos em jejum durante o bioensaio. Para a coleta do fígado, os espécimes foram anestesiados com benzocaína, eutanasiados e dissecados. Os materiais foram fixados em paraformoldeído 4% e, então, deixados em tampão fosfato de sódio (pH= 7,4).

2.5. Imunomarcação de HSP70

Para aplicação da técnica, os órgãos sofreram desidratação em série crescente de álcool gelado (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100%) durante 20 minutos cada banho. Em seguida, passou por banhos de xilol + álcool, xilol (I) e (II) por mais 20 minutos cada. Após isso, os materiais foram embebidos e incluídos em parafina líquida (Paraplast). Secções de 4µm de espessura foram cortadas em série com o auxílio de um micrótomo e recolhidas em lâminas. A técnica foi realizada segundo o protocolo adaptado proposto por Silva-Zacarin et al. [55] Primeiramente, as lâminas foram desparafinizadas em soluções de xilol, xilol+álcool e álcool absoluto por 10 minutos cada e, então,

gradualmente reidratadas em série decrescente de álcool (95%, 80%, 70%, 50%) e água destilada. As secções foram permeabilizadas com Triton X-100 para garantir o livre acesso do anticorpo ao seu antígeno e, em seguida, lavadas com PBS. Para a imunomarcação da HSP70, foram utilizados o anticorpo primário monoclonal *anti heat shock protein 70* - HSP70 (Sigma-Aldrich) e o anticorpo secundário *anti mouse IgG* molécula inteira conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), incubados em câmara úmida a 37ºC, após etapa de bloqueio dos sítios inespecíficos para ligação com os respectivos anticorpos. Para a revelação da imunomarcação foi utilizado o *kit EnVision (Dako™) G|2 System/AP Rabbit/Mouse (Permanent Red)*. Nas lâminas para controle da técnica, o anticorpo primário foi omitido e não houve marcações, atestando a eficiência da detecção imuno-histoquímica de HSP70 nas demais lâminas. Os resultados obtidos foram fotografados em fotomicroscópio por meio do programa de captura de imagens *Leica Qwin Standard v.28* e analisados por meio do software *ImageJ*, que forneceu a porcentagem de área imunomarcada intensamente detectada em relação à área total do material analisado em cada secção histológica. Considera-se marcação positiva quando se observa uma cor vermelho-rosada representada pela deposição do cromógeno nos sítios de ligação antígeno-anticorpo, podendo ser de intensidade maior ou menor conforme a quantidade de proteínas da família HSP70 presente nas células; e negativa quando não se observa qualquer marcação nesta coloração.

2.6. Aplicação do método TUNEL (*TdTmediated dUTP-biotin nick end labeling*)

A aplicação do método TUNEL foi realizada por meio do *In situ Cell Death Detection Kit*. Primeiramente, os materiais foram incluídos em agarose e, posteriormente, seccionados em vibrátomo. Os cortes foram recobertos com solução de proteinase K (20 µg/mL em 10Mm Tris-HCl, pH 7,5) por 30 minutos, à 60°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, quatro vezes por dois 2 minutos. Depois disso, foi adicionada a solução de TUNEL sobre as secções histológicas tratadas, enquanto que a secção controle recebeu solução sem a enzima. As secções foram mantidas em câmara úmida por 60 minutos a 37ºC e depois lavadas em PBS, três vezes por 2 minutos. As lâminas foram montadas com o meio de montagem *Prolong Gold*. Para a realização desta técnica foram feitos controles positivo e negativo. No controle positivo, foi adicionada a DNase, para que houvesse a quebra "forçada" do DNA e ocorresse marcação. Já no controle negativo, foi adicionado apenas o anticorpo, sem a enzima, a fim de testar o Kit e verificar sua viabilidade e funcionalidade. A análise das lâminas foi realizada por meio de um

microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5 II). A aquisição das imagens foi feita por meio do software *Leica Application Suite-AF*. Todos os materiais foram fotografados com os mesmos parâmetros, sendo eles, *Smart Gain*: 1141.0 V; *Smart Offset*: 0.2%; *Pinholi*: 67.97; Line: 8; *Frame*: 2; *Resolution*: 1024×1024; *Speed:* 40 Hz; *Laser* 14% *Standy; Number of steps*: 5; *Z-volume* = 50 μm.

2.7. Análises estatísticas

Todas as avaliações realizadas neste trabalho passaram por análise de variância (p= 0.05). A normalidade e a homogeneidade dos dados foram analisadas a partir dos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente e, assim, aplicado o teste estatístico ANOVA. As análises foram performadas no software IBM SPSS statistics 25.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de peixes em estudos ecotoxicológicos tem se mostrado de grande valia, principalmente quando se tem a pretensão de conhecer os efeitos de um composto que pode ter como destino final o ambiente aquático, como os agrotóxicos. Esses potenciais agentes estressores são capazes de induzir formações de espécies reativas de oxigênio e, consequentemente, desencadear respostas subcelulares a fim de fornecer uma proteção primária ao organismo, como a ativação dos sistemas de defesa antioxidante e HSP. [56, 57]

No presente estudo, as análises de metais totais juntamente com a quantificação da concentração de ingrediente ativo presente em cada aquário estão representadas na tabela 2. Nenhum elemento foi encontrado em concentração acima do permitido para corpos d'água e águas subterrâneas, estabelecido pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) e pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

A imunomarcação da HSP70 se mostrou positiva em fígado de *O. niloticus*, demonstrando que a proteína de estresse HSP70 comumente ocorre nesse tecido. Foram visualizados poucos hepatócitos imunomarcados nos animais do grupo controle. Essas marcações demonstraram que as HSP70 são distribuídas por todo o fígado e encontradas normalmente nas células, além de atuarem como uma linha de defesa aos agentes estressantes.

Os resultados apresentados na figura 1 demonstram que não houve superexpressão significativa das imunomarcações de HSP70 nos fígados dos peixes expostos às diluições dos compostos comerciais em relação ao controle. Porém, é possível observar aumento dos níveis relativos da HSP70, com exceção dos tratamentos com 0,02 e 0,005 mg/L de Regent®. Dos grupos expostos ao Regent®, os animais expostos à menor diluição apresentaram maior aumento dos níveis de HSP70. Diferentemente, o grupo com a maior diluição de Curbix® apresentaram a maior expressão de HPS70 aconteceu na maior diluição.

O papel da HSP70 está intimamente relacionado ao controle de qualidade da célula, de modo que sua superprodução implique no aumento da atividade antiapoptótica. [58] No fígado, a expressão do gene que codifica a HSP70 está ligada ao desencadeamento de respostas antioxidantes e de desintoxicação. Em condições normais, as HSP70 são mais concentradas no citosol do hepatócito. O aumento de radicais livres pode induzir a expressão do RNAm de HSP70 e, consequentemente, o aumento da produção de HSP70. Esse estresse também pode levar a translocação de HSP70 para o núcleo e para a membrana mitocondrial. [39, 59, 60] É possível que a baixa produção de HSP70 no fígado dos animais expostos aos inseticidas seja devido à escolha de diluições residuais neste estudo.

Concomitantemente às análises de marcadores de estresse celular qualitativo realizadas nos fígados das tilápias expostas aos inseticidas, o método de TUNEL foi utilizado a fim de avaliar se houve variação na quantidade de fragmentação do DNA desses animais após exposição aos fenilpirazóis.

A marcação fluorescente pelo método de TUNEL se mostrou positiva no fígado das tilápias, confirmada pela validação dos resultados nos controles negativo e positivo da técnica. De acordo com os resultados obtidos, as diluições de Regent® e Curbix® usadas nesse estudo também não induziram danos significativos nos peixes expostos (Figura 2). Contudo, foi observado maior número de imunomarcação nos tecidos hepáticos dos animais expostos aos tratamentos. Em ambos os inseticidas, os danos foram aumentados à medida que as diluições foram diminuídas, com exceção das menores diluições no qual apresentaram imunomarcação semelhante ao controle.

Perante ao exposto, as diluições elegidas como uma simulação das diluições que podem alcançar o ambiente aquático não foram capazes de induzir dano molecular significativo nos peixes da espécie *O. niloticus* no período de 96 horas. Apesar disso, é importante enfatizar que houve aumento de fragmentação do DNA nos organismos

expostos aos inseticidas e que as maiores diluições testadas neste estudo equivalem à aproximadamente 0,006% e 0,0004% das menores diluições indicadas para uso em campo dos produtos comerciais Regent® e Curbix®, respectivamente.

Além disso, a similaridade dos níveis de danos que os inseticidas causaram ao material genético dos peixes merece destaque, uma vez que as doses avaliadas do Regent® eram cerca de 15 vezes maiores que as doses avaliadas do Curbix®. Esse fato vai na contramão dos estudos realizados por Vidau et al., [24] que ao investigarem os efeitos citotóxicos dos fenilpirazóis em células epiteliais humanas Caco-2 puderam observar menor toxicidade do ethiprole em relação ao fipronil. O mesmo foi constatado quando a toxicidade de contato de ambos os inseticidas foi comparada em diferentes espécies de vespas do gênero *Trichogramma*, insetos mundialmente utilizados como controle biológico de pragas. [62-65]

Essa divergência entre os efeitos do ingrediente ativo sozinho e do composto comercial enfatiza a necessidade de maiores estudos sobre o comportamento potencializado dessas substâncias quando utilizadas em misturas, que é caso dos produtos testados neste estudo.

4. CONCLUSAO

As diluições avaliadas no presente estudo não induziram uma superprodução significativa de proteínas HSP70 nos animais expostos. Contudo, foi observada maior presença de células apoptóticas nos grupos tratados com os compostos comerciais. Embora tenham sido usadas doses 15 vezes menores que o Regent®, a exposição ao Curbix® gerou danos similares ao seu análogo. Além de eficazes, o método TUNEL e a imunomarcação da HSP70 se mostraram ferramentas complementares para a avaliação dos efeitos moleculares das baixas dosagens dos inseticidas comerciais contendo fipronil e ethiprole em *O. nilocitus*.

5. REFERÊNCIAS

[1] Georghiou, G.P. The evolution of resistance to pesticides. Annu. Rev. Ecol. Syst. 1972, 3, 133–168.

[2] Georghiou, G.P. Overview of insecticide resistance. Acs. Sym. Ser. 1990, 421, 18–41.

[3] Tingle, C.C.D.; Rother, J.A.; Dewhurst, C.F.; Lauer, S.; King, W.J. Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. In Reviews of environmental contamination and toxicology: Continuation of residue reviews; Ware, G.W., Ed.Springer New York: New York, NY, 2003; 1–66.
[4] Cole, L.M.; Nicholson, R.A.; Casida, J.E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. Pestic. Biochem. Physiol. 1993, 46(1), 47–54.
[5] Ikeda, T.; Nagata, K.; Kono, Y.; Yeh, J.Z.; Narahashi, T. Fipronil modulation of GABAA receptor single-channel currents. Pest Manag. Sci. 2004, 60(5), 487–492.
[6] Theodoridis, G. Chapter 4 Fluorine-containing agrochemicals: An Overview of recent developments. 2006; 121–175 pp.
[7] Ahemad, M.; Saghir Khan, M. Comparative study of the growth parameters of legumes grown in fipronil-stressed soils. EurAsian J. Biosci. 2011, 36(May), 29–36.
[8] Yildirim, N.; Agar, G. Determination of genotoxic effects of fipronil in *Vicia faba* using random amplified polymorphic DNA analysis. Toxicol. Ind. Health 2016, 32(8), 1450–1455.
[9] Roat, T.C.; Carvalho, S.M.; Nocelli, R.C.F.; Silva-Zacarin, E.C.M.; Palma, M.S.; Malaspina, O. Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of africanized honeybees. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2013, 64(3), 456–466.
[10] Silva, C.A.S.; Silva-Zacarin, E.C.M.; Domingues, C.E.C.; Abdalla, F.C.; Malaspina, O.; Nocelli, R.C.F. In Fipronil effect on the frequency of anomalous brood in honeybee reared in, Hazards of pesticides to bees - 12th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group: Ghent (Belgium), 2015.
[11] Advisory Committee on Pesticides. Evaluation of the fipronil use as a public hygiene insecticide. Food and Environment Protection Act 1985, part III. Control of Pesticides Regulations 1986. 187. 1999, 52. Pesticides Safety Directorate, MAFF, York, UK, July.
[12] Chandler, G.T.; Cary, T.L.; Volz, D.C.; Walse, S.S.; Ferry, J.L.; Klosterhaus, S.L. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: A rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. Environ. Toxicol. Chem. 2004, 23(1), 117–124.
[13] Beggel, S.; Werner, I.; Connon, R.E.; Geist, J.P. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). Sci. Total Environ. 2010, 408(16), 3169–3175.

[14] Beggel, S.; Werner, I.; Connon, R.E.; Geist, J.P. Impacts of the phenylpyrazole insecticide fipronil on larval fish: Time-series gene transcription responses in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following short-term exposure. Sci. Total Environ. 2012.
[15] Ghisi, N.D.C.; Ramsdorf, W.A.; Ferraro, M.V.M.; Almeida, M.I.M. de; Ribeiro, C.A.D.O.; Cestari, M.M. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. Environ. Monit. Assess. 2011, 180(1–4), 589–599.
[16] El-Murr, A.; Imam, T.S.; Ghonimi, W.A. Histopathological, Immunological, Hematological and biochemical effects of fipronil on Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*).
[17] Oliveira, P.R. De; Bechara, G.H.; Denardi, S.E.; Oliveira, R.J.; Mathias, M.I.C. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. Exp. Toxicol. Pathol. 2012, 64(6), 569–573.
[18] Magalhães, J.Z.; Udo, M.S.B.; Sánchez-Sarmiento, A.M.; Carvalho, M.P.N.; Bernardi, M.M.; Spinosa, H.S. Prenatal exposure to fipronil disturbs maternal aggressive behavior in rats. Neurotoxicol. Teratol. 2015, 52, 11–16.
[19] Kitulagodage, M.; Isanhart, J.; Buttemer, W.A.; Hooper, M.J.; Astheimer, L.B. Fipronil toxicity in northern bobwhite quail *Colinus virginianus*: Reduced feeding behaviour and sulfone metabolite formation. Chemosphere 2011, 83(4), 524–530.
[20] Kitulagodage, M.; Buttemer, W.A.; Astheimer, L.B. Adverse effects of fipronil on avian reproduction and development: maternal transfer of fipronil to eggs in zebra finch *Taeniopygia guttata* and in ovo exposure in chickens *Gallus domesticus*. Ecotoxicology 2011, 20(4), 653–660.
[21] Hainzl, D.; Cole, L.M.; Casida, J.E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. Chem. Res. Toxicol. 1998, 11(12), 1529–1535.
[22] Tisch, M.; Faulde, M.; Maier, H. Genotoxische effekte aktuell gebräuchlicher insektizide auf humane Tonsillenschleimhautepithelien. HNO 2007, 55(S01), E15–E22.
[23] Caboni, P.; Sammelson, R.E.; Casida, J.E. Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: Ethiprole compared with fipronil. J. Agric. Food Chem. 2003, 51(24), 7055–7061.

[24] Vidau, C.; Brunet, J.L.; Badiou, A.; Belzunces, L.P. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. Toxicol. Vitr. 2009, 23(4), 589–597.
[25] Sharma, D.; Abrol, D. Effect of insecticides on foraging behaviour and pollination role of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) on toria (*Brassica campestris* var. toria) crop. Egypt. J. Biol. 2014, 16(1), 79–86.
[26] Tanaka, T.; Inomata, A. Reproductive and neurobehavioral effects of ethiprole administered to mice in the diet. Birth Defects Res. 2017, 109(19), 1568–1585.
[27] Tanaka, T.; Suzuki, T.; Inomata, A. Reproductive and neurobehavioral effects of maternal exposure to ethiprole in F1-generation mice. Birth Defects Res. 2018, 110(3), 259–275.
[28] Guedes, T.; Fontanetti, C. Investigation of the action of ethiprole in non-target organisms using *Oreochromis niloticus* as a bioindicator. Toxicol. Lett. 2014, 229, S130–S131.
[29] Silva, C.M.M. de S.; Fay, E.F. Comportamento e destino de agrotóxicos no ambiente solo-água. In Agrotóxicos e Ambiente; Silva, C.M.M. de S., Fay, E.F., Eds.Embrapa Informação Tecnológica: Brasilia, 2004; 107–143.
[30] Diez, M. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. J. soil Sci. plant Nutr. 2010, 10(3), 244–267.
[31] Travlos, I.; Cheimona, N.; Bilalis, D. Glyphosate efficacy of different salt formulations and adjuvant additives on various weeds. Agronomy 2017, 7(3), 60.
[32] Mesnage, R.; Antoniou, M.N. Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. Front. Public Heal. 2018, 5(January), 1–8.
[33] Reynolds, W.J.; Feist, S.W.; Jones, G.J.; Lyons, B.P.; Sheahan, D.A.; Stentiford, G.D. Comparison of biomarker and pathological responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination. Chemosphere 2003, 52(7), 1135–1145.
[34] Pacheco, M.; Santos, M.A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicol. Environ. Saf. 2002, 53(3), 331–347.
[35] Ansoar-rodríguez, Y.; Christofoletti, C.A.; Marcato, A.C.; Correia, J.E.; Bueno, O.C.; Malaspina, O.; Fontanetti, C.S. Genotoxic potential of the insecticide imidacloprid in a non-target organism (*Oreochromis niloticus*-Pisces). J. Environ. Prot. (Irvine, Calif). 2015, 6(December), 1360–1367.

[36] Correia, J.E.; Christofoletti, C.A.; Ansoar-Rodríguez, Y.; Guedes, T.A.; Fontanetti, C.S. Comet assay and micronucleus tests on *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) exposed to raw sugarcane vinasse and to phisicochemical treated vinasse by pH adjustment with lime (CaO). Chemosphere 2017, 173, 494–501.
[37] AnvariFar, H.; Amirkolaie, A.K.; Jalali, A.M.; Miandare, H.K.; Sayed, A.H.; Üçüncü, S.İ.; Ouraji, H.; Ceci, M.; Romano, N. Environmental pollution and toxic substances: Cellular apoptosis as a key parameter in a sensible model like fish. Aquat. Toxicol. 2018, 204, 144–159.
[38] Piner, P.; Üner, N. Oxidative and apoptotic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonyl butoxide in the liver of *Oreochromis niloticus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2012, 33(3), 414–420.
[39] Ansoar-Rodríguez, Y.; Christofoletti, C.A.; Correia, J.E.; Souza, R.B. de; Moreira-de-Sousa, C.; Marcato, A.C. de C.; Bueno, O.C.; Malaspina, O.; Silva-Zacarin, E.C.M.; Fontanetti, C.S. Liver alterations in *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: Histopathology and heat shock protein in situ localization. J. Environ. Sci. Heal. Part B 2016, 51(12), 881–887.
[40] Jia, R.; Li, Y.; Cao, L.; Du, J.; Zheng, T.; Qian, H.; Gu, Z.; Jeney, G.; Xu, P.; Yin, G. Antioxidative, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of resveratrol on oxidative stress-induced liver damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol. 2019, 215, 56–66.
[41] Meng, S.L.; Liu, T.; Chen, X.; Qiu, L.P.; Hu, G.D.; Song, C.; Fan, L.; Zheng, Y.; Chen, J.Z.; Xu, P. Effect of chronic exposure to methomyl on tissue damage and apoptosis in testis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and recovery pattern. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2019, 102(3), 371–376.
[42] Xing, H.; Li, S.; Wang, X.; Gao, X.; Xu, S.; Wang, X. Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of HSP70 and HSC70 in the liver, brain, kidney and gill of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Chemosphere 2013, 90(3), 910–916.
[43] Chadwick, J.G.; Nislow, K.H.; McCormick, S.D. Thermal onset of cellular and endocrine stress responses correspond to ecological limits in brook trout, an iconic cold-water fish. Conserv. Physiol. 2015, 3(1), 1–12.
[44] Coelho, M.P.M.; Moreira-de-Sousa, C.; Souza, R.B. de; Ansoar-Rodríguez, Y.; Silva-Zacarin, E.C.M.; Fontanetti, C.S. Toxicity evaluation of vinasse and biosolid samples in diplopod midgut: heat shock protein in situ localization. Environ. Sci. Pollut. Res. 2017, 24(27), 22007–22017.

[45] Coelho, M.P.M.; Correia, J.E.; Vasques, L.I.; Marcato, A.C. de C.; Guedes, T. de A.; Soto, M.A.; Basso, J.B.; Kiang, C.; Fontanetti, C.S. Toxicity evaluation of leached of sugarcane vinasse: Histopathology and immunostaining of cellular stress protein. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2018, 165(April), 367–375.
[46] Moreira-de-Sousa, C.; Souza, R.B. de; Fontanetti, C.S. HSP70 as a biomarker: an excellent tool in environmental contamination analysis - A review. Water, Air, Soil Pollut. 2018, 229(8), 264.
[47] Wyllie, A.H.; Kerr, J.F.R.; Currie, A.R. Cell death: The significance of apoptosis. In International review of cytology; 1980; 251–306.
[48] Arends, M.J.; Morris, R.G.; Wyllie, A.H. Apoptosis. The role of the endonuclease. Am. J. Pathol. 1990, 136(3), 593–608.
[49] Bortner, C.D.; Oldenburg, N.B.E.; Cidlowski, J.A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. Trends Cell Biol. 1995, 5(1), 21–26.
[50] Gavrieli, Y. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. 1992, 119(3), 493–501.
[51] Gorczyca, W.; Gong, J.; Darzynkiewicz, Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. Cancer Res. 1993, 53(8), 1945–1951.
[52] Luzio, A.; Monteiro, S.M.; Fontaínhas-Fernandes, A.A.; Pinto-Carnide, O.; Matos, M.; Coimbra, A.M. Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. Aquat. Toxicol. 2013, 128, 183–189.
[53] Macirella, R.; Tripepi, M.; Brunelli, E. Morphological and immunohistochemical modifications in zebrafish (*Danio rerio*) gills after short-term exposure to the fungicide tebuconazole. Zebrafish 2019, 16(1), 65–76.
[54] Strungaru, S.-A.; Plavan, G.; Ciobica, A.; Nicoara, M.; Robea, M.A.; Solcan, C.; Petrovici, A. Toxicity and chronic effects of deltamethrin exposure on zebrafish (*Danio rerio*) as a reference model for freshwater fish community. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019, 171, 854–862.
[55] Silva-Zacarin, E.C.M.; Chauzat, M.P.; Zeggane, S.; Drajnudel, P.; Schurr, F.; Faucon, J.P. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. Curr. Microsc. Contrib. to Adv. Sci. Technol. 2012, 696–703.
[56] Miller-Morey, J.S.; Dolah, F.M. Van. Differential responses of stress proteins, antioxidant enzymes, and photosynthetic efficiency to physiological stresses in the

Florida red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 2004, 138(4), 493–505.
[57] Giri, S.S.; Sen, S.S.; Jun, J.W.; Sukumaran, V.; Park, S.C. Immunotoxicological effects of cadmium on *Labeo rohita*, with emphasis on the expression of HSP genes. Fish Shellfish Immunol. 2016, 54, 164–171.
[58] Yamashita, M.; Yabu, T.; Ojima, N. Stress protein HSP70 in fish. Aqua-BioScience Monogr. 2010, 3(4), 111–141.
[59] Weber, L.P.; Diamond, S.L.; Bandiera, S.M.; Janz, D.M. Expression of HSP70 and CYP1A protein in ovary and liver of juvenile rainbow trout exposed to β-naphthoflavone. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 2002, 131(3), 387–394.
[60] Kampinga, H.H.; Craig, E.A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010, 11(8), 579–592.
[61] Beere, H.M.; Wolf, B.B.; Cain, K.; Mosser, D.D.; Mahboubi, A.; Kuwana, T.; Tailor, P.; Morimoto, R.I.; Cohen, G.M.; Green, D.R. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. Nat. Cell Biol. 2000, 2(8), 469–475.
[62] Wang, Y.; Chen, L.; Yu, R.; Zhao, X.; Wu, C.; Cang, T.; Wang, Q. Insecticide toxic effects on *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Pest Manag. Sci. 2012, 68(12), 1564–1571.
[63] Wang, Y.; Yu, R.; Zhao, X.; Chen, L.; Wu, C.; Cang, T.; Wang, Q. Susceptibility of adult *Trichogramma nubilale* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to selected insecticides with different modes of action. Crop Prot. 2012, 34, 76–82.
[64] Wang, Y.; Chen, L.; An, X.; Jiang, J.; Wang, Q.; Cai, L.; Zhao, X. Susceptibility to selected insecticides and risk assessment in the insect egg parasitoid *Trichogramma confusum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). J. Econ. Entomol. 2013, 106(1), 142–149.
[65] Wang, Y.; Wu, C.; Cang, T.; Yang, L.; Yu, W.; Zhao, X.; Wang, Q.; Cai, L. Toxicity risk of insecticides to the insect egg parasitoid *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Pest Manag. Sci. 2014, 70(3), 398–404.

Tabela 1. Concentrações dos compostos comerciais e seus respectivos ingredientes ativos utilizados neste projeto

	Bioensaio com *O. niloticus*	
	Composto	Ingrediente ativo
Regent®	0,04 mg/L	0,061 μM
	0,02 mg/L	0,036 μM
	0,005 mg/L	0,01 μM
Curbix®	0,08 μL/L	0,037 μM
	0,04 μL/L	0,023 μM
	0,02 μL/L	0,011 μM

Tabela 2. Valores dos parâmetros avaliados na caracterização da água e das diluições dos inseticidas Regent® e Curbix® nas quais os peixes *O. niloticus* foram submetidos

Parâmetros	Controle	Regent® 200 SC			Curbix® 800 WG		
		0,04 mg/L	0,02 mg/L	0,005 mg/L	0,08 µL/L	0,04 µL/L	0,02 µL/L
Ingrediente ativo	-	26,8 µg/L	15,8 µg/L	3,85 µg/L	14,7 µg/L	9,05 µg/L	4,25 µg/L
pH	7,72	7,90	7,94	7,83	8,04	7,91	7,89
Prata (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Alumínio (mg/L)	0,027	0,022	0,028	0,021	0,022	0,018	0,023
Arsênio (mg/L)	0,018	0,016	0,016	0,016	0,016	0,017	0,016
Boro (mg/L)	0,006	0,006	0,007	0,007	0,006	0,006	0,007
Bário (mg/L)	0,029	0,032	0,031	0,033	0,033	0,034	0,034
Berílio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bismuto (mg/L)	< LQ	0,012	0,013	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cálcio (mg/L)	8,50	8,42	8,23	8,63	8,36	8,82	8,69
Cádmio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cobalto (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cromo (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cobre (mg/L)	< LQ	< LQ	0,001	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Ferro (mg/L)	0,018	0,011	0,020	0,028	0,024	0,014	0,022
Potássio (mg/L)	0,809	0,843	0,752	0,836	0,792	0,835	0,843
Lítio (mg/L)	0,010	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013
Magnésio (mg/L)	3,10	3,16	3,01	3,19	3,07	3,29	3,16
Manganês (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Molibdênio (mg/L)	0,001	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001
Sódio (mg/L)	28,6	28,7	27,2	28,3	27,4	29,1	28,3
Níquel (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Mercúrio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Chumbo (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Antimônio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Selênio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Silício (mg/L)	12,0	11,9	11,7	12,0	11,9	12,2	12,1
Estanho (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Estrôncio (mg/L)	0,039	0,041	0,040	0,042	0,041	0,043	0,042
Titânio (mg/L)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Tálio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Urânio (mg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Vanádio (mg/L)	0,001	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001
Zinco (mg/L)	< LQ	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005

LQ**:** Limite de quantificação. Método 1060 e POP LB 010 para matrizes líquidas, CETESB 6300.

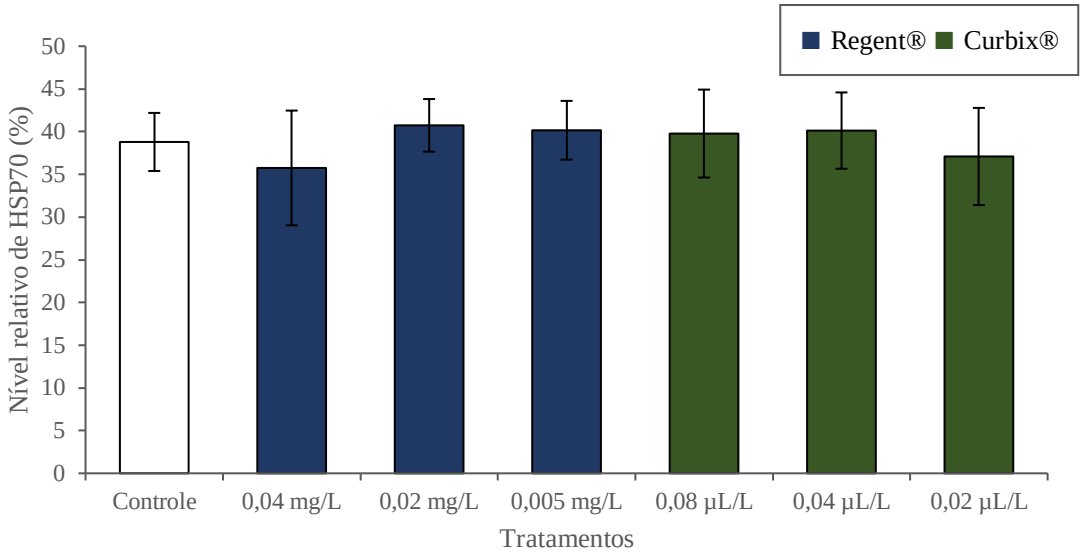

Figura 1. Porcentagem média e desvio padrão de HSP70 no fígado de peixes da espécie *O. niloticus* expostos aos inseticidas Regent® e Curbix®, observada por meio de microscópio ótimo e analisada por meio do software *ImageJ*

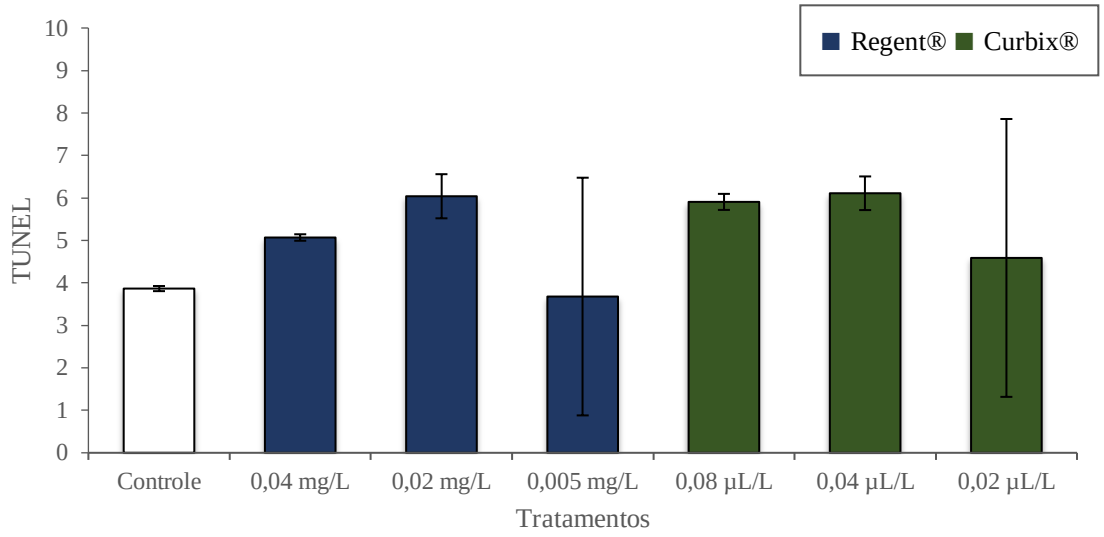

Figura 2. Detecção de fragmentação de DNA no fígado de *O. niloticus* expostos aos inseticidas Regent® e Curbix®. Utilizou-se o método de marcação TUNEL observados por meio do programa de captura de imagens *Leica Qwin Standard v.28* e analisados por meio do software *ImageJ*

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nas análises realizadas e nos dados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- As maiores concentrações do Curbix® apresentaram efeito tóxico sobre as sementes de *A. cepa*, reduzindo sua germinação e diminuindo o alongamento das raízes emergidas sugerindo um efeito subletal deste composto. Por outro lado, as sementes de *L. sativa* expostas às três menores concentrações de Regent® e Curbix® sofreram aumento no IVG, bem como no alongamento de suas raízes. Por esta análise, concluímos que o Curbix® (ethiprole) foi mais tóxico que o Regent® (fipronil).
- A análise morfológica realizada em fígado de *O. niloticus* demonstrou que tanto o Regent® como o Curbix® induziram alterações hepáticas pontuais, porém não significativas estatisticamente, com exceção da presença de núcleos picnóticos nos animais expostos ao Regent®.
- As maiores diluições testadas dos dois inseticidas induziram peroxidação lipídica nos animais expostos.
- As HSP70 atuaram como barreira ao estresse oxidativo causado pelos inseticidas.
- Não foram observadas fragmentações de DNA estatisticamente significativas nos animais expostos sugerindo que a presença dos inseticidas na água não induziu o processo de morte celular no fígado dos animais.
- O Curbix® se comportou similarmente ao Regent® sobre *O. niloticus* e apresentou maior potencial de dano sobre *A. cepa* nas concentrações avaliadas neste estudo.
- Diante do apresentado, concluímos que o uso do Curbix® como alternativa ao Regent® é perigoso, uma vez que, embora tenham sido usadas doses 15 vezes menores que o Regent®, a exposição ao Curbix® gerou danos similares ao seu análogo em peixes e acarretou a danos maiores em plantas.

5. REFERÊNCIAS

AAJOUD, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2003.

AHEMAD, M.; SAGHIR KHAN, M. Comparative study of the growth parameters of legumes grown in fipronil-stressed soils. **EurAsian Journal of Biosciences**, v. 36, p. 29–36, 2011.

AL-SHAMSI, L.; HAMZA, W.; EL-SAYED, A.-F. Effects of food sources on growth rates and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 9, n. 4, p. 447–455, 2006.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S.; CAMPOS, J. M. S.; AZEVEDO, H. Genotoxicity of SPL (spent pot lining) as measured by Tradescantia bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7, p. 2065–2069, 2011.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; PALMIERI, M. J.; DAVIDE, L. C. Effects of long exposure to spent potliner on seeds, root tips, and meristematic cells of *Allium cepa* L. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 10, p. 489, 2017.

ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; MARCATO, A. C.; CORREIA, J. E.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FONTANETTI, C. S. genotoxic potential of the insecticide imidacloprid in a non-target organism (*Oreochromis niloticus*-Pisces) *. **Journal of Environmental Protection**, v. 6, p. 1360–1367, 2015.

ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; CORREIA, J. E.; DE SOUZA, R. B.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; MARCATO, A. C. C.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; FONTANETTI, C. S. Liver alterations in *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: Histopathology and heat shock protein in situ localization. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 51, n. 12, p. 881–887, 2016.

ARANA, S.; ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; GUEDES, T. de A.; MARCATO, A. C. de C.; CORREIA, J. E.; FONTANETTI, C. S. Peixes como bioindicadores do impacto no ambiente aquático induzido por agrotóxicos empregados no cultivo da cana-de-açúcar. In: FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (Eds.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru: Canal 6, 2017. p. 229–250.

ARTHUR, F. H. Efficacy of ethiprole applied alone and in combination with conventional insecticides for protection of stored wheat and stored corn. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 6, p. 1314–1318, 2002.

ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, M.; AHMAD, W. Induction of

micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 518, n. 2, p. 135-144, 2002.

BADGUJAR, P. C.; CHANDRATRE, G. A.; PAWAR, N. N.; TELANG, A. G.; KURADE, N. P. Fipronil induced oxidative stress involves alterations in SOD1 and catalase gene expression in male mice liver: Protection by vitamins E and C. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 9, p. 1147-1158, 2016.

BEGGEL S.; WERNER I.; CONNON R. E.; GEIST, J. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3169-3175, 2010

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25–34, 1999.

BONCIU, E.; FIRBAS, P.; FONTANETTI, C. S.; WUSHENG, J.; KARAISMAILOĞLU, M. C.; LIU, D.; MENICUCCI, F.; PESNYA, D. S.; POPESCU, A.; ROMANOVSKY, A. V.; SCHIFF, S.; ŚLUSARCZYK, J.; DE SOUZA, C. P.; SRIVASTAVA, A.; SUTAN, A.; PAPINI, A. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191–209, 2018.

BONMATIN, J. M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E. A.; NOOME, D. A.; SIMON-DELSO, N.; TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35–67, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in enzymology**. Elsevier, 1978. v. 52p. 302–310.

CABONI, P.; SAMMELSON, R. E.; CASIDA, J. E. phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: Ethiprole compared with fipronil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7055–7061, 2003.

CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V.; VELOSO, C. M.; SILVA, F. F.; CARVALHO, B. M. A. Silagem de resíduo de peixes em dietas para alevinos de tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 126–130, 2006.

ÇELIK, Ayla et al. In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. **DNA and cell biology**, v. 33, n. 3, p. 148-154, 2014.

CHANDLER, G. T.; CARY, T. L.; VOLZ, D. C.; WALSE, S. S.; FERRY, J. L.; KLOSTERHAUS, S. L. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: A rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 117–124, 2004.

CHATON, P. F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M.; MEYRAN, J. C. Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding sites. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 1, p. 8–12, 2002.

CHOI, J. E.; KIM, S.; AHN, J. H.; YOUN, P.; KANG, J. S.; PARK, K.; YI, J.; RYU, D.-Y. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 151–159, 2010.

CHOU, C.-H.; LIN, H.-J. Autointoxication mechanism of *Oryza sativa* I. Phytotoxic effects of decomposing rice residues in soil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, n. 3, p. 353–367, 1976.

CHOU, C.; HUANG, A.; HUANG, Y.; LIN, W.; LEE, C. Impacts of water-pollution on crop growth in Taiwan. The detrimental effects of industrial-waste waters from dye, livestock, plating, leather, synthetic-fiber, food, and fertilizer factories in Taiwan. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 22, n. 1, p. 9–33, 1981.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C. S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 155–158, 2009.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 224, n. 4, 2013.

CLASEN, B.; LORO, V. L.; CATTANEO, R.; MORAES, B.; LÓPES, T.; DE AVILA, L. A.; ZANELLA, R.; REIMCHE, G. B.; BALDISSEROTTO, B. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice-fish cultivation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 77, p. 45-51, 2012.

CLASEN, B.; LORO, V. L.; MURUSSI, C. R.; TIECHER, T. L.; MORAES, B.; ZANELLA, R. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 737-743,

2018.

COELHO, M. P. M.; CORREIA, J. E.; VASQUES, L. I.; MARCATO, A. C. de C.; GUEDES, T. de A.; SOTO, M. A.; BASSO, J. B.; KIANG, C.; FONTANETTI, C. S. Toxicity evaluation of leached of sugarcane vinasse: Histopathology and immunostaining of cellular stress protein. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 165, p. 367–375, 2018.

COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A.; CASIDA, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-Gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, n. 1, p. 47–54, 1993.

CONCEIÇÃO, M.; PROTTI, B. Genotoxicity of selected pesticides in the Hen's Egg Test for Micronucleus Induction. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 1, 2012.

COSTA, R. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1083–1099, 2003.

DAS, P. C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R. L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, n. 3, p. 200–214, 2006.

DE OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Cytotoxicity of fipronil on mice liver cells. **Microscopy Research and Technique**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 28–35, 2011.

DE OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 6, p. 569–573, 2012a.

DE OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Cytotoxicity of fipronil on mice liver cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 1, p. 28–35, 2012b.

DE SOUZA, C. P.; GUEDES, T. de A.; FONTANETTI, C. S. Evaluation of herbicides action on plant bioindicators by genetic biomarkers: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 12, p. 694, 2016,

EL-MURR, A. E.; HAKIM Y, T. S. I.; GHONIMI, W. A. Histopathological, immunological, hematological and biochemical effects of fipronil on Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*). **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 06, n. 05, p. 1–9, 2015.

ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.;

NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 43–50, 1998.

EVANS, M. D.; COOKE, M. S. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. **BioEssays**, v. 26, n. 5, p. 533–542, 2004.

FERREIRA, M.; DE OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; MATHIAS, M. I. C. Action of the chemical agent fipronil (active ingredient of acaricide Frontline®) on the liver of mice: An ultrastructural analysis. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 2, p. 197–205, 2012.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985.

FONTANETTI, C. S.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; PEREZ, D. G.; MAZIVIERO, G. Bioindicators and biomarkers in the assessment of soil toxicity. In: PASCUCCI, S. (Ed.). **Soil Contamination**. Rijeka: InTech, 2011. p. 143–168.

FUNG, H. T.; CHAN, K. K.; CHING, W. M.; KAM, C. W. A case of accidental ingestion of ant bait containing fipronil. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 245–248, 2003.

FUZINATTO, C. F.; FLOHR, L.; MELEGARI, S. P.; MATIAS, W. G. Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 103–109, 2013.

GOFF, A. D.; SARANJAMPOUR, P.; RYAN, L. M.; HLADIK, M. L.; COVI, J. A.; ARMBRUST, K. L.; BRANDER, S. M. The effects of fipronil and the photodegradation product fipronil desulfinyl on growth and gene expression in juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*, at different salinities. **Aquatic Toxicology**, v. 186, p. 96–104, 2017.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in Allium. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273–291, 1982.

GUEDES, T.; FONTANETTI, C. Investigation of the action of ethiprole in non-target organisms using *Oreochromis niloticus* as a bioindicator. **Toxicology Letters**, v. 229, p. S130–S131, 2014.

GUEDES, T. A. **Investigação dos efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Curbix® 200SC (ethiprole) em organismos não alvos**. Universidade Estadual Paulista, 2015.

HAINZL, D.; COLE, L. M.; CASIDA, J. E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 12, p. 1529–1535, 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERDIGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology & Medicine**. Fifth ed. United Kingdom: Oxford University Press, 2015.

HAMPTON, J. A.; CLARK LANTZ, R.; GOLDBLATT, P. J.; LAUREN, D. J.; HINTON, D. E. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver: II. The biliary system. **The Anatomical Record**, v. 221, n. 2, p. 619–634, 1988.

HARSHBARGER, J. C.; CLARK, U. J. B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America. **Science of the Total Environment**, v. 94, n. 1–2, p. 1–32, 1990.

HEGAZI, M. M.; ATTIA, Z. I.; ASHOUR, O. A. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 99, n. 2, p. 118–125, 2010.

HOCHSTEIN, P.; JAIN, S. K. Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. **Federation proceedings**, v. 40, n. 2, p. 183–8, 1981.

HURLEY, Pamela M. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. **Environmental health perspectives**, v. 106, n. 8, p. 437-445, 1998.

JACOB, C. R.; SOARES, H. M.; NOCELLI, R. C.; MALASPINA, O. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Pest Management Science,** v. 71, n. 1, p. 114-122, 2015.

JENNINGS, K. A.; CANERDY, T. D.; KELLER, R. J.; ATIEH, B. H.; DOSS, R. B.; GUPTA, R. C. Human exposure to fipronil from dogs treated with frontline. **Veterinary and human toxicology**, v. 44, n. 5, p. 301-303, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. Técnicas básicas de citologia e histologia. In: JUNQUEIRA, G. J. P. (Ed.). **São Paulo: Santos**. Santos: São Paulo, 1983. p. 102.

KAVIRAJ, A.; GUPTA, A. Biomarkers of type II synthetic pyrethroid pesticides in freshwater fish. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

KITULAGODAGE, M.; BUTTEMER, W. A.; ASTHEIMER, L. B. Adverse effects of fipronil on avian reproduction and development: maternal transfer of fipronil to eggs in zebra finch *Taeniopygia guttata* and in ovo exposure in chickens *Gallus domesticus*. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 653–660, 2011.

KITULAGODAGE, M.; ISANHART, J.; BUTTEMER, W. A.; HOOPER, M. J.; ASTHEIMER, L. B. Fipronil toxicity in northern bobwhite quail *Colinus virginianus*: Reduced feeding behaviour and sulfone metabolite formation. **Chemosphere**, v. 83, n. 4, p.

524–530, 2011.
KUMARAN, N.; KUMAR, B. V.; BOOMATHI, N.; KUTTALAM, S.; GUNASEKARAN, K. Non-target effect of ethiprole 10 SC to predators of rice planthoppers. **Madras Agricultural Journal**, v. 96, n. 1/6, p. 208-212, 2009.
LEGHAIT, J.; GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN, N.; CAMP, M., PERDU, E.; TOUTAIN, P. L.; VIGUIÉ, C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v. 255, n. 1-2, p. 38-44, 2009.
LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.
LEWIS, M. Algae and vascular plant tests. In: G. RAND (Ed.). **Aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment**. USA: Taylor & Francis Publishers, 1995. p. 135–169.
LIU, S.; YANG, C.; XIE, W.; XIA, C.; FAN, P. The Effects of cadmium on germination and seedling growth of *Suaeda salsa*. **Procedia Environmental Sciences**, v. 16, p. 293–298, 2012.
LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. F. Programmed cell death: New thoughts and relevance to aging. **Journal of Gerontology**, v. 45, n. 5, p. B135–B140, 1990.
LOGHMAN, A. Histopathologic and apoptotic effect of nanosilver in liver of broiler chickens. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 22, p. 6207–6211, 2012.
MAHROUS, K. F.; HASSAN, A. M.; RADWAN, H. A.; MAHMOUD, M. A. Inhibition of cadmium- induced genotoxicity and histopathological changes in Nile tilapia fish by Egyptian and Tunisian montmorillonite clay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 140–147, 2015.
MAKSYMIV, I. V.; HUSAK, V. V.; MOSIICHUK, N. M.; MATVIISHYN, T. M.; SLUCHYK, I. Y.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Hepatotoxicity of herbicide Sencor in goldfish may result from induction of mild oxidative stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 122, p. 67–75, 2015.
MARGARIDO, T. C. S.; FELÍCIO, A. A.; DE CERQUEIRA ROSSA-FERES, D.; ALVES DE ALMEIDA, E. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 61–67, 2013.
MARINHO, J. F. U.; CORREIA, J. E.; MARCATO, A. C. de C.; PEDRO-ESCHER, J.;

FONTANETTI, C. S. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239–245, 2014.

MOFFAT, A. New chemicals seek to outwit insect pests. **Science**, v. 261, n. 5121, p. 550–551, 1993.

MOHAMED, F.; SENARATHNA, L.; PERCY, A.; ABEYEWARDENE, M.; EAGLESHAM, G.; CHENG, R.; AZHER, S.; HITTARAGE, A.; DISSANAYAKE, W.; SHERIFF, M. R.; DAVIES, W.; BUCKLEY, N.; EDDLESTON, M. Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil –A GABA A -gated chloride channel blocker europe PMC funders group. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 42, n. 7, p. 955–963, 2004.

MOREIRA-DE-SOUSA, C.; SOUZA, R. B.; FONTANETTI, C. S. HSP70 as a biomarker: an excellent tool in environmental contamination analysis—a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 8, p. 264, 2018.

MOUSA, M. A.; MOUSA, S. A. Immunocytochemical study on the localization and distribution of the somatolactin cells in the pituitary gland and the brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, n. 2, p. 197-211, 1999.

MULROONEY, J. E.; GOLI, D. Efficacy and degradation of fipronil applied to cotton for control of *Anthonomus grandis grandis* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 6, p. 1364–1368, 1999.

MYDLARZ, L. D.; JONES, L. E.; HARVELL, C. D. Innate immunity, environmental and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 37, n. 2006, p. 251–288, 2006.

OHI, M. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 146, n. 2, p. 121–127, 2004.

PADMINI, E.; USHA RANI, M. Impact of seasonal variation on HSP70 expression quantitated in stressed fish hepatocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 151, n. 3, p. 278–285, 2008.

PALMIERI, M. J.; LUBER, J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVIDE, L. C. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 763, p. 30–35, 2014.

PISA, L. W.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.;

DOWNS, C. A.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; MCFIELD, M.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; SETTELE, J.; SIMON-DELSO, N.; STARK, J. D.; VAN DER SLUIJS, J. P.; VAN DYCK, H.; WIEMERS, M. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68–102, 2014.

PONCE-MARBÁN, D.; HERNÁNDEZ, J. M.; GASCA-LEYVA, E. Simulating the economic viability of Nile tilapia and Australian redclaw crayfish polyculture in Yucatan, Mexico. **Aquaculture**, v. 261, n. 1, p. 151–159, 2006.

QIN, F.; GAO, Y.; XU, P.; GUO, B.; LI, J.; WANG, H. Enantioselective bioaccumulation and toxic effects of fipronil in the earthworm *Eisenia foetida* following soil exposure. **Pest Management Science**, v. 71, n. 4, p. 553-561, 2015.

RAHOUI, S.; CHAOUI, A.; FERJANI, E. El. Differential sensitivity to cadmium in germinating seeds of three cultivars of faba bean (*Vicia faba* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 451–456, 2008.

REGOLI, F.; GIULIANI, M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 93, p. 106–117, 2014.

ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of africanized honeybees. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, n. 3, p. 456–466, 2013.

RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FERREIRA, R. A. C.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438–442, 2015.

ROMERO, A.; RAMOS, E.; ARES, I.; CASTELLANO, V.; MARTÍNEZ, M. A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; ANADÓN, A.; MARTÍNEZ, M. A. Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. **Toxicology Letters**, v. 252, p. 42-49, 2016.

SAKAHIRA, H.; ENARI, M.; NAGATA, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 96–99, 1998.

SALMENA, L. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. **Genes & Development**, v. 17, n. 7, p. 883–895, 2003.

SANTOS, E. **Pesca e piscicultura**. Belo Horizonte: Editora Itatiaia Limitada, 1977.

SCHERER, M. D.; SPOSITO, J. C. V.; FALCO, W. F.; GRISOLIA, A. B.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M.; MACHADO, G.; NASCIMENTO, V. A.; GONÇALVES, D. A.; WENDER, H.; OLIVEIRA, S. L.; CAIRES, A. R. L. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: A close analysis of particle size dependence. **Science of The Total Environment**, v. 660, p. 459–467, 2019.

ŠEFČÍKOVÁ, Z.; BABEĽOVÁ, J.; ČIKOŠ, Š.; KOVAŘÍKOVÁ, V.; BURKUŠ, J.; ŠPIRKOVÁ, A.; KOPPEL, J.; FABIAN, D. Fipronil causes toxicity in mouse preimplantation embryos. **Toxicology**, v. 410, n. March, p. 214–221, 2018.

SHARMA, D.; ABROL, D. Effect of insecticides on foraging behaviour and pollination role of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) on toria (*Brassica campestris* var. toria) crop. **Egyptian Journal of Biology**, v. 16, n. 1, p. 79–86, 2014.

SILVA, C. A. S.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; DOMINGUES, C. E. C.; ABDALLA, F. C.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Fipronil effect on the frequency of anomalous brood in honeybee reared in. In: JULIUS-KÜHN-ARCHIV 2015, Ghent (Belgium): Hazards of pesticides to bees - 12th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, 2015.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CHAUZAT, M. P.; ZEGGANE, S.; DRAJNUDEL, P.; SCHURR, F.; FAUCON, J. P. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**, p. 696–703, 2012.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B. Dos; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, 2017.

SIMON-DELSO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C. H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J. P.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5–34, 2015.

SINDIVEG, SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL, S. **O que você precisa saber sobre defensivos agrícolas**. 2018.

Disponível em: <http://sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2018/08/oquevoceprecisasabersobredefensivosagricolas.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2019.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). **Ensayos toxicológicos ymétodos de evaluación de calidad de aguas: standerización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Mexico: IMTA**, 2004.

TANAKA, T.; INOMATA, A. Reproductive and neurobehavioral effects of ethiprole administered to mice in the diet. **Birth Defects Research**, v. 109, n. 19, p. 1568–1585, 2017.

TANAKA, T.; SUZUKI, T.; INOMATA, A. Reproductive and neurobehavioral effects of maternal exposure to ethiprole in F1 -generation mice. **Birth Defects Research**, v. 110, n. 3, p. 259–275, 2018.

TAS, U.; OGETURK, M.; KULOGLU, T.; SAPMAZ, H. I.; KOCAMAN, N.; ZARARSIZ, I.; SARSILMAZ, M. HSP70 immune reactivity and TUNEL positivity in the liver of toluene-inhaled and melatonin-treated rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 6, p. 514–522, 2013.

TERÇARIOL, P. R. G.; GODINHO, A. F. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 3, p. 221–225, 2011.

TIGRE, R. C.; SILVA, N. H.; SANTOS, M. G.; HONDA, N. K.; FALCÃO, E. P. S.; PEREIRA, E. C. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 125–132, 2012.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. In: WARE, G. W. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews**. New York, NY: Springer New York, 2003. p. 1–66.

TISCH, M..; FAULDE, M.; MAIER, H. Genotoxic effects of insecticides in current use on mucosal epithelial cells from human tonsil tissue. **HNO**. 1:15–22, 2007.

TOMLIN, C. D. S. The pesticide manual. **British Crop Production Council**. 12:413–415, 2000.

TORRES, M. T. R. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**, v. 41, n. 2-3, 2003.

ÚNICA, UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO, 2015. Acessado em: 18 de janeiro de 2015. <http://www.unica.com.br>

USEPA- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological effects test guidelines (OPPTS 850.4200):** Seed germination/root elongation toxicity test, 1996.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY**. Pesticide Fact Sheet: Ethiprole**: New Chemical; Import Tolerances Established. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, 2011.

VALERIO, M. E.; GARCÍA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science of The Total Environment**, v. 378, n. 1–2, p. 63–66, 2007.

VAN DER SLUIJS, J. P.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BIJLEVELD VAN LEXMOND, M. F.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C. A.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; SIMON-DELSO, N.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Conclusions of the worldwide integrated assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 148–154, 2015.

VAN DER VOET, E.; LIFSET, R. J.; LUO, L. Life-cycle assessment of biofuels, convergence and divergence. **Biofuels**, v. 1, n. 3, p. 435–449, 2010.

VAN DYK, J. C.; COCHRANE, M. J.; WAGENAAR, G. M. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. **Chemosphere**, v. 87, n. 4, p. 301–311, 2012.

VAN LEXMOND, M. B.; BONMATIN, J. M.; GOULSON, D.; NOOME, D. A. Worldwide integrated assessment on systemic pesticides global collapse of the entomofauna: Exploring the role of systemic insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 1–4, 2015.

VERLAG, G. F. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. Tokio: Kodansha, 1982.

VIDAU, C.; BRUNET, J. L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 4, p. 589–597, 2009.

WAGNER, S. D.; KUROBE, T.; HAMMOCK, B. G.; LAM, C. H.; WU, G.; VASYLIEVA, N.; GEE, S. J.; HAMMOCK, B. D.; TEH, S. J. Developmental effects of fipronil on *Japanese Medaka* (Oryzias latipes) embryos. **Chemosphere**, v. 166, p. 511–520, 2017.

WANG, C.; QIAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, F.; ZHANG, Q.; LI, Z.; ZHAO, M. A metabolomic study of fipronil for the anxiety-like behavior in zebrafish larvae at environmentally relevant levels. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 252-258, 2016.

WYLLIE, A. H. Apoptosis: an overview. **British Medical Bulletin**, v. 53, n. 3, p. 451–465, 1997.

YILDIRIM, N.; AGAR, G. Determination of genotoxic effects of fipronil in *Vicia faba* using random amplified polymorphic DNA analysis. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 8, p. 1450–1455, 2016.

ZHAO, X. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.

ZHAO, X.; WU, C.; WANG, Y.; CANG, T.; CHEN, L.; YU, R.; WANG, Q. Assessment of toxicity risk of insecticides used in rice ecosystem on *Trichogramma japonicum*, an egg parasitoid of rice lepidopterans. **Journal of Economic Entomology**, 105:92-101, 2012.