UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Hortênsia Sette Gripp

Efeitos bioquímicos de contaminação em girinos de *Eupemphix nattereri* expostos a solos contendo o agrotóxico fipronil e seus produtos de degradação

São José do Rio Preto – SP
2015

Hortênsia Sette Gripp

Efeitos bioquímicos de contaminação em girinos de *Eupemphix nattereri* expostos a solos contendo o agrotóxico fipronil e seus produtos de degradação

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, área de Química Ambiental, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientador (a): Prof. Dr. Altair Benedito Moreira

Co-orientador (a): Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto – SP
2015

Gripp, Hortênsia Sette.
Efeitos bioquímicos de contaminação em girinos de Eupemphix nattereri expostos a solos contendo o agrotóxico fipronil e seus produtos de degradação / Hortênsia Sette Gripp. -- São José do Rio Preto, 2015
66 f. : il., tabs.

Orientador: Altair Benedito Moreira
Coorientador: Eduardo Alves de Almeida
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química ambiental. 2. Toxicologia ambiental. 3. Produtos químicos agrícolas – Biodegradação. 4. Girino - Efeito da poluição - São José do Rio Preto, Região de (SP) 5. Stress oxidativo. I. Moreira, Altair Benedito. II. Almeida, Eduardo Alves de. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.
CDU – 577.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Hortênsia Sette Gripp

Efeitos bioquímicos de contaminação em girinos de *Eupemphix nattereri* expostos a solos contendo o agrotóxico fipronil e seus produtos de degradação

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, área de Química Ambiental, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Altair Benedito Moreira
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof.ª. Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
13 de março de 2015

Dedico este trabalho a meus pais que sempre me apoiaram, aos meus irmãos Victor e Alexandre, e ao meu namorado Victor Hugo.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me guiado pelos caminhos corretos e me dado toda a força e fé necessária para chegar até aqui.

Aos meus pais, Denise e William, pelo comprometimento com a minha formação, pelo apoio e amor incondicional, pela paciência, carinho, incentivo e dedicação que tiveram por mim não só durante essa jornada, desde sempre.

Aos meus irmãos, Victor e Alexandre, que estão sempre ao meu lado e me apoiam.

Ao meu namorado, Victor Hugo, pela compreensão, paciência, apoio, companheirismo e amor durante esses anos.

Aos meus avós, Noemi, William (in memoriam), Leonilda e João, pelas palavras de conforto, carinho e incentivo.

A aluna de doutorado Juliane pelo grande auxílio em todo o trabalho e pela amizade construída neste período.

Aos colegas do LECA Alana, Amanda, Ana Lúcia, Augusto, Camila, Daniela, Danielly, Flávia, Isabela, Júlia, Juliana, Laís, Luana, Lucas, Otávio, Rosana, pela companhia, momentos de descontração, apoio e amizade.

Aos alunos de LABCA Alexandre, Cintia, Danilo, Danielly, Denise e Isabela, pelo auxílio nos experimentos e na utilização da infraestrutura do laboratório.

Aos alunos da pós-graduação em química Airton, Bruno, Maria Eduarda, Mariana, Mirelle, Vagner pela amizade que foi construída neste período, por escutarem e incentivarem até o final.

As minhas amigas Ana Carolina, Dalilla, Flávia, Heloisa, Isabela e Thaise, que mesmo estando distantes, serão sempre amigas, me ajudando, apoiando e incentivando.

Ao Prof. Dr. Gustavo O. B. Rodriguez e ao Dr. Marcelo Campos pelas sugestões dadas no exame de qualificação, as quais enriqueceram este trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida pela coorientação, ajuda, conselhos e disposição ao esclarecimento de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Altair Benedito Moreira pela orientação, paciência e pelo crescimento profissional e pessoal adquirido durante esses anos.

A Capes pela bolsa concedida.

RESUMO

O fipronil, inseticida pertencente ao grupo dos fenilpirazóis é amplamente utilizado no cultivo da cana-de-açúcar na região noroeste do estado de São Paulo, gerando preocupações no âmbito da contaminação ambiental que este e seus produtos de degradação podem causar, afetando a qualidade da água, do solo, do sedimento, e até mesmo organismos não alvo presentes no ambiente em questão. Foram feitos experimentos expondo girinos de *Eupemphix nattereri* a concentrações conhecidas de fipronil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto utilizando recipientes contendo 200 g de solo e 1,0 L de água, de maneira a simular o ambiente natural em que os referidos anfíbios vivem. Foram adicionados 8 girinos por aquário, durante um período de 7 dias, para avaliar o sistema de defesa antioxidante dos organismos, analisando enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica. Após a exposição, foram feitas a extração e quantificação dos analitos na água e no sedimento utilizados por meio da técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). As concentrações utilizadas nos experimentos foram 35,0; 120,0 e 180,0 μg kg de solo^{-1}, concentrações essas encontradas em solos com plantação de cana-de-açúcar em estudos já realizados. Foi possível confirmar a preferência do fipronil e seus metabólitos por matrizes lipofílicas, já que os contaminantes se depositaram principalmente no sedimento. Pôde-se também observar que o fipronil é passível de provocar estresse oxidativo nos girinos, uma vez que foram observadas alterações na atividade enzimática da catalase e houve peroxidação lipídica após os experimentos, sob as três concentrações estudadas. O produto de degradação gerado a partir da oxidação do fipronil, o fipronil sulfona, também provoca estresse oxidativo nos organismos, pelo fato de ter aumentado o nível da peroxidação lipídica em duas das concentrações estudadas, apesar de não ter sofrido alterações na atividade das enzimas antioxidantes. Por outro lado, o fipronil sulfeto, produto gerado pela redução, se mostrou o menos agressivo para os girinos estudados, uma vez que somente em sua maior concentração houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes catalase e glicose 6-fosfato desidrogenase. Com este trabalho foi possível inferir que o fipronil e seus produtos de degradação são capazes de provocar alterações metabólicas nos girinos de *Eupemphix nattereri* quando estes são expostos a concentrações ambientalmente relevantes, podendo levar à uma diminuição do desempenho fisiológico dos animais a longo prazo, e por consequência um prejuízo a nível populacional.

Palavras-chave: fipronil, produtos de degradação, biomarcadores, girinos, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Fipronil, a phenylpyrazole insecticide, is widely used in the cultivation of sugar cane in the northwest of São Paulo, raising concerns on environmental contamination that it and its metabolites can cause, affecting the quality of water, soil, sediments, and even non-target organisms in the environment in question. Experiments were carried out exposing tadpoles *Eupemphix nattereri* to known concentrations of fipronil, fipronil sulfone and fipronil sulfide using vials containing 200 g of soil and 1.0 L of water, to simulate the natural environment of amphibians. Then were added 8 tadpoles, for a period of 7 days, to evaluated the antioxidant defense system bodies, analyzing antioxidant enzymes and lipid peroxidation. After exposure, were made the extraction and quantification of analytes in the water and the sediment using a gas phase chromatography technique coupled with mass spectrometry (GC-MS). The concentrations used in the experiments were 35,0; 120,0 and 180,0 μg kg^{-1} soil, these concentrations found in soils with sugar cane plantation in previous studies. It was possible to confirm preferably fipronil and metabolites by lipophilic matrix since the contaminants were deposited primarily in the sediment. It might also observe that fipronil is likely to cause oxidative stress in tadpoles, as changes were observed in the catalase enzyme activity and lipid peroxidation after the experiments, under the three concentrations studied. The degradation product generated from the oxidation of fipronil, fipronil sulfone, also causes oxidative stress in the body, because it has increased the level of lipid peroxidation in two of three concentrations studied, despite no change in the activity of antioxidant enzymes. Moreover, fipronil sulfide product generated by reduction, was the least aggressive to the tadpoles studied, since only in its highest concentration was increased activity of the antioxidant enzymes catalase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. With this work it was possible to infer that fipronil and its degradation products are able to cause metabolic changes in tadpole Eupemphix nattereri when they are exposed to environmentally relevant concentrations, which may lead to a decrease in the physiological performance of long-term animal, and result in a loss at the population level.

Keywords: fipronil, metabolites, biomarkers, tadpoles, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura das moléculas do fipronil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto.....18

Figura 2 Mecanismo de ação do fipronil.....19

Figura 3 Foto da desova de girinos.....29

Figura 4 Lagoa onde as desovas foram coletadas, próxima a cidade de São José do Rio Preto.....30

Figura 5 Esquema geral do experimento 1.....31

Figura 6 Esquema geral do experimento 2.....32

Figura 7 Foto de parte do experimento 2, com detalhe para o girino dentro do aquário.....32

Figura 8 Sistema de extração utilizado para pré-concentração das amostras de água, utilizando cartuchos SPE e sistema manifold.....34

Figura 9 GC-MS utilizado na quantificação das amostras de água e sedimento.....34

Figura 10 Mistura do sedimento com os solventes acetona:diclorometano (1:1) para extração por ultrassom, durante 15 minutos.....35

Figura 11 Gráfico das concentrações de fipronil adicionadas antes do experimento e encontradas na água e no sedimento após o experimento 2.....43

Figura 12 Gráfico das concentrações de fipronil sulfona adicionadas antes do experimento e encontradas na água e no sedimento após o experimento 2.....43

Figura 13 Gráfico das concentrações de fipronil sulfeto adicionadas antes do experimento e encontradas na água e no sedimento após o experimento 2.....44

Figura 14 Gráfico da atividade enzimática da GST após a exposição de girinos (*Eupemphix nattereri*) ao fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, a três concentrações distintas, 35, 120 e 180 $\mu g\ kg^{-1}$.....45

Figura 15 Gráfico da atividade enzimática da G6PDH após a exposição de girinos (*Eupemphix nattereri*) ao fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, a três concentrações distintas, 35, 120 e 180 μg kg^{-1}.....47

Figura 16 Gráfico da atividade enzimática da CAT após a exposição de girinos (*Eupemphix nattereri*) ao fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, a três concentrações distintas, 35, 120 e 180 μg kg^{-1}.....49

Figura 17 Gráfico do nível de malondialdeído (MDA), caracterizando a peroxidação lipídica ocorrida nos girinos (*Eupemphix nattereri*) após exposição ao fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, a três concentrações distintas, 35, 120 e 180 μg kg^{-1}.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Valores de pH, temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD) e turbidez para as amostras de água do experimento 1.....39

Tabela 02 Valores médios de pH, temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD) e turbidez para as amostras de água do experimento 2, com seus respectivos desvios padrões 40

Tabela 03 Concentrações de fipronil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto encontradas nas amostras de água e sedimento utilizados no experimento 1, com seus respectivos desvios padrões.....41

Tabela 04 Concentrações de fipronil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto encontradas nas amostras de água e sedimento utilizados no experimento 2, com seus respectivos desvios padrões.....42

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários

ANA – Agência Nacional de Águas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C – Grupo controle, sem adição de contaminantes

CAT – Catalase

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DP – Desvio padrão

ERO – Espécies reativas de oxigênio

F – Fipronil

FSD – Fipronil sulfeto

FSN – Fipronil sulfona

G6P – Glicose 6-Fosfato

G6PDH – Glicose 6-Fosfato Desidrogenase

GABA – Ácido γ-aminobutírico

GC-MS – Cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas

GPx – Glutationa Peroxidase

GR – Glutationa Redutase

GSH – Glutationa Reduzida

GSSG – Glutationa Oxidada

GST – Glutationa S-Transferase

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

LC_{50} – Concentração letal mediana

LD_{50} – Dose letal mediana

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDA - Malondialdeído

NADP – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

OD – Oxigênio dissolvido

PMSF - Fenilmetanosulfonil fluoreto

SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia

SNC – Sistema nervoso central

SPE – Extração em fase sólida

T – Temperatura

TBA – Ácido tiobarbitúrico

UNICA – União da Indústria da Cana-de-Açúcar

USEPA - Agencia de Proteção Ambiental Americana

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 Introdução 13
2 Revisão Bibliográfica 15
2.1 Cana-de-açúcar e contaminação ambiental por agrotóxicos 15
2.2 Fipronil e seus produtos de degradação 16
2.3 Mecanismo de ação do fipronil 18
2.4 Biomarcadores e estresse oxidativo 20
2.5 Metabolismo de biotransformação e enzimas antioxidantes 22
2.6 Quantificação de compostos orgânicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) 23
2.7 Avaliação de biomarcadores de contaminação em anfíbios 24
3 Objetivos 26
3.1 Objetivo geral 26
3.2 Objetivos específicos 26
4 Parte Experimental 27
4.1 Reagentes 27
4.2 Instrumentação 27
4.3 Surrogate (Diazinon-d10) 28
4.4 Padrão Interno (Fenantreno-d10) 28
4.5 Lavagem de vidrarias 28
4.6 Coleta e Amostragem 29
4.7 Montagem de experimento 30
4.8 Parâmetros físico-químicos das amostras de água 33
4.9 Extração e Quantificação 33
4.9.1 Água 33
4.9.2 Sedimento 35
4.10 Destino dos resíduos gerados no desenvolvimento do trabalho 36
4.11 Análises bioquímicas 36
4.11.1 Processamento das amostras 36
4.11.2 Glutationa S-Transferase 36
4.11.3 Catalase 37
4.11.4 Glicose-6-Fosfato Desidrogenase 37
4.11.5 Quantificação de Proteínas 37
4.12 Peroxidação Lipídica 37
4.13 Análises Estatísticas 38
5 Resultados e Discussão 39
5.1 Parâmetros físico-químicos da água 39
5.2 Quantificação dos analitos em amostras de água e sedimento 41
5.3 Avaliação do estresse oxidativo nos girinos 44
5.3.1 Glutationa S-Transferase 44
5.3.2 Catalase 46
5.3.3 Glicose 6-fosfato Desidrogenase 48
5.4 Peroxidação lipídica 50
6 Conclusões 52
7 Referências bibliográficas 53

1 Introdução

Introduzida no período colonial, a cana-de-açúcar é uma das principais culturas da economia brasileira, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Segundo a União da Indústria da Cana-de-açúcar (UNICA), a safra brasileira de cana-de-açúcar em 2013/2014 foi 653 milhões de toneladas. Deste total, o estado de São Paulo foi responsável por 56,20% (367.450 toneladas), se destacando, então, como o maior produtor do país. Dentro do estado, a região noroeste é a terceira maior produtora e continua em grande expansão.

No cultivo da cana de açúcar, um grande volume de agrotóxicos (também denominados como agrotóxicos ou defensivos agrícolas) é utilizado. O estado de São Paulo é considerado o maior consumidor de agrotóxicos no país para o controle de pragas, com destaque para os agrotóxicos utilizados no cultivo da cana-de-açúcar, dentre eles alguns herbicidas como o diuron e o glifosato e alguns inseticidas, como o carbofuran e o fipronil. Estes defensivos agrícolas são utilizados no controle de organismos prejudiciais às plantações, como insetos e ervas daninhas, protegendo as culturas de sofrer perdas potenciais e da redução da qualidade do produto (DAMALAS, 2009). Porém, este uso intenso de agrotóxicos é preocupante em relação aos impactos ambientais que são decorrentes da toxicidade destes aos organismos não alvo, como também a contaminação do solo e dos recursos hídricos localizados próximos ao cultivo da cana-de-açúcar (EDWARDS, 1993).

De maneira geral, agrotóxicos podem ser transportados a partir de escoamentos superficiais, deriva e precipitações, portanto é possível serem encontrados em vários ambientes, como solos, águas superficiais, sedimentos, podendo assim, atingir organismos não alvo (EDWARDS, 1993; LENOIR et al, 1999; PERET et al, 2010; RAND; WELLS; McCARTY, 1995). Depois de ocorrer o aporte das moléculas do agrotóxico para o ambiente, estas podem ser quebradas ou degradadas, gerando subprodutos, sendo estes menos ou mais tóxicos que o composto original (CHEYNS et al, 2010; GUNASEKARA; TROUNG, 2007; KATAGI, 2004; MUNEER; THEURICH; BAHNEMANN, 1999). Dentre os inseticidas utilizados no cultivo da cana-de-açúcar, o fipronil possui vários produtos de degradação, dentre eles, o fipronil sulfeto que é gerado a partir de uma reação de redução e o fipronil

sulfona que é gerado a partir de uma reação de oxidação, os quais são os subprodutos majoritários (BOBÉ et al.,1998).

Estudos sugerem maneiras de se avaliar o nível de contaminação dos agrotóxicos e de seus produtos de degradação no ambiente, podendo ser feito por meio de análises químicas, quantificando estes contaminantes na água, no solo, no sedimento, bem como nos organismos (CAPPELINI et al., 2012; MANDAL; SINGH, 2013), ou então por meio da análise de biomarcadores de contaminação, que visa estudar as alterações biológicas em nível molecular, celular e fisiológico, em organismos presentes em ambientes contaminados pelos agrotóxicos, consequentemente sujeitos aos efeitos tóxicos causados pelos mesmos (WALKER et al., 1996).

Nas regiões onde existe cultivo de cana-de-açúcar, é possível encontrar várias espécies de seres vivos, entre elas os anfíbios, que podem ocorrer às margens dos rios e lagoas, em locais superficiais, lênticos e efêmeros (GENG; YAO; XUE, 2005). Estudos têm demonstrado que populações destes animais vêm sofrendo grande declínio nas últimas décadas e uma das principais causas é contaminação de ambientes por compostos químicos, principalmente os agrotóxicos (HAYES et al, 2010).

O fipronil, inseticida analisado neste estudo, pertence ao grupo dos fenilpirazóis, ele atua diretamente nos canais de ligação com o ácido γ-aminobutírico (GABA), neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central e nos canais de glutamato (GUNASEKARA; TROUNG, 2007; SIMON-DELSO et al, 2015). Segundo Möhler e colaboradores (2004), além dos conhecimentos já existentes sobre os efeitos nos receptores GABA, há fortes evidências de que o fipronil seja responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos organismos, levando a condições de estresse oxidativo (KI et al, 2012).

Em estudo realizado por De Toffoli (2014), foram encontradas em solo da região noroeste do estado de São Paulo, concentrações de fipronil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto variando de 35,0 a 180,0 μg kg^{-1}. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do inseticida fipronil e de seus metabólitos, fipronil sulfona e fipronil sulfeto sob diferentes concentrações, e também avaliar a peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes como biomarcadores de contaminação do fipronil em larvas do anuro *Eupemphix nattereri*, sendo este naturalmente encontrado na região de trabalho (ROSSA-FERES; JIM, 2001).

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Cana-de-açúcar e contaminação ambiental por agrotóxicos

A agricultura é um setor de grande relevância para o desenvolvimento humano e para a economia brasileira. No entanto, as atividades industriais e agrícolas não afetam somente a economia, mas também são responsáveis por mudanças da qualidade do ar, da água e de outros recursos naturais, afetando diretamente na qualidade de vida de todos os seres vivos (PEREIRA et al, 2009).

No Brasil, o cultivo da cana-de-açúcar é uma das atividades agrícolas mais importantes, tendo sido cultivada desde meados do século XVI. A partir da cana, é possível extrair vários produtos como o etanol, o açúcar e energia elétrica, gerada a partir da queima do bagaço. A safra de 2013/2014 no país chegou a 653.519 toneladas, sendo o estado de São Paulo o principal produtor, tendo colhido aproximadamente 56% da safra total, com 367.450 toneladas (UNICA). Dentro do estado de São Paulo, a região noroeste é a terceira maior produtora, estando em constante expansão.

Levando em consideração que um dos recursos mais utilizados hoje em dia pelos agricultores, para aumentar sua produtividade e qualidade de seu produto, é o uso de agrotóxicos e que o cultivo da cana-de-açúcar é uma das principais culturas que impulsiona a economia do país, o estado de São Paulo pode ser considerado o maior consumidor de agrotóxicos do Brasil. Na plantação de cana-de-açúcar, vários tipos de agrotóxicos podem e são utilizados, como por exemplo o inseticida carbofuran (Classe I)[1], que é aplicado no solo das plantações, assim como o fipronil (Classe II). Na classe dos herbicidas, pode-se citar o glifosato (Classe IV), aplicado como maturador e em pós emergência, o diuron (Classe III), aplicado em pré e pós emergência e também o tebutiuron (Classe II), aplicado em pré-emergência. Na classe dos fungicidas, pode-se citar o azoxistrobina (Classe III), aplicado em mudas ou sulcos de plantio ou então por aplicação foliar, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

[1] Classe toxicológica dos agrotóxicos, sendo Classe I – extremamente tóxico, com DL50* $\leq$ 5 mg kg^{-1}; Classe II – altamente tóxico, com DL50 de 5 a 50 mg kg^{-1}; Classe III – medianamente tóxico, com DL50 de 50 a 500 mg kg^{-1}; Classe IV – pouco tóxico, com DL50 de 500 a 5000 mg kg^{-1}.

No entanto, após a aplicação destes agrotóxicos, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos podem ocorrer determinando seu comportamento posterior. Alguns dos processos que podem ocorrer são retenção (sorção, absorção), transformação (degradação química e biológica) e transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), podendo assim, contribuir para a contaminação de solos e recursos hídricos. Uma vez no ambiente aquático, o agrotóxico pode ser levado pela corrente para outras áreas, ou se ligar a materiais particulados que estejam em suspensão, ou ainda se depositar no sedimento e até mesmo ser absorvido e acumulado em organismos não-alvos, tudo isto é dependente das propriedades físico-químicas do agrotóxico em questão e de seus produtos de degradação (SILVA; CAMPOS; BOHM, 2013; SILVA; SANTOS, 2007; VEIGA et al, 2006;).

2.2 Fipronil e seus produtos de degradação

O fipronil, cujo nome químico é (5-amino-1-[2,6-dicloro-4(trifluormetil)fenil]-4-[(trifluoretil)sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila) (BOBÉ et al., 1998) é um inseticida pertencente ao grupo químico dos fenilpirazóis, desenvolvido pela empresa Rhône Poulenc Arg Company, atualmente conhecida como Bayer CropScience. Começou a ser utilizado em 1987, porém só foi registrado pelos Estados Unidos no ano de 1996, pois, para um agrotóxico ser registrado pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), são feitos testes de laboratório para avaliar seus efeitos agudos e crônicos à saúde (TINGLE et al., 2003; TOMLIN, 2000; WARE, 2000).

Trata-se de um composto não iônico (PIASAROLO; REGITANO; GUERREIRO, 2008) registrado no Brasil para o controle de cupins, besouros, lagartas e brocas nas culturas de algodão, batata, cana-de-açúcar, milho e soja, segundo o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT). Sua solubilidade em água a 20 °C, em pH 5,0, é de 1,9 mg L^{-1}, e em pH 9,0 é de 2,2 mg L^{-1}. Com um coeficiente de partição octanol-água (log Kow) de 4,01, o fipronil é considerado de moderada lipofilicidade, com solubilidade em acetona, acetato de etila e metanol de 545,9, 264,9 e 137,5 g L^{-1}, respectivamente. Este composto é considerado estável a temperatura ambiente durante um ano, e sua degradação em água e solos é lenta, sendo que em água, sob condições anaeróbicas, seu tempo de meia vida está entre 116 e 132 dias e em solo, sob condições aeróbicas, o tempo de meia vida é de 122 a 128 dias (USEPA, 1996).

O crescente uso deste inseticida neurotóxico sistêmico bastante persistente tem levantado preocupações sobre seu impacto na diversidade, no funcionamento dos

.

ecossistemas e os serviços ambientais prestados por uma grande variedade de espécies e ambientes afetados. Uma vez que a escala de utilização do fipronil aumentou consideravelmente, combinada as propriedades deste composto, resultou na contaminação de solos agrícolas, recursos de água doce, vegetação e organismos não-alvo, pelo fato destes estarem sendo expostos cronicamente e repetidamente a concentrações elevadas deste agrotóxico (VAN DER SLUIJS et al, 2015).

A partir do momento em que ocorre o aporte das moléculas dos agrotóxicos no ambiente, elas podem ser quebradas ou degradadas pela ação da luz solar, pela água ou por outros compostos, bem como, pela ação de microrganismos, como as bactérias (KATAGI, 2004; CHEYNS et al, 2010).

Alguns agrotóxicos, como os organoclorados, apresentam grande estabilidade no ambiente, com degradação lenta, podendo permanecer no ambiente por longo período de tempo sem sofrer alteração (KATAYAMA; MATSUMURA, 1993). Os compostos difíceis de serem degradados têm maior probabilidade de serem transportados a maiores distâncias e permanecerem no ambiente como poluente, como é o caso do fipronil e de seus produtos de degradação.

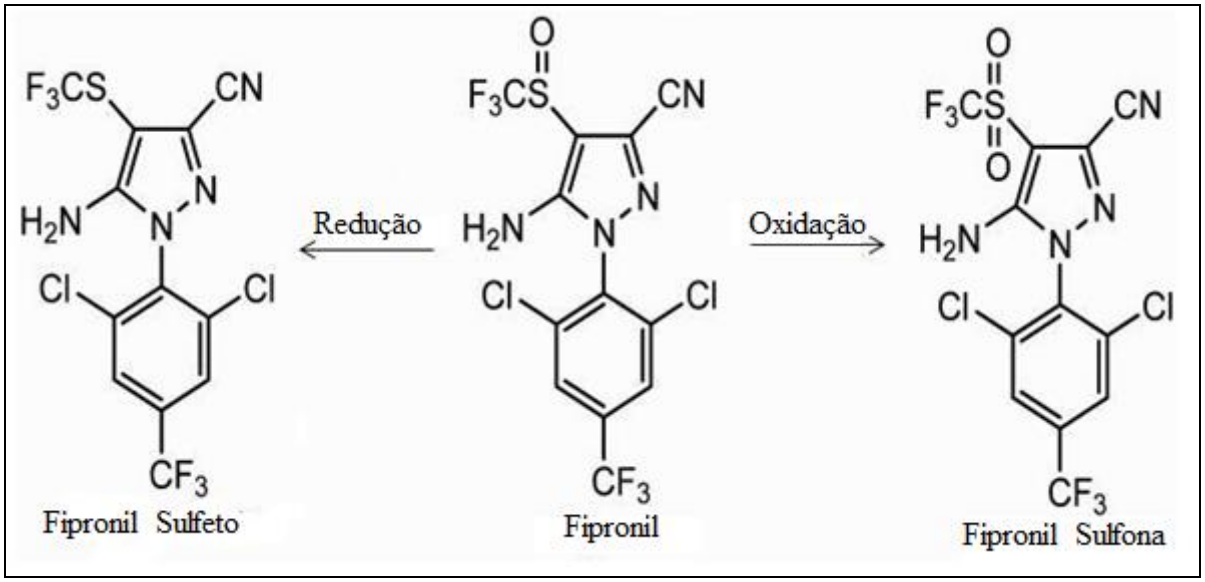
A dissipação do fipronil no ambiente resulta em quatro principais produtos de degradação, tendo como produto da fotólise o fipronil dessulfinil, como produto da reação de redução, o fipronil sulfeto, da reação de oxidação, o fipronil sulfona, e pela hidrólise, obtém-se o fipronil amida (BOBÉ et al., 1998; RAMESH; BALSUBRAMANIAN, 1999). Os produtos de degradação podem ser mais tóxicos ao ambiente do que o próprio composto original, segundo Peret e colaboradores (2010). Na **Figura 1** estão demonstradas as fórmulas moleculares do fipronil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto.

Quanto a toxicidade, o fipronil demonstra possuir uma toxicidade seletiva para insetos, com a concentração letal mediana (LC_{50}) variando entre 0,35 a 23,0 $\mu g\ L^{-1}$ para diferentes insetos, segundo Gunasekara e Troung (2007). Isto ocorre pelo fato do fipronil possuir uma afinidade de ligação mais estreita na direção dos canais de cloro regulados pelos receptores do ácido γ-aminobutírico (GABA) de insetos do que com os receptores GABA dos mamíferos (KI et al, 2012). Os metabólitos do fipronil também demonstraram possuir fortes propriedades inseticidas, uma vez que os valores de LC_{50} para mosquitos *Aedes aegypt* tratados com os metabólitos fipronil sulfeto e fipronil sulfona foram de 3,79 e 8,57 $\mu g\ L^{-1}$, respectivamente (AAJOUD; RAVANEL; TISSUT, 2003). Para mamíferos, as doses letais medianas

.

encontradas (LD_{50}) para ratos sob via oral e dermal foram de 97 e maior que 2000 mg kg^{-1}, respectivamente. Para coelhos, via dermal, a LD_{50} foi de 354 mg kg^{-1} (USEPA, 1996).

Figura 1 Estrutura das moléculas do fipronil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto.



Fonte: Adaptado de Mandal e Singh (2013)

2.3 Mecanismo de ação do fipronil

O fipronil é considerado um inseticida de nova geração, pelo fato de não seguir a mesma rota bioquímica dos piretróides, que têm como função o bloqueio dos canais de sódio, nem a dos carbamatos e a dos organofosforados, que são inibidores de colinesterase. Essas rotas são consideradas comuns dos inseticidas, porém, com o passar do tempo, alguns insetos conseguiram desenvolver resistência a esses agrotóxicos. Diferente desses, o fipronil atua interferindo nos canais de ligação com GABA (**Figura 2**) (GUNASEKARA; TROUNG, 2007).

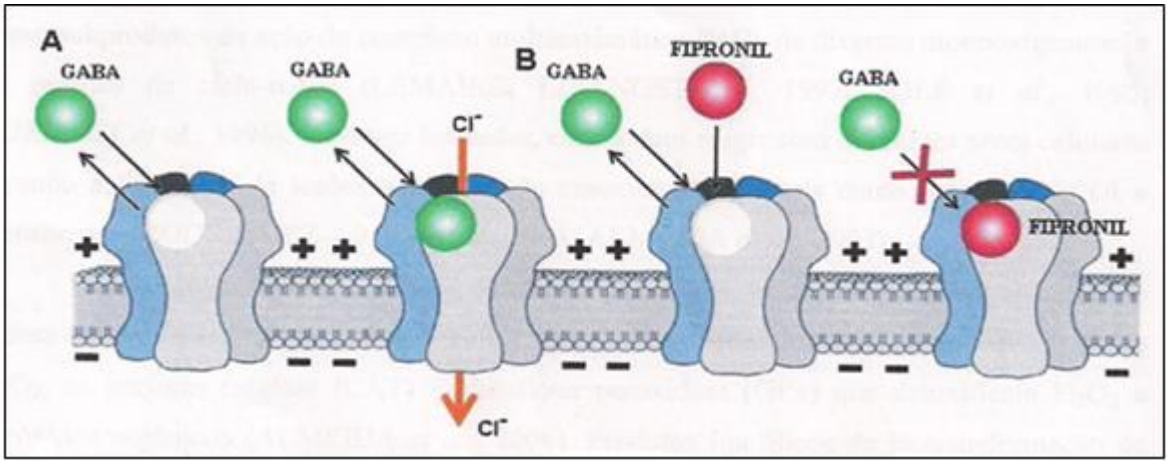
Este agrotóxico é bastante utilizado, pois possui um alto grau de seletividade entre as células nervosas de insetos e de mamíferos (NARAHASHI et al., 2010). Estudos mostram que o fipronil é capaz de produzir uma ampla gama de impactos adversos letais e subletais em invertebrados e também em alguns vertebrados (GIBBONS; MORRISEY; MINEAU, 2015; SIMON-DELSO et al, 2015; VAN DER SJUILS et al, 2015).

.

Em insetos, o fipronil atua diretamente no sistema nervoso central (SNC), ligando-se aos receptores GABA e glutamato acoplados aos canais de cloro. Fazendo isso, então, o fipronil bloqueia a porta de entrada dos canais de cloreto dos neurônios, acumulando assim receptores GABA nas junções sinápticas, inibindo o impulso nervoso normal, aumentando a atividade neural excessivamente podendo causar hiperexcitação, espasmos, paralisia e, consequentemente, a morte do inseto (BARBARA et al, 2005; COLE; NICHOLSON; CASIDA, 1993; KIDD; JAMES, 1991; SIMON-DELSO et al, 2015; TINGLE et al, 2003).

O GABA é um importante neurotransmissor inibitório no SNC, sendo cerca de 30% das sinapses GABAérgicas. O complexo de receptores do GABA é constituído por várias subunidades que formam um canal iônico e contém o sítio de reconhecimento para o GABA e outras substâncias agonistas e antagonistas. Quando os sítios de reconhecimento dos receptores são ocupados por agonistas, a atividade GABAérgica aumenta e quando são ocupados por antagonistas, diminui (MÖHLER et al., 2004).

Figura 2 Mecanismo de ação do fipronil.



Fonte: Margarido (2011)

Além dos conhecimentos já existentes sobre os receptores do GABA, há uma recente evidência de que o fipronil possa ser responsável pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células, levando a um aumento da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo (KI et al., 2012; MARGARIDO et al, 2013).

2.4 Biomarcadores e estresse oxidativo

Durante os últimos 20 anos, o uso e o desenvolvimento de biomarcadores vêm se tornando cada vez mais relevantes nas avaliações toxicológicas, pois permite a detecção precoce de efeitos gerais induzidos por contaminantes (MONFERRÁN et al., 2011) em vários organismos, como peixes (BACCHETTA et al, 2014; MELA et al, 2013; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) e anfíbios (ATTADEMO et al, 2014; CAVAS; TARHAN, 2002; GÜNGÖRDÜ, 2013; LEITE et al., 2010). Este aumento no uso de biomarcadores pode ser explicado pelo fato de que análises biológicas dão informações adicionais que não são detectadas pelos métodos químicos.

Os biomarcadores têm a capacidade de mostrar tanto os impactos toxicológicos agudos quanto os crônicos, mostrando assim as consequências de vários poluentes cujas concentrações variam de acordo com o tempo e o espaço (MAGGIONI et al., 2012). A mera presença do contaminante químico em um segmento de um ecossistema aquático não indica que vai causar um efeito nocivo. De acordo com van der Oost, Beyer e Vermeulen (2003) é necessário estabelecer conexões entre os níveis de bioacumulação e os primeiros efeitos adversos. Os biomarcadores desempenham um importante papel na compreensão das relações entre a exposição a poluentes, o desenvolvimento de doenças e a identificação dos subgrupos que estão com maiores riscos de contaminação (COTOU; TSANGARIS; HENRY, 2013).

Segundo Jesus e Carvalho (2008), os biomarcadores podem ser classificados como de efeito, de exposição ou de suscetibilidade. Os de exposição são alterações biológicas mensuráveis que evidenciam a exposição dos organismos a um poluente. Estes biomarcadores devem ser sensíveis e específicos para os compostos a serem estudados.

Os biomarcadores de efeitos, em geral, não são específicos em relação aos estressores e não fornecem informações sobre a sua natureza, mas são característicos da ocorrência de estresse que poderá ser reversível tão logo o estressor cesse a atuação. Eles são caracterizados pela indução do mecanismo de defesa celular, que se inicia sempre como uma resposta adaptativa a nível molecular/bioquímico. Entretanto, se esse mecanismo falha ou se sua capacidade de resposta é ultrapassada, podem ser desencadeadas alterações fisiológicas ou histológicas, podendo ser irreversíveis, dependendo da capacidade do sistema em responder ao estressor.

.

Os biomarcadores de suscetibilidade podem ser definidos como indicadores de processos que causam variações de repostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito (BARETT et al., 1997), determinando condições tal como indivíduo sadio, compensação do metabolismo, perturbação das funções, alterações morfológicas e morte.

Alguns autores defendem outra classificação que inclui, além dos citados acima, os biomarcadores de exposição e efeito. Estes, além de indicarem a ocorrência de exposição a determinados poluentes, podem ligar, com especificidade, essa exposição ao efeito, conseguindo assim caracterizá-lo (FOSSI; LEONZIO, 1993).

As ERO são radicais livres ou moléculas reativas instáveis indispensáveis para o funcionamento das células, no entanto, seu excesso pode ser prejudicial, podendo ocorrer lesões oxidativas às macromoléculas, a peroxidação de lipídios da membrana e prejuízos ao funcionamento da atividade das enzimas presentes nos tecidos das células (BARREIROS; DAVID, J.M; DAVID, J.P., 2006; RIBEIRO et al., 2005).

A peroxidação lipídica é observada quando ocorre a oxidação dos lipídios da membrana celular causada pelo ataque das ERO, gerando subprodutos como cetonas e aldeídos, como por exemplo o malondialdeído (MDA), o qual é considerado um biomarcador importante da peroxidação lipídica, podendo ser quantificado e utilizado como indicativo de estresse oxidativo (DE ZWART et al, 1997; VAN DER OOST; BEYER e VERMEULEN, 2003).

Como as enzimas do sistema de defesa antioxidante atuam para combater as ERO e minimizar os danos causados pelas mesmas, elas podem ser consideradas como biomarcadores de contaminação. A medição das concentrações de antioxidantes não enzimáticos, como a glutationa reduzida (GSH) como também as enzimáticas, por exemplo, a glutationa S-transferase (GST), a glutationa peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), assim como a determinação dos produtos de oxidação das moléculas biológicas, como a medida da peroxidação lipídica, são úteis na avaliação do possível estresse oxidativo causado por poluentes ambientais (ALMEIDA et al, 2005; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

.

2.5 Metabolismo de biotransformação e enzimas antioxidantes

As enzimas do metabolismo de biotransformação têm a função de tornar os compostos absorvidos mais solúveis para poderem ser excretados, já que geralmente são compostos lipofílicos. O metabolismo de biotransformação pode ser dividido em três fases distintas. A primeira está relacionada com as reações de oxidação, redução e hidrólise, a segunda com as reações de conjugação e a terceira é a fase da excreção (SANCHES, 2014).

Na fase I, o principal responsável pelas reações de oxidação é o complexo multienzimático de monooxigenases do citocromo P450, pertencentes a família de heme-proteínas ligadas à membrana do retículo endoplasmático e encontradas, preferencialmente, no microssoma das células hepáticas. Nesta fase, são geradas moléculas polares que poderão ser conjugados com moléculas endógenas durante a fase II (HODGSON, 2004).

A fase II do metabolismo de detoxificação envolve as reações de conjugação, nas quais ocorre a ligação do composto a um grupo ligante endógeno, tais como o ácido glucurônico e a glutationa. Esta ligação resulta em um conjugado altamente solúvel em água, podendo assim ser mais facilmente excretado do organismo (HODGSON, 2004).

Uma família de enzima importante pertencente a fase II é a glutationa S-transferase (GST), a qual possui diferentes isoformas (alpha, pi, sigma, theta, entre outras), encontradas no citosol das células e capazes de catalisar reações de conjugações com a glutationa reduzida (GSH) (DI GIULIO; HINTON, 2008). Para a avaliação desta enzima é utilizado um substrato artificial, o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), pois este serve de substrato para diferentes isoformas da GST (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Na fase III, os substratos formados durante as outras duas fases serão excretados.

As ERO formadas no organismo como resultados da respiração ou do metabolismo de biotransformação são removidas pelo via de defesa antioxidante, o qual é formado por enzimas específicas que catalisam reações que transformam os radicais reativos e as moléculas pró-oxidantes em moléculas não reativas (DI GIULIO; HINTON; 2008; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante encontrada nos peroxissomos das células e é responsável por reduzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). As

moléculas de peróxido de hidrogênio podem estar relacionadas com o excesso de ERO no organismo ou então com o aumento da beta-oxidação dos ácidos graxos para a produção de energia (GIULIO; HINTON, 2008). Outro sistema enzimático responsável pela redução de peróxido de hidrogênio é o das peroxidases, onde se encontram as glutationas peroxidases (GPx) como também algumas isoformas da GST que possuem esta atividade de peroxidase (ALMEIDA et al, 2005; DI GIULIO; HINTON; 2008).

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) pode ser considerada uma enzima antioxidante coadjuvante, sendo a principal reguladora da via das pentoses e responsável pelo fornecimento de NADPH, o qual é necessário nas reações da fase I do metabolismo de biotransformação e na regeneração da GSH. E, quando este fornecimento está prejudicado, a função antioxidante da enzima pode ser afetada (MARGARIDO, 2011).

2.6 Quantificação de compostos orgânicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS)

Para a detecção e quantificação de compostos orgânicos, como agrotóxicos, em compartimentos ambientais como água, solo e sedimento, é imprescindível o uso de métodos analíticos com alto grau de sensibilidade, seletividade e confiabilidade.

A cromatografia é uma técnica analítica de separação, na qual os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases, uma denominada estacionária e outra chamada de móvel, a qual percola através da fase estacionária. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes são seletivamente retidos entre as duas fases, resultando assim migrações diferenciais. Na cromatografia gasosa, a amostra a ser analisada é introduzida na coluna contendo a fase estacionária, por um sistema de injeção, que, com a utilização de temperatura no injetor e na coluna é possível que a vaporização das substâncias ocorra e as mesmas, dependendo de suas volatilidades e propriedades da fase estacionária, percorram a coluna em tempos distintos, podendo assim, com um detector adequado, serem identificadas e quantificadas (SABIN, 2007). Os detectores utilizados juntamente com o cromatógrafo gasoso podem ser seletivos, como o detector de captura de elétrons e o detector fotométrico de chama, ou podem ser do tipo universal, como o detector de ionização por chama e o espectrômetro de massa.

.

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica que se faz possível identificar substâncias químicas, separando os íons gasosos em campos elétricos e magnéticos, classificando-os de acordo com sua relação massa-carga. A MS fornece informações qualitativas e quantitativas sobre a composição atômica e molecular tanto de compostos orgânicos como inorgânicos (STRELAU, 2006). Normalmente, a identificação dos compostos por meio da MS é feita utilizando bibliotecas digitais e também utilizando padrões com grau de pureza elevado, permitindo assim uma maior precisão (RANGEL,2008).

Vários autores fazem uso do cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) para a quantificação de compostos orgânicos em compartimentos ambientais. Alguns estudos quantificaram o próprio fipronil, objeto deste trabalho, em amostras de água (ARAÚJO et al, 2013; TAVAKOLI; HAJIMAHMOODI; SHEMIRANI, 2014), solo (YANG; YING; KOOKANA, 2010), sedimento (BRONDI et al, 2011), vegetais e frutas (PARAMASIVAM; CHANDRASEKARAN, 2013). Outros compostos orgânicos contaminantes também foram quantificados utilizando GC-MS em amostras de ar (YENISOY-KARAKAS; GAGA, 2013), água (ARAÚJO et al, 2013; MORENO-GONZÁLEZ; CAMPILLO; LEÓN, 2013; QIN et al, 2013; SICHILONGO; BANDA, 2013), solo (SICHILONGO; BANDA, 2013; VÍLCHEZ et al, 2001; WU; HU, 2014), sedimento (KANZARI et al, 2014; LU et al, 2013; SICHILONGO; BANDA, 2013), vegetações (DOMÍNGUEZ et al, 2014; SICHILONGO; BANDA, 2013) e em organismos, como peixes (MUNARETTO et al, 2013; SAPOZHNIKOVA, 2014).

2.7 Avaliação de biomarcadores de contaminação em anfíbios

A população de anfíbios está em declínio no mundo todo, tendo este panorama aumentado drasticamente nas últimas décadas, fazendo com que o grupo de vertebrados terrestres seja o mais ameaçado atualmente. Este declínio pode ser considerado catastrófico, principalmente no Brasil, pois o país possui o maior número de espécies registradas, sendo assim uma região de alta riqueza e endemismo de espécies (TOLEDO et al, 2010). Em 2012, no Brasil, era possível encontrar 946 espécies distintas de anfíbios, sendo 913 espécies apenas de anfíbios anuros, segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2012).

Pelo fato de os anfíbios terem seus ciclos de vida tanto na água como na terra, possuem papel importante no ecossistema aquático, e, por serem bastante sensíveis, uma vez

.

que possuem pele permeável, têm sido bastante utilizados como organismos sentinela em estudos de contaminação ambiental (MARCANTONIO et al, 2011; USEPA, 2002).

Há vários estudos na literatura que utilizam anfíbios como biomarcadores de contaminação. Jones e colaboradores (2010) avaliaram o sistema de defesa antioxidante de girinos de rã-touro americana (*Lithobates catesbeianus*) expostos ao herbicida paraquat em 4 concentrações distintas e um controle durante 24 horas. Leite e colaboradores (2010) estudaram o efeito do inseticida organofosforado diazinon nas esterases de girinos da espécie *Scinax fuscovarius* expostos a duas concentrações do agrotóxico durante dois períodos de exposição (2 e 7 dias). Margarido e colaboradores (2013) também trabalharam com girinos da espécie *Scinax fuscovarius*, porém estudaram o efeito do inseticida fipronil nas enzimas de defesa antioxidante nos organismos, realizando duas exposições, uma durante dois dias, utilizando duas concentrações, e outra em 7 dias, utilizando mais duas concentrações distintas. Um outro exemplo é o estudo de Güngördü (2013), no qual foram comparados os efeitos toxicológicos do inseticida methidathion e do herbicida glifosato em três espécies de anfíbios, a fim de investigar a sensibilidade de cada espécie a estes contaminantes.

Neste trabalho, a espécie de anfíbio anuro estudada foi a *Eupemphix nattereri* (Steindachner, 1863), pertencente à família *Leiuperidae.* Esta pode ser naturalmente encontrada na região noroeste do estado de São Paulo durante o período chuvoso e, pelo fato de ser um anfíbio do tipo fossorial, animais desta espécie costumam habitar corpos de água temporários, como lagoas e pântanos, ficando em contato com solos e sedimentos destes ambientes, por serem bentônicos (AQUINO et al., 2004; ROSSA-FERES; JIM, 2001).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do fipronil e dois de seus metabólitos, fipronil sulfona e fipronil sulfeto, em parâmetros de estresse oxidativo em girinos da espécie *Eupemphix nattereri* depois de expostos a estes contaminantes em amostras de água e sedimento.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar exposição dos girinos ao fipronil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto em três concentrações distintas, por um período determinado.
- Quantificar o fipronil e seus metabólitos no sedimento e na água, por cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massa em dois períodos distintos, um e sete dias;
- Analisar o efeito do fipronil e seus produtos de degradação sobre os biomarcadores bioquímicos de contaminação glutationa S-transferase, glicose 6-fosfato desidrogenase, catalase após a exposição;
- Avaliar o nível da peroxidação lipídica nos girinos após a exposição.

.

4 Parte Experimental

4.1 Reagentes

No presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: acetato de etila (Sigma-Aldrich, México), acetona (Macron Fine Chemicals, Estados Unidos), ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma-Aldrich, Alemanha), butanol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Sigma-Aldrich, Alemanha), dicloreto de magnésio ($MgCl_2$) (Sigma-Aldrich, Japão), diclorometano (Macron Fine Chemicals, Estados Unidos), glicose-6-fosfato (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), glutationa reduzida (GSH) (Sigma-Aldrich, Japão), hexano (Fluka Analytical, Espanha), isopropanol (Sigma-Aldrich, Alemanha), metanol (Merck – SupraSolv®, Alemanha), Extran® MA 02 (Merck – Brasil), fenilmetanosulfonil fluoreto (PMSF) (Sigma-Aldrich, China), reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), sulfato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os padrões analíticos utilizados foram: fipronil (98,3 %), fipronil sulfona (99,3 %) e fipronil sulfeto (99,0 %) (ChemService, Pensilvânia). O surrogate diazinon-d10 e o padrão interno fenantreno-d10 utilizados no trabalho foram obtidos da Sigma-Aldrich (Estados Unidos).

4.2 Instrumentação

Os equipamentos utilizados para a realização deste projeto foram os seguintes

- Cromatógrafo gasoso (Modelo 7890A – Agilent Technologies, Estados Unidos) acoplado ao espectrômetro de massas (Modelo 5975C – Agilent Technologies, Estados Unidos), utilizando coluna cromatográfica HP-5MS (5% fenil – 95% polidimetilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Modelo Coulchem III - ESA, Estados Unidos) acoplado ao Espectrofotômetro UV-Vis (Modelo 526 - ESA, Estados Unidos), utilizando coluna cromatográfica Shimadzu C18 (150 x 4,6mm, 5 μm – Shimadzu, Estados Unidos)
- Espectrofotômetro UV-Vis (Modelo Evolution 300 -Thermo Scientific, Estados Unidos)
- Espectrofotômetro UV-Vis do tipo microplacas (Modelo Victor™ X3 - Perkin Elmer, Singapura)

- Aparelhos multiparâmetros:

  - Turbidímetro (Modelo HI 93703 – Hanna Instruments, Romênia)
  - Oxímetro (Modelo HI 9146 – Hanna Instruments, Romênia)
  - pHmetro (Modelo Waterproof pHTestr 30 – Oatkon, Malásia)

4.3 Surrogate (Diazinon-d10)

Surrogate é um composto deuterado, utilizado em uma concentração conhecida e adicionado em todas as amostras para que seja possível minimizar erros grosseiros durante o processamento das mesmas, avaliando a eficiência da extração, uma vez que não é esperado que este composto esteja presente no ambiente e deve ser similar aos compostos de interesse (DE OLIVEIRA; TAVARES; BERETTA, 2005; USGS, 1998). Neste trabalho a solução surrogate utilizada para fortificar todas as amostras quantificadas foi a de Diazinon – d10 40 $\mu g\ L^{-1}$.

4.4 Padrão Interno (Fenantreno-d10)

Em todos os padrões e amostras, foi adicionado padrão interno, que consiste em uma substância que não é capaz de reagir com os analitos de interesse, porém é similar. O padrão interno é utilizado para minimizar erros aleatórios e sistemáticos, já que se mantem uma concentração fixa do mesmo. Com as áreas dos picos no espectro, é feita a correlação da área padrão interno com a área dos analitos de interesse, para então, ser possível realizar os cálculos de concentração de cada composto estudado. (LIGIERO et al., 2009; RIBANI et al., 2004; TAN; MOHD, 2003) Neste trabalho foi utilizado como padrão interno o Fenantreno-d10 na concentração de 1,0 mg L^{-1} em todas as amostras quantificadas.

4.5 Lavagem de vidrarias

O procedimento de lavagem das vidrarias é de grande importância para impedir a introdução de contaminantes nas amostras com o analito de interesse. Por isso, todos as vidrarias utilizadas neste trabalho foram deixadas de molho em solução de Extran® MA 02 5% por no mínimo duas horas, e, após isso, enxaguadas com água corrente e então passado água ultrapura 3 vezes. As vidrarias utilizadas na coleta de amostra de água foram lavadas com solvente metanol. Para a secagem das vidrarias, as mesmas foram deixadas em estufa a

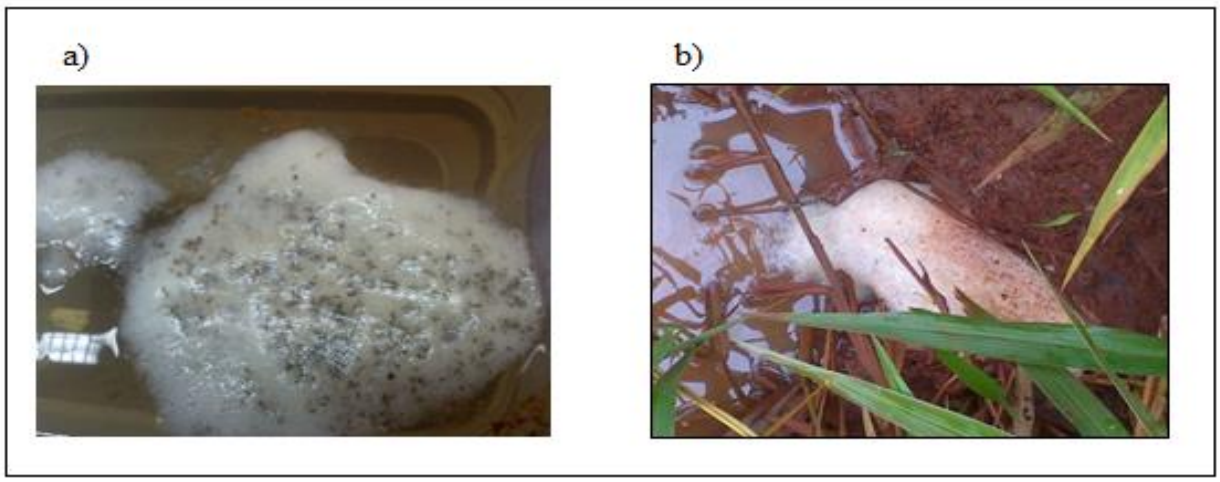
.

110°C até secagem completa, e, as vidrarias volumétricas e as de plástico foram secas a temperatura ambiente, na capela.

4.6 Coleta e Amostragem

A desova de girinos da espécie *Eupemphix nattereri* **(Figuras 3 a,b**) foi coletada sob licença n. 18573-1, autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), no dia 26 de fevereiro de 2013 em uma lagoa localizada na região de São José do Rio Preto (S 20° 70' 700", W 49° 31' 106") **(Figura 4)**, no noroeste do estado de São Paulo, pela equipe de coleta do Laboratório de Anatomia do Prof. Dr. Classius de Oliveira, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de São José do Rio Preto, no Departamento de Biologia. Os girinos foram mantidos em aquários e tratados em laboratório localizado também na UNESP, Campus de São José do Rio Preto/SP, até atingirem estágio entre 29 – 33 (Gosner, 1960), tendo se desenvolvido o suficiente para ser realizado o experimento. O solo a ser utilizado nos experimentos foi coletado em condomínio residencial, onde não seria provável encontrar vestígios de agrotóxicos, dentro da cidade de São José do Rio Preto. Este trabalho foi liberado pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP de São José do Rio Preto (CEUA – IBILCE/UNESP), processo nº 086/2013.

Figura 3 Foto da desova de girinos. a) Desova. b) Desova antes de ser coletada, na lagoa.



Após o experimento, as amostras de água a serem analisadas foram armazenadas em frascos de vidro tipo âmbar com capacidade para 1,0 L, na geladeira a 4°C; as amostras de sedimento foram armazenadas em embalagens de alumínio, no freezer a -18°C, os girinos

foram congelados utilizando nitrogênio líquido, armazenados em criotubos de plástico, em freezer a -80°C, seguindo as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 9898 (ABNT, 1987) e do Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras da Agência Nacional das Águas (ANA, 2011)

Figura 4 Lagoa onde as desovas foram coletadas, próxima a cidade de São José do Rio Preto.



4.7 Montagem de experimento

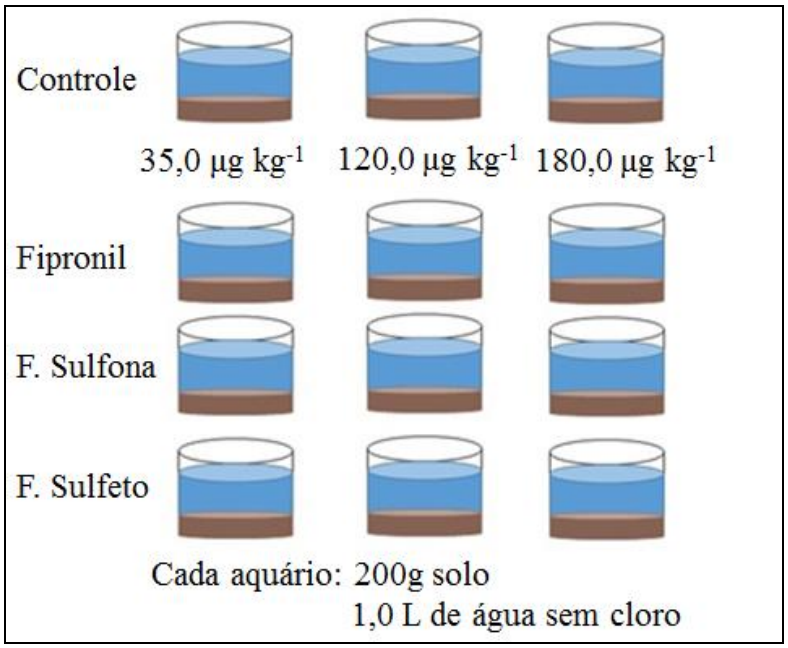
Foram realizados dois experimentos, um a fim de observar o comportamento do analito na água e no sedimento em apenas um dia (experimento 1), e outro feito no período de 7 (sete) dias, utilizando água, sedimento e girinos (experimento 2).

Para a escolha das concentrações estudadas foram utilizados resultados obtidos por De Toffoli (2014), trabalho realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Estudos em Ciências Ambientais (LECA), no qual foi observada, no ambiente estudado, a presença de fipronil e de seus metabólitos contidos em sedimentos, em concentrações na faixa de 35,0 a 180,0 μg kg^{-1} de solo. Baseado nesses resultados, as concentrações escolhidas para o estudo foram a mínima (35,0 μg kg^{-1}), a máxima (180,0 μg kg^{-1}) e uma intermediária (120,0 μg kg^{-1}).

Para o experimento 1, cada aquário continha 1,0 L de água sem cloro, 200 g de sedimento e analito, nas três concentrações estudadas. Sendo 3 aquários para o grupo controle, 3 para o grupo fipronil, 3 para o grupo fipronil sulfona e 3 para o grupo fipronil sulfeto, totalizando 12 aquários. No grupo controle apenas foi adicionado o volume necessário para cada concentração do solvente no qual os padrões do fipronil e de seus metabólitos haviam sido previamente preparados, no caso, acetona, sendo estes volumes de 90,0; 330,0 e 500 μL. (**Figura 5**)

.

Figura 5 Esquema geral do experimento 1.



Para o experimento 2 foram montados, no total, 48 aquários, sendo que os mesmos foram divididos em 4 (quatro) grupos, como já foi descrito anteriormente. Porém, neste experimento, para cada grupo haviam 12 aquários, sendo realizado quadruplicatas de cada concentração (35,0; 120,0 e 180,0 µg kg^{-1}). Em cada aquário foram adicionados 200 g de sedimento, 1,0 L de água sem cloro, o volume de padrão necessário e 8 (oito) girinos. Portanto, no total, foram utilizados 384 girinos. Durante o experimento, foram utilizadas bombinhas de ar para que a água fosse oxigenada, e os girinos foram alimentados a cada dois dias (**Figuras 6 e 7**). Após o período do experimento, os girinos foram colocados em criotubos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80ºC para posteriores análises.

Figura 6 Esquema geral do experimento 2.

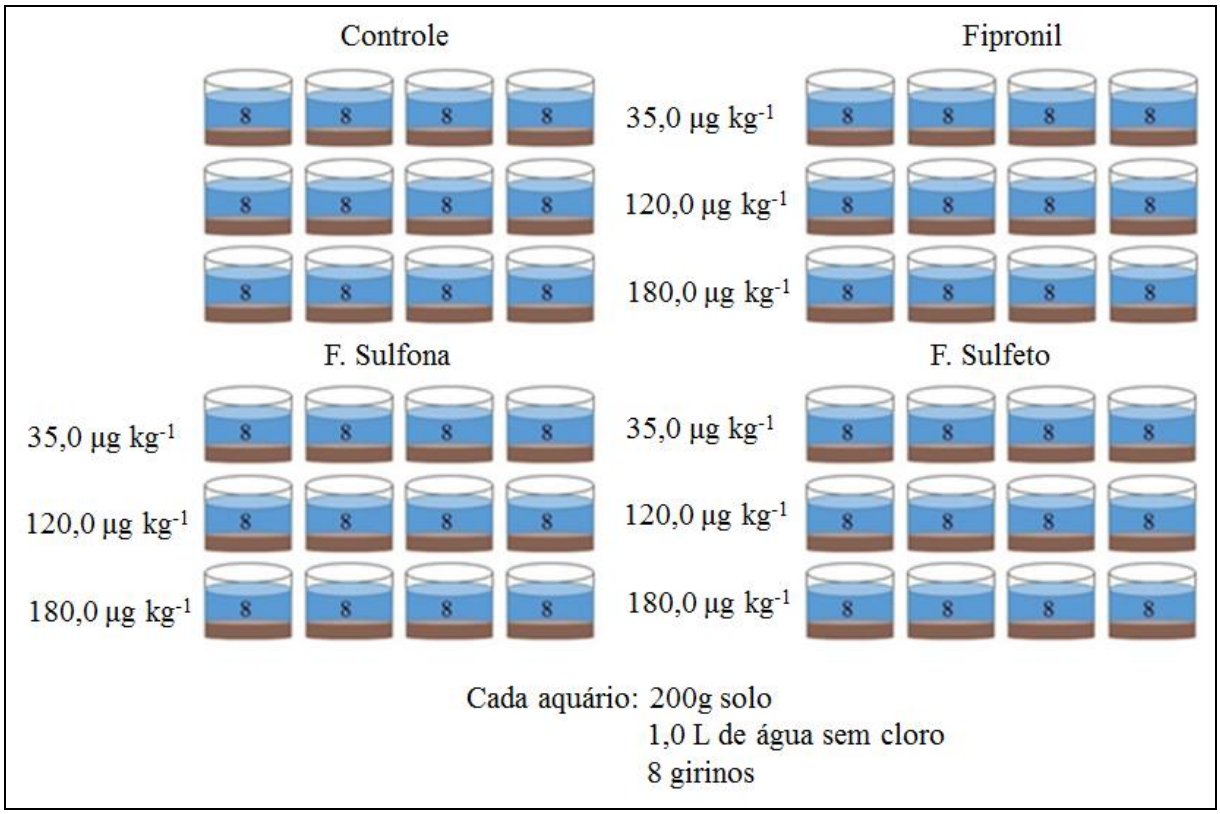
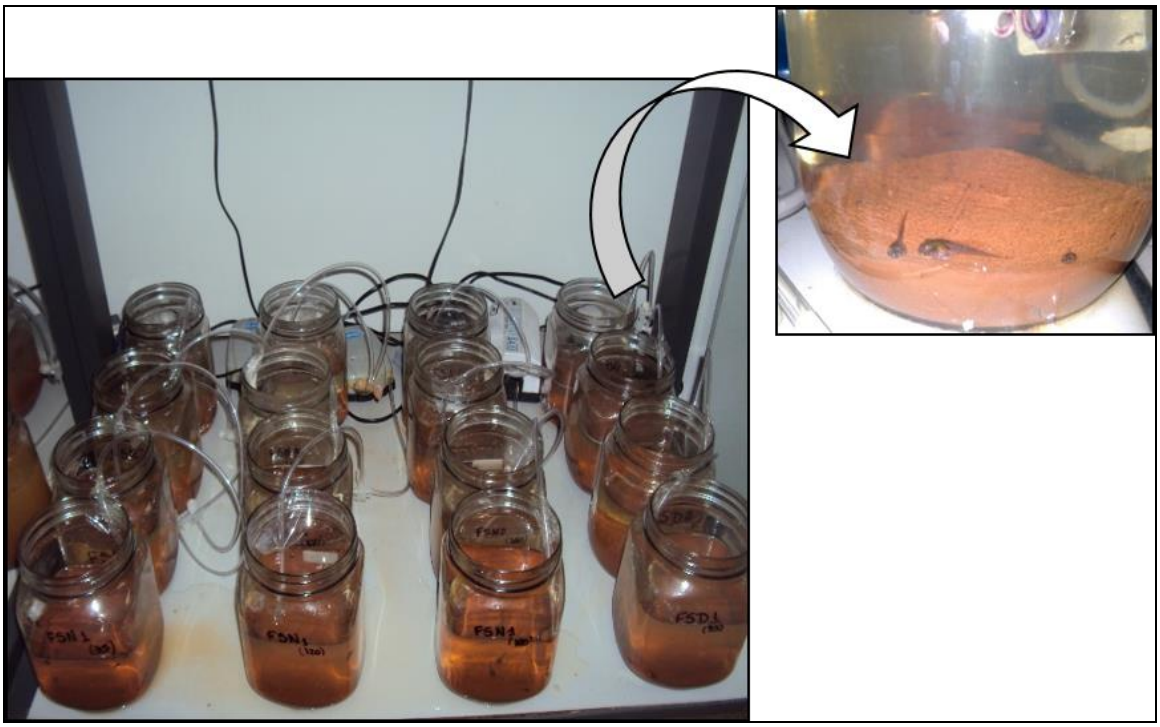


Figura 7 Foto de parte do experimento 2, com detalhe para o girino dentro do aquário.



4.8 Parâmetros físico-químicos das amostras de água

Após os experimentos, antes de se realizar a coleta das amostras, foram analisados os parâmetros físico-químicos das águas dos aquários utilizados. Foram realizadas as análises de pH, oxigênio dissolvido, temperatura e turbidez, utilizando aparelhos multiparâmetros.

4.9 Extração e Quantificação

4.9.1 Água

A extração e quantificação do agrotóxico fipronil e de seus metabólitos em amostras de água foi feita pelo método de SPE (extração em fase sólida) empregando-se cartuchos C18 segundo o método adaptado por De Toffoli (2014).

As amostras foram filtradas em membrana de fibra de vidro 0,7 μm para posterior extração. Utilizando-se um sistema manifold e tubos de PEEK de 1/16 mm de diâmetro, os cartuchos foram condicionados com 3,0 mL (3 alíquotas de 1,0 mL) de solução hexano:isopropanol 1:1 (v/v), 0,5 mL de metanol e 1,0 mL de água deionizada para que 400 mL de amostra previamente fortificada com 40 μg L^{-1} de surrogate Diazinon - d10 fossem percolados com vazão aproximada de 2,0 mL min^{-1} (**Figura 8**). Após a percolação total da amostra foi feita a eluição dos analitos com 3,0 mL de acetato de etila (3 alíquotas de 1,0 mL) por gravidade. O eluato foi evaporado com nitrogênio até a secagem completa e ressuspendido em 800 μL de acetato de etila e 200 μL de solução de padrão interno Fenantreno – d10 5,0 mg L^{-1}, totalizando 1,0 mL. Após a ressuspensão, 2,0 μL da amostra foram injetados em GC-MS para quantificação dos analitos. (**Figura 9**)

Figura 8 Sistema de extração utilizado para pré-concentração das amostras de água, utilizando cartuchos SPE e sistema manifold.



Figura 9 GC-MS utilizado na quantificação das amostras de água e sedimento.



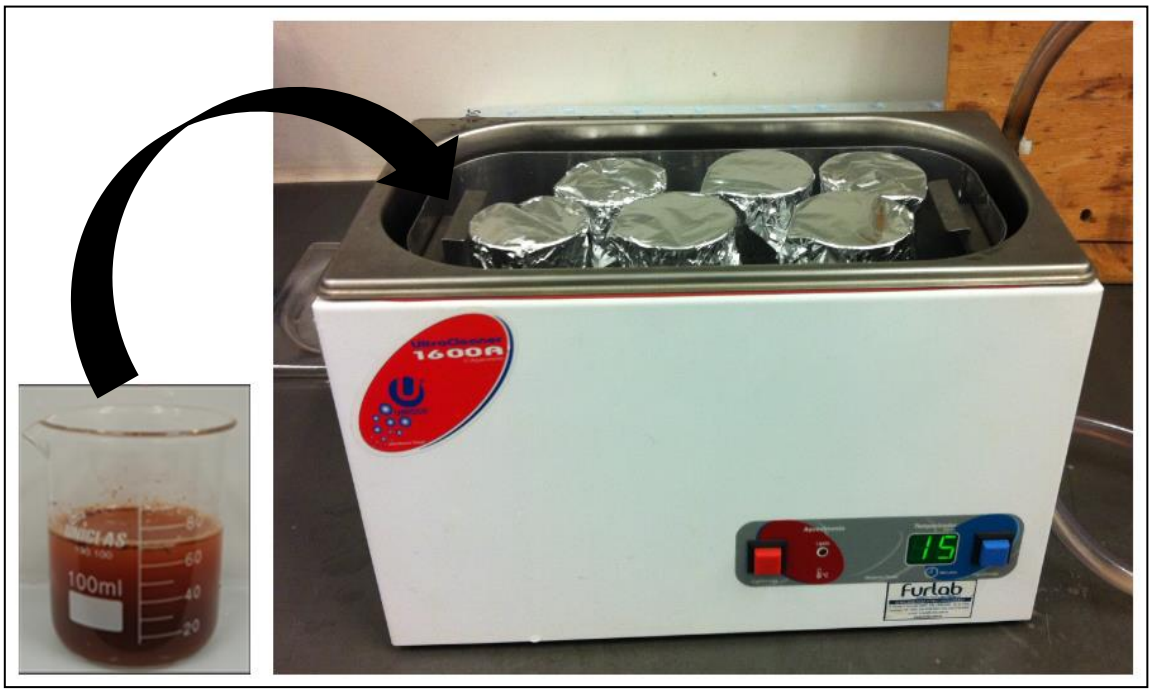
.

4.9.2 Sedimento

A extração do agrotóxico fipronil e de seus metabólitos em amostras de sedimento foi realizada por ultrassom, seguindo o método de De Toffoli (2014).

Primeiramente a amostra foi homogeneizada e deixada em vidros relógios em temperatura ambiente até secagem total. Para a extração foram pesados 20,0 g de sedimento e 10,0 g de sulfato de sódio anidro, e então as amostras foram fortificadas com 40 µg L^{-1} de surrogate Diazinon – d10 e, após isso, foram adicionados 50,0 mL de solução de acetona:diclorometano 1:1 (v/v) e em seguida procedeu-se à extração, realizada durante 15 minutos em banho de ultrassom (**Figura 10**). O extrato obtido (sobrenadante) foi transferido para tubos de ensaio e deixado em repouso para decantar, armazenados em freezer a -18°C. Posteriormente, as amostras foram filtradas em fibra de vidro 0,7 µm. As amostras então foram secas com nitrogênio e ressuspendidas em 800 µL de acetato de etila e 200 µL de solução de padrão interno Fenantreno – d10 5,0 mg L^{-1}, totalizando 1,0 mL; foram então injetados 2,0 µL das amostras no GC-MS para a quantificação.

Figura 10 Mistura do sedimento com os solventes acetona:diclorometano (1:1) para extração por ultrassom, durante 15 minutos.



4.10 Destino dos resíduos gerados no desenvolvimento do trabalho

A disposição indevida de resíduos gerados após uma pesquisa também pode acarretar danos ao meio ambiente, assim como em processos industriais, contrapondo-se assim aos objetivos do grupo de pesquisa. Portanto os resíduos gerados durante a execução deste trabalho foram tratados, minimizando os efeitos que estes compostos poderiam trazer ao meio ambiente. Os resíduos gerados foram acondicionados em recipientes apropriados, etiquetados e estocados em local ventilado até terem sido encaminhados ao Programa de Gerenciamento de Resíduos do IBILCE/UNESP, o qual é responsável pelo tratamento e destinação adequada dos resíduos.

4.11 Análises bioquímicas

4.11.1 Processamento das amostras

Os animais foram pesados, homogeneizados inteiros utilizando um mixer Dremel® modelo 3000, com quatro vezes o volume de tampão de homogeneização Tris-HCl pH 7,5, contendo inibidor de protease PMSF (fenilmetanosulfonil fluoreto) e centrifugados a 9.000 x *g*, a 3°C, durante 20 minutos. A fração sobrenadante foi submetida a uma segunda centrifugação de 50.000 x *g*, a 1°C, durante 60 minutos. O sobrenadante, correspondente à fração citosólica, foi aliquotado para a análise da atividade das enzimas GST, G6PDH, CAT e para a quantificação de proteínas.

4.11.2 Glutationa S-Transferase

A atividade da GST foi medida seguindo-se o método descrito por Keen, Habig e Jakoby (1976) utilizando-se um espectrofotômetro do tipo microplacas, nas quais foram adicionadas o meio reacional contendo amostra, 1mM de CDNB, 1 mM de GSH em meio contendo tampão fosfato 0,2M pH 6,5. O aumento da absorbância foi acompanhado a 340 nm. Os resultados da atividade da GST foram expressos em U mg proteína^{-1} (atividade específica).

4.11.3 Catalase

A atividade da CAT foi medida pelo método espectrofotométrico adaptado de Beutler (1975), método este que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima, por meio do decréscimo de absorbância em 240 nm a 30ºC. Para as análises foram utilizadas cubetas de quartzo, nas quais foram adicionadas o meio de reação contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), tampão Tris-HCl 1,0 M pH 8,0, água deionizada e amostra. Os valores de atividade de CAT foram expressos em U mg proteína^{-1}, onde cada unidade corresponde à quantidade de enzima capaz de hidrolisar um μmol de H_2O_2 em um minuto, na temperatura de 30ºC, em pH 8,0.

4.11.4 Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A análise da G6PDH foi feita em espectrofotômetro do tipo microplacas seguindo o método de Glock e McLean (1953), no qual a formação de NADPH é medida pela variação da absorbância a 340 nm. O ensaio consiste na redução de NADP a NADPH pela G6PDH utilizando como substrato a glicose 6-fosfato (G6P) e como cofator os íons de Mg^{2+} do $MgCl_2$. A amostra foi adicionada a um meio de reação contendo G6P; tampão Tris-HCl 0,1 mol.L^{-1}, pH 7,4; $MgCl_2$ e NADP. Os valores da atividade da G6PDH foram expressos na unidade U mg proteína^{-1}.

4.11.5 Quantificação de Proteínas

A quantificação de proteína foi realizada seguindo o método de Bradford (1976). O reagente de Bradford contém Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução ácida. Este, ao se ligar às proteínas, tem sua absorbância alterada de 465 nm para 595 nm devido a mudança na coloração de castanho para azul, consequência da interação entre a proteína e o corante que estabiliza a forma iônica do mesmo. A análise foi realizada utilizando espectrofotômetro do tipo microplacas no comprimento de onda de 595 nm. Esta quantificação foi utilizada apenas para os cálculos das atividades específicas de cada enzima.

4.12 Peroxidação Lipídica

A avaliação da peroxidação lipídica nos girinos foi feita segundo o método desenvolvido por Almeida e colaboradores (2003, 2004), o qual consiste em analisar a

.

presença do produto formado entre o MDA e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), via cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC) acoplado ao detector UV/Vis. Para a análise, girinos de aproximadamente 100 mg foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, em uma proporção de 1:3. Após a homogeneização, 300 µL de TBA diluído em HCl 0,4% foram adicionados a amostra. A mistura foi aquecida a 90°C durante 40 minutos. O produto da reação foi extraído com 1,0 mL de n-butanol e a quantificação no HPLC-UV/Vis foi realizada no comprimento de onda de 532 nm. Os dados da peroxidação lipídica foram expressos em pmol de MDA mg de tecido^{-1}.

4.13 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software R versão 2.11.1 (R Development Core Team, 2010). Foi avaliado se as atividades das enzimas GST, G6PDH, CAT e o nível da peroxidação lipídica foram alterados após os experimentos. A presença de outliers foram avaliados e a distribuição normal foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk.

Para as análises com dados paramétricos, as diferenças estatísticas foram avaliadas usando o teste ANOVA seguido pelo teste TUKEY. Os valores com $p<0,05$ foram considerados como diferenças estatisticamente significativas, e para os dados não paramétricos, as diferenças estatísticas foram avaliadas usando o teste Kruskal-Wallis seguido de teste complementar de comparação múltipla das médias.

5 Resultados e Discussão

5.1 Parâmetros físico-químicos da água

Na **Tabela 1** são apresentados os valores finais obtidos de parâmetros físico-químicos nas amostras de água do experimento 1 (água, analito e sedimento sem exposição de girinos por um dia), como só havia um aquário para cada tratamento, nesta tabela não estão apresentados valores de desvio padrão, pois só foi realizada uma medida para cada parâmetro. Estas análises foram feitas após passadas as 24 horas do experimento.

Na **Tabela 2** estão os resultados obtidos no experimento 2 (água, analito e sedimento com exposição de girinos por sete dias). Os parâmetros medidos foram pH, temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD) e turbidez, sendo C – grupo controle, F- grupo fipronil, FSN- grupo fipronil sulfona e FSD – grupo fipronil sulfeto, nas respectivas concentrações 35,0; 120,0 e 180,0 μg kg^{-1}. Estas análises foram feitas após os sete dias de experimento. Como no experimento 2 foram feitas 4 réplicas de cada tratamento, os valores mostrados abaixo correspondem à média das réplicas, com seus respectivos desvios padrões.

Tabela 1 Valores de pH, temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD) e turbidez para as amostras de água do experimento 1, o qual foi realizado em 24 horas, com aquários contendo água e sedimento com fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, nas concentrações de 35, 120 e 180 μg kg^{-1}, contendo um controle para cada concentração.

Amostras	pH	T (°C)	OD (mg L^{-1})	Turbidez (FTU)
C(35)	7,39	29,6	1,09	35,3
C(120)	7,13	29,8	1,17	35,9
C(180)	7,09	29,4	1,20	16,4
F(35)	7,22	29,3	2,77	68,3
F(120)	7,24	29,2	2,81	90,3
F(180)	7,24	29,0	3,27	89,3
FSN(35)	7,19	29,1	2,97	124,0
FSN(120)	7,19	28,0	3,08	67,0
FSN(180)	7,19	29,0	2,90	70,3
FSD(35)	7,15	28,9	2,67	123,0
FSD(120)	7,16	30,0	2,56	166,0
FSD(180)	7,19	29,6	2,86	92,0

O parâmetro OD, no experimento 1, variou entre 1,09 e 3,08. Esta variação pode ter ocorrido pelo fato de que, neste experimento, não foram utilizadas bombas de ar, fazendo com que este parâmetro ficasse baixo.

Os resultados de turbidez para as águas do experimento 1 ficaram entre 16,42 e 166, isto pode ter ocorrido pelo fato do solo não ter conseguido decantar totalmente, fazendo com que o valor variasse bastante.

Os valores de pH encontrados nas amostras de água de todos os tratamentos, nos dois experimentos, ficaram entre 7,09 e 7,83, valores estes próximos da neutralidade.

Tabela 2 Valores médios de pH, temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD) e turbidez para as amostras de água do experimento 2 (E2), com seus respectivos desvios padrões. O E2 foi realizado em 7 dias, com aquários contendo água, sedimento e 8 girinos, com fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, nas concentrações de 35, 120 e 180 μg kg^{-1}, contendo um controle para cada concentração.

Amostras	pH	T (°C)	OD (mg L^{-1})	Turbidez (FTU)
C (35)	7,71 ± 0,01	29,4 ± 0,22	4,29 ± 0,11	35,54 ± 6,51
C (120)	7,55 ± 0,05	29,8 ± 0,28	4,11 ± 0,12	23,42 ± 2,84
C (180)	7,52 ± 0,04	29,6 ± 0,33	4,17 ± 0,19	23,57 ± 1,00
F (35)	7,53 ± 0,05	29,2 ± 0,25	4,18 ± 0,12	29,45 ± 7,56
F (120)	7,55 ± 0,02	29,8 ± 0,37	4,13 ± 0,23	41,31 ± 11,14
F (180)	7,58 ± 0,06	29,8 ± 0,29	4,16 ± 0,26	32,88 ± 20,29
FSN (35)	7,44 ± 0,03	29,9 ± 0,13	3,98 ± 0,37	24,61 ± 6,03
FSN (120)	7,53 ± 0,06	29,7 ± 0,28	4,46 ± 0,40	14,42 ± 4,71
FSN (180)	7,55 ± 0,06	29,8 ± 0,48	4,11 ± 0,26	17,84 ± 7,02
FSD (35)	7,83 ± 0,10	30,0 ± 0,42	4,11 ± 0,35	19,93 ± 6,36
FSD (120)	7,83 ± 0,05	29,8 ± 0,31	4,04 ± 0,59	22,64 ± 5,15
FSD (180)	7,67 ± 0,05	30,0 ± 0,56	4,42 ± 0,16	19,78 ± 5,10

Fonte: autoria própria

Os resultados obtidos de OD para as águas utilizadas no experimento 2 variaram entre 3,98 e 4,46 para todos os tratamentos. Estes valores estão abaixo do valor mínimo de 5 mg L^{-1} estabelecido para águas doce Classe 2 pela Resolução CONAMA 357/2005, a qual dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para seu enquadramento. No entanto, este nível de OD não interferiu na sobrevivência dos girinos *E. nattereri,* pelo fato de não ter ocorrido nenhuma morte, como também foi mostrado no estudo de Castro e Pinto (2000) com girinos da espécie *Lithobates castebanius,* em um longo período de tempo (75 dias). No estudo de Vasconcelos (2014) observou-se que a diminuição de oxigênio dissolvido

.

pode estar relacionada com o modo de vida dos girinos, uma vez que em seu estudo, aquários contendo girinos da espécie *Lithobates castebanius* apresentaram em todos os experimentos, valores de OD menores do que os aquários em que não haviam girinos. Portanto, estes valores de OD não interferiram nas análises posteriores.

A turbidez para as águas do experimento 2 foi o que mais variou entre os tratamentos, sendo que os valores encontrados ficaram entre 19,78 e 76,66 FTU. Esta variação pode ser explicada pelo fato de terem sido utilizadas bombinhas de ar diferentes para cada aquário, não sendo possível, assim, estabelecer uma vazão de ar média para todos os aquários. Deste modo, alguns deles ficaram com maior quantidade de solo disperso na água, aumentando os valores de turbidez.

5.2 Quantificação dos analitos em amostras de água e sedimento

Os resultados encontrados para as amostras de água e sedimento do experimento 1 então mostrados na **Tabela 3**. A extração dos analitos nas amostras de água foram feitas em duplicata para cada aquário, a concentração mostrada na tabela abaixo é referente a média desta duplicata, com seu respectivo desvio padrão.

Tabela 3 Concentrações de fipronil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto encontradas nas amostras de água e sedimento utilizados no experimento 1, com seus respectivos desvios padrões. O E1 foi realizado em 24 horas, com aquários contendo água e sedimento com fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, nas concentrações de 35, 120 e 180 μg kg^{-1}, contendo um controle para cada concentração.

Amostras	Concentração na água (μg L^{-1})	Concentração no sedimento (μg 200g $sedimento^{-1}$)
C (35)	< LD*	< LD*
C (120)	< LD*	< LD*
C (180)	< LD*	< LD*
F (35)	7,10 ± 1,08	3,97 ± 0,28
F (120)	11,64 ± 1,00	15,24 ± 1,80
F (180)	14,68 ± 2,39	22,57 ± 5,22
FSN (35)	1,40 ± 0,03	1,18 ± 0,05
FSN (120)	8,94 ± 0,72	4,54 ± 1,26
FSN (180)	13,88 ± 2,54	14,47 ± 2,07
FSD (35)	1,66 ± 0,18	1,09 ± 0,27
FSD (120)	12,58 ± 2,09	6,56 ± 2,48
FSD (180)	21,00 ± 5,71	7,18 ± 0,80

* < LD : abaixo do limite de detecção do método

Para as amostras contendo fipronil, pode-se observar que nos aquários contendo 35,0 μg kg^{-1} o analito ficou majoritariamente na água. Já para as outras duas concentrações de estudo, o fipronil se depositou preferencialmente no sedimento, o que é de se esperar, uma vez que este composto é considerado de moderada lipofilicidade.

Nos aquários onde foram adicionados os produtos de degradação do fipronil, observa-se que, tanto o fipronil sulfona quanto o fipronil sulfeto, ficaram em maiores concentrações na água do que no sedimento. Isto pode ter ocorrido devido a duração do experimento, de 24 horas, mostrando assim que, apesar dos compostos serem considerados lipofílicos, eles demoram para ser absorvidos pelo sedimento.

Na **Tabela 4** estão mostradas as concentrações de fipronil e seus produtos de degradação encontradas nas amostras de água utilizadas no experimento 2. Como este experimento foi realizado em quadruplicata e para cada aquário foram realizadas duas extrações, o resultado mostrado abaixo é referente à média das oito concentrações encontradas para cada tratamento, com seus respectivos desvios padrões.

Tabela 4 Concentrações de fipronil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto encontradas nas amostras de água e sedimento utilizados no experimento 2, com seus respectivos desvios padrões. O E2 foi realizado em 7 dias, com aquários contendo água, sedimento e 8 girinos, com fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, nas concentrações de 35, 120 e 180 μg kg^{-1}, contendo um controle para cada concentração.

Amostras	Concentração na água (μg L^{-1})	Concentração no sedimento (μg 200g $sedimento^{-1}$)
C (35)	< LD*	< LD*
C(120)	< LD*	< LD*
C(180)	< LD*	< LD*
F(35)	1,03 ± 0,26	4,08 ± 0,46
F(120)	9,30 ± 0,68	18,55 ± 3,42
F(180)	14,05 ± 4,50	23,54 ± 3,37
FSN(35)	0,66 ± 0,37	5,27 ± 1,80
FSN(120)	3,21 ± 1,41	17,38 ± 2,60
FSN(180)	3,30 ± 0,89	30,92 ± 4,28
FSD(35)	0,90 ± 0,12	6,81 ± 0,97
FSD(120)	1,42 ± 0,22	23,66 ± 4,28
FSD(180)	3,55 ± 1,31	34,22 ± 3,71

* < LD : abaixo do limite de detecção do método

No experimento 2, a porcentagem de fipronil absorvido nas amostras de água variou de 15 a 39%, e no sedimento de 58 a 77%, confirmando assim a lipofilicidade do fipronil **(Figura 11).** O mesmo ocorreu para os produtos de degradação, sendo que a porcentagem de

.

fipronil sulfona absorvida no sedimento variou de 72 a 85%. Já para o fipronil sulfeto ficou entre 95 e 98% absorvido no sedimento **(Figuras 12 e 13)**

Figura 11 Gráfico das concentrações de fipronil adicionadas antes do experimento e encontradas na água e no sedimento após o experimento 2.

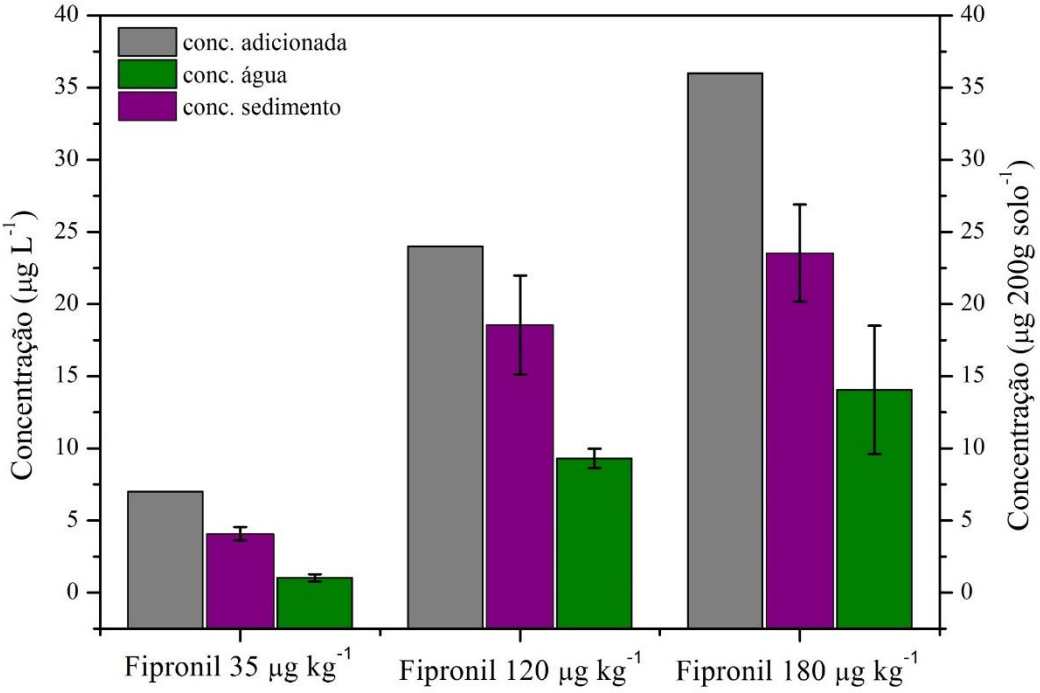


Figura 12 Gráfico das concentrações de fipronil sulfona adicionadas antes do experimento e encontradas na água e no sedimento após o experimento 2.

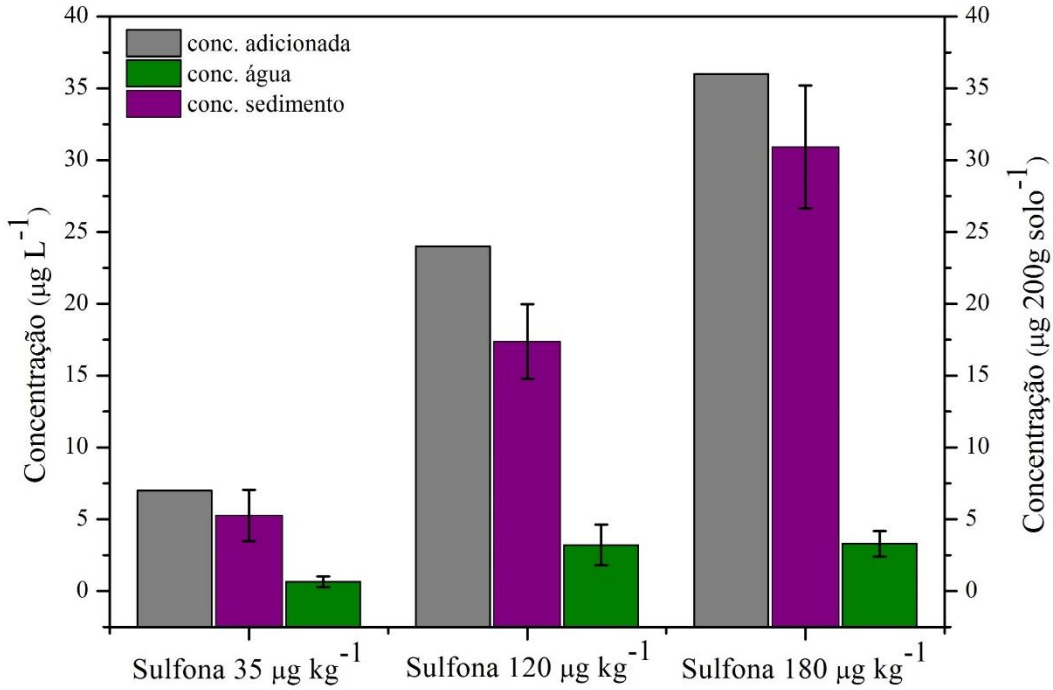
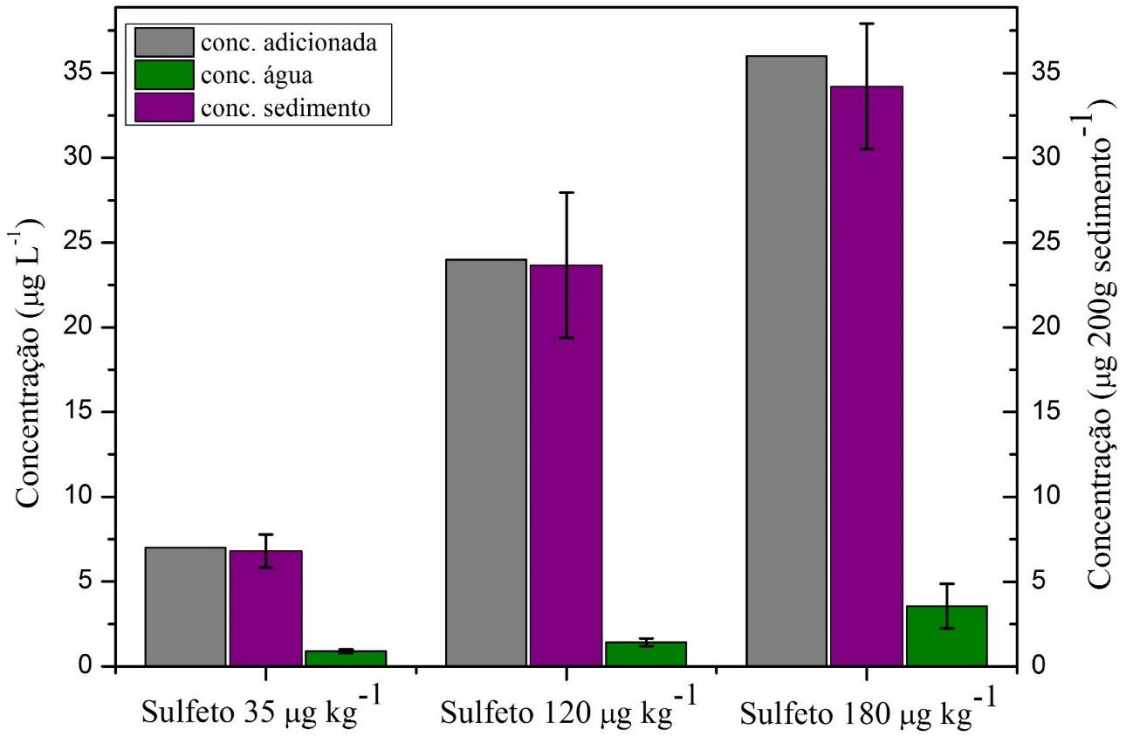


Figura 13 Gráfico das concentrações de fipronil sulfeto adicionadas antes do experimento e encontradas na água e no sedimento após o experimento 2.



Fonte: autoria própria

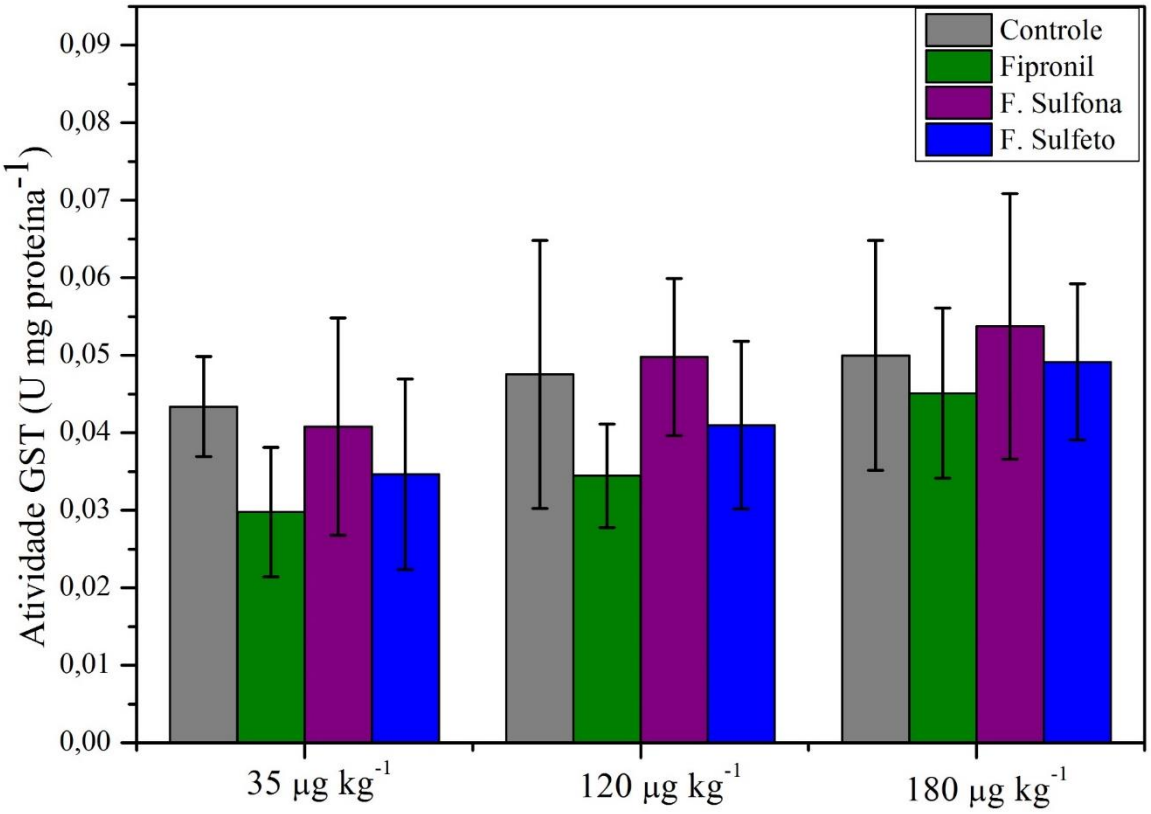
Com estes resultados é possível afirmar que, entre os analitos estudados, o fipronil sulfeto é o que possui maior lipofilicidade, e que o composto parental, o fipronil, é o menos lipofílico.

5.3 Avaliação do estresse oxidativo nos girinos

5.3.1 Glutationa S-Transferase

A GST é responsável pela catálise das reações de conjugação de compostos tóxicos a ligantes endógenos para que haja uma maior facilidade de excreção (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN,2003). Neste estudo, a atividade desta enzima não sofreu alterações significativas (P> 0,05) após a exposição dos girinos ao fipronil e seus dois metabólitos (**Figura 14**).

Figura 14 Gráfico da atividade enzimática da GST após a exposição dos girinos (*Eupemphix nattereri*) ao fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, sob três concentrações distintas, 35, 120 e 180 µg kg^{-1}.



Estudos com outros organismos expostos a agrotóxicos também não mostraram alterações significativas na atividade da GST. Peixes carpa-comum da família *Cyprinidae* foram expostos a uma formulação comercial do fipronil comercial, na concentração de 0,65 mg L^{-1} durante 7, 30 e 90 dias (CLASEN et al., 2012) e gastrópodos da espécie *Biophalaria glabrata* foram expostos a 5 mg L^{-1} do inseticida azinfos-metil em dois períodos de exposição (48 e 96 horas) (KRISTOFF; GUERRERO; COCHÓN, 2008) e em nenhum dos dois estudos a atividade da GST sofreu alterações após os tratamentos realizados.

O fato da atividade da GST não ter alterado demonstra um aumento no risco de estresse oxidativo, uma vez que a capacidade de biotransformação não aumentou. Ou, pode-se inferir que a falta de indução da GST nos girinos de *Eupemphix. nattereri* não esteja envolvida no metabolismo de biotransformação do fipronil e seus produtos de degradação.

No entanto, no estudo de Margarido e colaboradores (2013) com girinos de *Scinax fuscovarius* expostos a uma formulação comercial do fipronil, a atividade da GST foi inibida

.

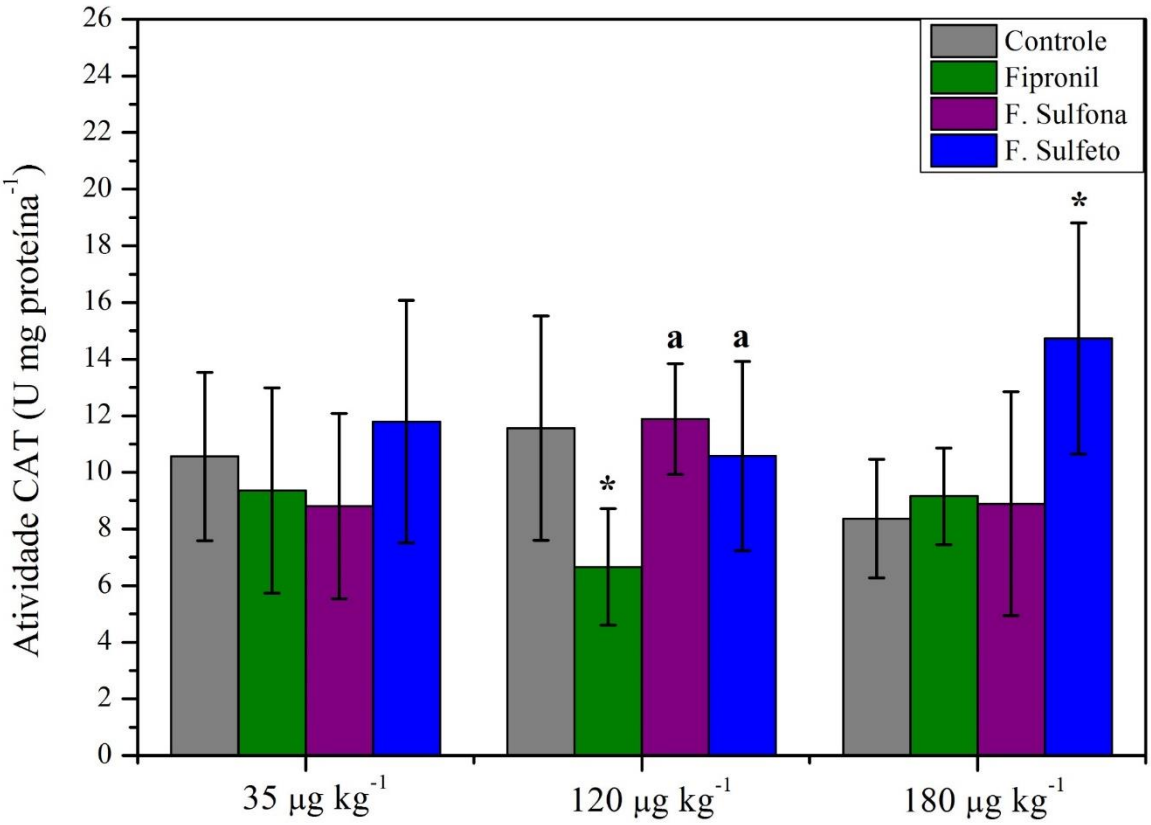
após os tratamentos realizados. Esta diferença nos resultados pode ser explicada pelo fato de os mecanismos de defesa dos organismos serem espécie-específicos (TREKELS et al, 2012), podendo-se assim dizer que o mecanismo de defesa antioxidante dos girinos de *Eupemphix nattereri* é diferente quando exposto ao fipronil se comparado com os girinos de *Scinax fuscovarius*. E, também, devido ao fato de que no estudo citado foi utilizada uma formulação comercial do fipronil, podendo este conter outros compostos que afetem a atividade da GST.

5.3.2 Catalase

A CAT é uma enzima antioxidante capaz de converter peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio, desempenhando assim um papel importante na regulação de espécies reativas de oxigênio presentes nas células dos organismos, e ela encontra-se ativa nos anfíbios anuros desde o desenvolvimento embrionário, sendo imprescindível na regulação dos níveis de ERO, juntamente com as enzimas glutationa peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD) (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; MARGARIDO; 2011; VALKO et al., 2006).

A atividade da CAT observada nos girinos expostos ao fipronil e seus produtos de degradação nas concentrações de estudo está demonstrada na **Figura 15.**

Figura 15 Gráfico da atividade enzimática da CAT após a exposição dos girinos (*Eupemphix nattereri*) ao fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, sob três concentrações distintas, 35, 120 e 180 µg kg^{-1}. ***** Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle. **a** Diferença estatisticamente significativa em relação ao fipronil, na mesma concentração.



Neste trabalho, a atividade da CAT diminuiu somente nos girinos expostos ao fipronil na concentração de 120 µg kg^{-1} em relação ao grupo controle (P=0,01) (**Figura 15**), podendo indicar um efeito inibitório do fipronil para esta enzima, o que poderia aumentar a suscetibilidade dos animais ao estresse oxidativo. Vários estudos com fígado de peixes de água doce também mostraram uma diminuição na atividade da CAT, depois de expostos a diferentes agrotóxicos, como deltametrina (SAYEED et al., 2003), endosulfano (BALLESTEROS; WUNDERLIN; BISTONI, 2009), clomazona e propanil (MORAES et al, 2009), e o próprio fipronil (CLASEN et al., 2012). Após exposição ao herbicida prometrina, também foi observado inibição da enzima CAT em lagostas de *Procambarus clarkii* (STARÁ; KOUBA; VELÍSEK, 2014).

Entretanto, para a concentração de 180 µg kg^{-1}, a exposição ao fipronil sulfeto fez com que a atividade da CAT aumentasse em relação ao grupo controle (P=0,03) (**Figura 15**).

Resultado similar foi mostrado no estudo de Carvalho e colaboradores (2013), o qual relatou um aumento na atividade da CAT em abelhas *Apis melífera* expostas a fipronil e spinosad. Em peixes de água doce *Brycon cephalus*, a exposição ao inseticida metilparation aumentou a atividade da CAT em todos os tecidos estudados (MONTEIRO et al., 2006). O aumento da atividade da CAT pode estar relacionado com o estresse oxidativo causado ao organismo ou então com o aumento da beta-oxidação dos ácidos graxos da célula, produzindo mais energia na forma de ATP ou então com o aumento da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual está diretamente relacionado à atividade da CAT.

Tem sido observado por diversos trabalhos que o aumento ou a inibição da atividade de enzimas antioxidantes não ocorre de maneira sistemática, há relatos tanto de aumento como de decréscimo, dependendo da intensidade e tempo de exposição. O aumento da concentração nem sempre induz a um aumento da atividade antioxidante (BALLESTEROS; WUNDERLIN; BISTONI, 2009; CHEUNG et al, 2001).

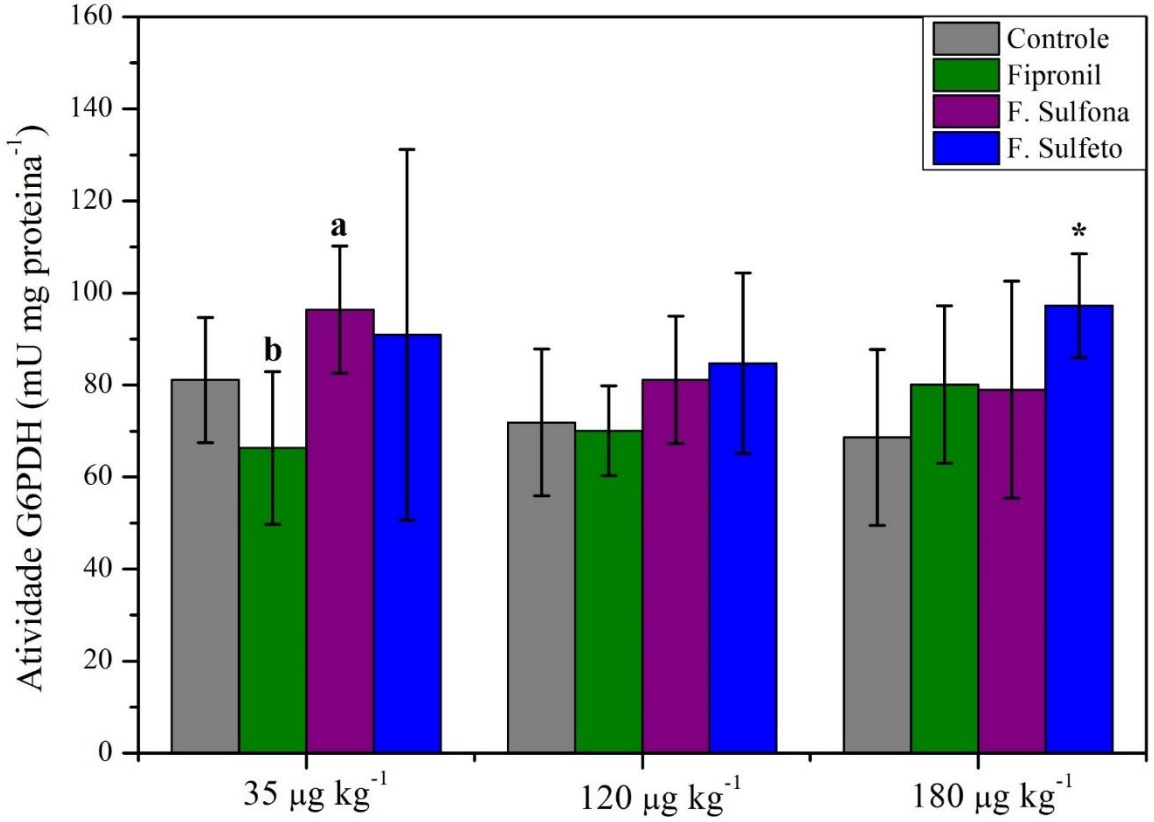
Para a menor concentração, não foram observadas mudanças significativas após a exposição dos girinos em nenhum dos analitos estudados.

5.3.3 Glicose 6-fosfato Desidrogenase

Neste trabalho, a atividade da G6PDH aumentou para os girinos expostos ao fipronil sulfeto na maior concentração de estudo (180,0 μg kg^{-1}) em relação ao controle (P=0,02) **(Figura 16)**, o que pode indicar um aumento da demanda de NADPH nos animais para as reações de biotransformação e/ou manutenção dos níveis de GSH. Os resultados encontrados para a atividade G6PDH após os tratamentos realizados neste trabalho estão demonstrados na **Figura 16.**

A G6PDH é a principal enzima que produz equivalentes redutores na forma de NADPH para reações de biossíntese, reações de biotransformação catalisadas pelo citocromo P450 e manutenção da reciclagem da GSH a partir de glutationa oxidada (GSSG), e devido a necessidade de todo o sistema antioxidante de NADPH, a G6PDH é fundamental para a proteção das células (AKHTAR et al, 2012; BUDAK et al, 2014; PANDOLFI et al., 1995).

Figura 16 Gráfico da atividade enzimática da G6PDH após a exposição dos girinos (*Eupemphix nattereri*) ao fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, sob três concentrações distintas, 35, 120 e 180 µg kg^{-1}. ***** Diferença significativa em relação ao respectivo controle. **a** Diferença significativa em relação ao fipronil, na mesma concentração. **b** Diferença significativa em relação ao fipronil sulfona, na mesma concentração.



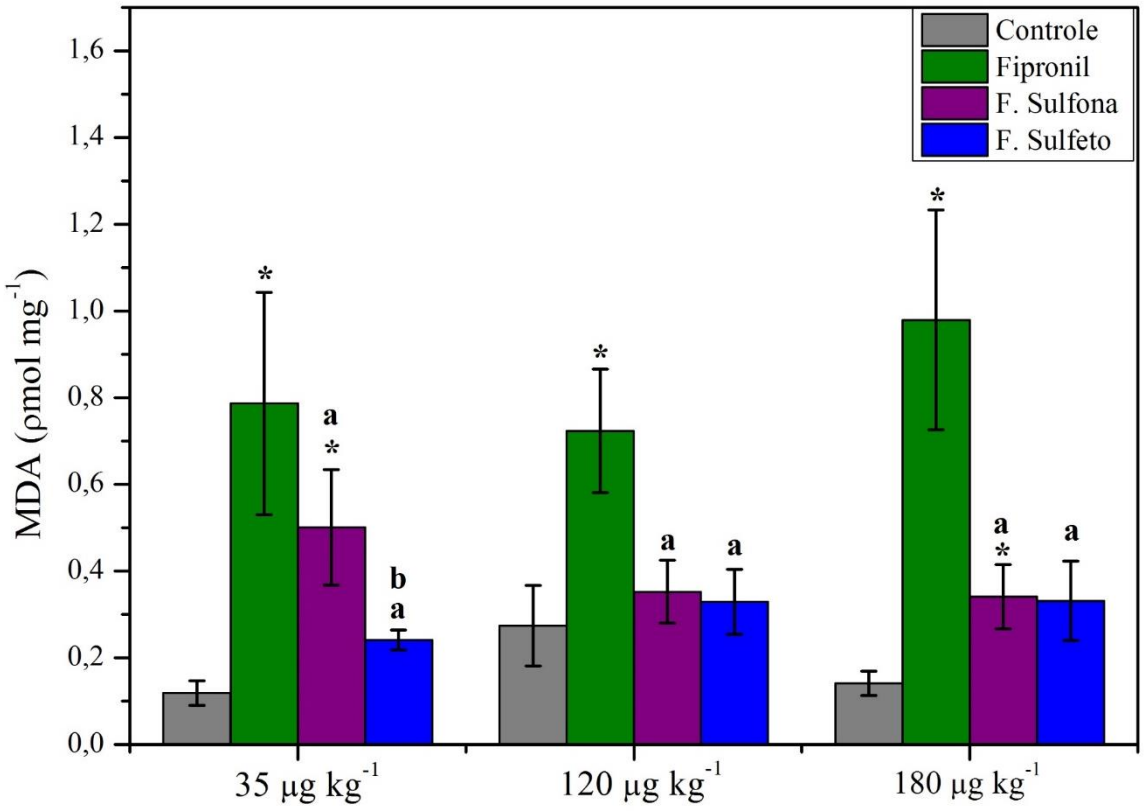
Fonte: autoria própria

Com o aumento da atividade da G6PDH, pode-se inferir que os níveis de GSSG aumentaram, pois é o parâmetro modulador da glutationa redutase (GR), e consequentemente da G6PDH, ou seja, aumentando o nível de GSSG, a atividade da G6PDH deve aumentar para suprir a produção de NADPH necessária para fornecer elétrons para a GR reduzir a GSSG a GSH, que é utilizada posteriormente pela GPx ou pela GST. Em contrapartida, no estudo de Margarido e colaboradores (2013), a atividade desta enzima não sofreu alterações, mostrando mais uma vez que os mecanismos de defesa antioxidantes são espécie-específicos, uma vez que no trabalho citado foram estudados girinos da espécie *Scinax fuscovarius* expostos ao Regent®800WG, formulação comercial do inseticida fipronil, que pode conter outros compostos.

5.4 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica pode ser considerada um dos principais efeitos negativos ocasionados pelo estresse oxidativo causado pelo excesso de ERO nas células dos organismos. O gráfico da concentração de MDA encontrado nos girinos expostos ao fipronil e seus metabólitos após o tratamento está demonstrado na **Figura 17.**

Figura 17 Gráfico do nível de (MDA), caracterizando a peroxidação lipídica ocorrida nos girinos (*Eupemphix nattereri*) após exposição ao fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil sulfeto, a três concentrações distintas, 35, 120 e 180 μg kg^{-1}. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle. **a** Diferença estatisticamente significativa em relação ao fipronil, na mesma concentração. **b** Diferença estatisticamente significativa em relação ao fipronil sulfona, na mesma concentração.



Fonte: autoria própria

O nível de peroxidação lipídica em girinos após a exposição ao fipronil aumentou nas três concentrações estudadas (P<0,001) Para os grupos expostos ao fipronil sulfona, a peroxidação lipídica aumentou para as concentrações de 35,0 e 180,0 μg kg^{-1} (P<0,001 e P=0,04, respectivamente). Na menor concentração, o nível de MDA nos girinos expostos ao fipronil sulfeto foram menores em relação aos expostos ao fipronil e ao fipronil sulfona. Já

nas outras duas concentrações, de 120,0 e 180,0 μg kg^{-1}, a diferença foi apenas em relação aos organismos expostos ao fipronil (**Figura 17**).

Vários trabalhos relatam aumento nos níveis de peroxidação lipídica em tecidos de diferentes organismos expostos a diferentes tipos de contaminantes. Por exemplo, houve aumento na peroxidação lipídica em girinos expostos a agrotóxicos tais como cipermetrina, atrazina, glifosato e quinclorac em todas as concentrações estudas e nos diferentes períodos de exposição (DAVID et al, 2012; DORNELLES; OLIVEIRA, 2014). Em tecidos de *Rana ridibunda* expostos ao inseticida fenthion nas concentrações de 10 e 20 mg L^{-1} durante quatro períodos distintos (24, 48, 72 e 96 horas) também foi possível observar aumento na lipoperoxidação em relação aos grupos controles respectivos (KANTER; CELIK, 2011). Estudos com moluscos expostos ao agrotóxico abamectin também relataram um aumento na peroxidação lipídica em animais submetidos à concentrações de pelo menos 9,6 μg L^{-1}. Em peixes, a exposição ao endosulfan provocou aumento nos níveis de MDA em tecidos como fígado e cérebro, mostrando o potencial que estes compostos químicos têm de provocar danos celulares relacionados à lipoperoxidação (BALLESTEROS; WUNDERLIN; BISTONI, 2009; MA et al, 2014).

.

6 Conclusões

Avaliando a resposta das enzimas antioxidantes estudadas, pode-se dizer que estas podem ser consideradas potenciais biomarcadores de contaminação em girinos. Isto porque ao longo da exposição ao fipronil e aos seus produtos de degradação, fipronil sulfona e fipronil sulfeto foi possível observar mudanças na atividade das enzimas CAT e G6PDH para pelo menos um dos analitos estudados em alguma das três concentrações. No entanto, com a avaliação de parâmetros complementares como outras enzimas de defesa antioxidante e outras enzimas da fase II do metabolismo de biotransformação, que não foram avaliados neste trabalho, pode-se obter respostas mais completas a respeito dos mecanismos de defesa dos girinos a estes compostos orgânicos.

Como houve aumento na peroxidação lipídica após a exposição dos girinos ao fipronil em todas as concentrações estudadas e ao fipronil sulfona nas concentrações mínima (35,0 μg kg^{-1}) e máxima (180,0 μg kg^{-1}) é possível dizer que o fipronil, nas concentrações encontradas no ambiente, é deletério para os organismos de estudo e sua degradação ao fipronil sulfona por oxidação não minimiza os danos causados às células destes organismos. No entanto, sua degradação ao fipronil sulfeto por redução pode diminuir a toxicidade do fipronil, visto que este subproduto não ocasionou peroxidação lipídica nos girinos expostos a este composto em nenhuma das concentrações estudadas.

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se dizer que o fipronil e seus metabólitos, no período de sete dias, não afeta a sobrevivência dos girinos de *Eupemphix nattereri* nas condições e tempo de estudo. Entretanto, apesar de não provocar mortalidade, as alterações metabólicas ocorridas indicam que a exposição às concentrações ambientalmente relevantes podem levar à diminuição do desempenho fisiológico dos animais a longo prazo, podendo assim provocar um prejuízo a nível populacional, sendo estas informações relevantes sobre a toxicidade do fipronil e seus produtos de degradação para girinos de anfíbios anuros.

Em relação à água e ao sedimento utilizados nos experimentos, o fipronil e seus metabólitos foram absorvidos preferencialmente pelo sedimento, provando assim serem compostos lipofílicos, porém, o fipronil se mostrou ser o menos lipofílico, apresentando no máximo 77% da concentração adicionada absorvida no sedimento, enquanto para os outros dois metabólitos, este valor está próximo a porcentagem mínima absorvida.

.

7 Referências bibliográficas

AAJOUD, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1347-1352, 2003

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, **NBR 9898: preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores**, Rio de Janeiro, Junho 1987.

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Ingrediente ativo: Fipronil.** Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 04 de ago. 2014.

AKHTAR, M.S. et al. Effects of dietary pyridoxine on growth and biochemical responses of *Labeo rohita* fingerlings exposed to endosulfan. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 23-30, 2012

ALMEIDA, E.A. et al. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 135c, p. 295-303, 2003

ALMEIDA, E.A. et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 5-6, p. 386-392, 2004

ALMEIDA, E.A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 318, p. 21-30, 2005

ANA – Agência Nacional de Águas. **Guia Nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos.** Brasília, 2011.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias de agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>. Acesso em: 29 de jul. 2014.

.

AQUINO, L. et al. *Eupemphix nattereri*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, version 2014.1. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 18 de jul. 2014.

ARAÚJO, L. et al Single drop microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of diflufenican, fipronil, and pretilachlor in water samples. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 10225-10233, 2013.

ATTADEMO, A.M. et al. Tissue-Specific variations of esterase activities in the tadpoles and adults of *Pseudis paradoxa* (Anura: Hylidae). **Water Air and Soil Pollution**, v. 224, p. 1902-1910, 2014

BACCHETTA, C. et al. Combined toxicological effects of pesticides: a fish multi-biomarker approach. **Ecological Indicators**, v. 36, p. 532-538, 2014.

BALLESTEROS, M.L.; WUNDERLIN, D.A.; BISTONI, M.A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia mutidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 199-205, 2009.

BARBARA, G.S. et al. Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of comparative physiology A-neuroethology sensory neural and behavioral physiology**. v. 191, p. 823-836, 2005.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARRETT, J.C. et al. 12TH Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals: susceptibility to environmental hazards. **Environmental Health Perspective**, v. 105, n. 4, p. 699–737, 1997.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: A manual of biochemical methods**. Grune & Stratton, New York, 342p, 1975

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179-194, 2003.

.

BOBÉ, A.; et al. Behaviour of fipronil in soil under sahelian plain field conditions. **Pesticide Science**, v. 52, p. 275 – 281, 1998

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, p. 248-254, 1976

BRONDI, S.H.G. et al. Evaluation of the QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry for the analysis pesticide residues in water and sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, n. 1, p. 18 – 22, 2011.

BUDAK, H. et al. Expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in oxidative stress induced by long-term iron toxicity in rat liver. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 217-223, 2014.

CAPPELINI, L.T.D. et al. e 2005. **Environmental Technology**, v. 33, n. 20, p. 2299-2304, 2012.

CARVALHO, S.M. et al. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 9, p. 2117-2124, 2013.

CASTRO, J.C.; PINTO, A.T. Qualidade da água em tanques de girinos de rã touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, cultivados em diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1903-1911, 2000.

CAVAS, L.; TARHAN, L. Glutathione redox system, GSH-Px activity and lipid peroxidation (LPO) levels in tadpoles of *R.ridibunda* and *B.viridis*. **Cell Biochemistry and Function**, v. 21, p. 75 – 79, 2002.

CHEUNG, C.C.C. et al. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**, v. 52, p. 189 – 203, 2001

CHEYNS, K. et al. Monod kinetics rather than a first-order degradation model explains atrazine fate in soil mini-columns: implications for pesticide fate modelling. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 1405 – 1411, 2010.

.

CLASEN, B. et al. 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.

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

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **RESOLUÇÃO CONAMA 357/2005**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/res_conama_357_05.pdf>. Acesso em 23 jul. 2014.

COTOU, E.; TSANGARIS, C.; HENRY, M. Comparative study of biochemical and immunological biomarkers in three marine bivalves exposed at a polluted site. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 20, p. 1812 – 1822, 2013.

DAMALAS, C.A. Understanding benefits and risks of pesticide use. **Science Research and Essay**, v. 4, n. 10, p. 945 – 949, 2009.

DAVID, M. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 127-134, 2012.

DE OLIVEIRA, F.M.; TAVARES, T.M.; BERETTA, M. Otimização de método analítica para determinação de PCBs por GC-MS-MS em amostras de biota. **Revista Analytica**, v. 14, p. 45-53, 2005.

DE TOFFOLI, A.L. **Fipronil e produtos de degradação: adaptação de método analítico e caracterização de amostras de água, solo e sedimento da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande**. 2014. 100f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, São Paulo, 2014.

DE ZWART, L.L et al. Simultaneous determination of eight lipid peroxidation degradation products in urine of rats treated with carbon tetrachloride using gas chromatography with electron-capture detection. **Journal of Chromatography B**, v. 694, p. 277-287, 1997.

.

DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. **The toxicology of fishes**. Taylor & Francis Group, Florida, 2008.

DOMÍNGUEZ, A.M. et al. Analysis of tomato matrix effect in pesticide residue quantification through QuEChERS and single quadrupole GC/MS. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 74, n. 2, p. 148-156, 2014.

DORNELLES, M.F.; OLIVEIRA, G.T. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 66, p. 415-429, 2014.

EDWARDS, C.A. The impact of pesticides on the environment. In: PIMENTEL, D.; LEMAN, H. **The pesticide question**, part 1, Springer Science & Business Media, p. 13-46, 1993.

EMBRAPA **Agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html> Acesso em: 04 out. 2014.

FOSSI, M.C.; LEONZIO, C. **Nondestructive biomarkers in vertebrates**. CRC Press, Florida, 1993.

GENG, B.R.; YAO, D.; XUE, Q.Q. Acute toxicity of the pesticide dichlorvos and the herbicide butachlor to tadpoles of four anuran species. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 74, p; 343-349, 2005.

GIBBONS, D.; MORRISSEY, C.; MINEAU, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 103 – 118, 2015.

GLOCK, G.E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal**, v. 55, p. 400-408, 1953.

GUNASEKARA, A.; TROUNG, T. **Environmental fate of fipronil**. Sacramento, USA, 2007.

GÜNGÖRDÜ, A. Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, v. 140-141, p. 220-228, 2013.

HAYES, T.B. et al. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 921-933, 2010.

HODGSON, E. **A textbook of modern toxicology**, 3rd ed. John Wiley & Sons, New Jersey, 2004.

JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**. v. 12, n. 4, p. 680 – 693, 2008.

JONES, L. et al. Antioxidant defense system in tadpoles of the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) exposed to paraquat. **Journal of Herpetology**, v. 44, n. 2, p. 222-228, 2010.

KANTER, A.; CELIK, I. Acute effects of fenthion on certain oxidative stress biomarkers in various tissues of frog (*Rana ridibunda*). **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, p. 369-376, 2011.

KANZARI, F. et al. Distributions and sources of persistent organic pollutants (aliphatic hydrocarbons, PAHs, PCBs and pesticides) in surface sediments of an industrialized urban river (Huveaune), France. **Science of the Total Environment**, v. 478, p. 141-151, 2014.

KATAGI, T. Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 182, p. 1 – 195, 2004.

KATAYAMA, A; MATSUMURA, F. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 1059 – 1065, 1993.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 251, p. 6183 - 6188, 1976.

.

KI, Y-W. et al. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. **Toxicology Letters**, v. 211, p. 18-28, 2012.

KIDD, H.; JAMES, D.R. **The Agrochemicals Handbook**. Royal Society of Chemistry, 3th ed. Cambridge, 1991.

KRISTOFF, G.; GUERRERO, N.R.V.; COCHÓN, A.C. Effects of azinphos-methyl exposure on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 1333-1339, 2008

LEITE, P.Z. et al. Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, p. 1411-1421, 2010

LENOIR, J.S. et al. Summertime transport of current-use pesticides from California's Central Valley to the Sierra Nevada mountain range, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 2715-2722, 1999.

LIGIERO,C.B.P. et al. Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1338-1341, 2009.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, p. 137-147, 2009.

LU, X. et al. Concentration levels and ecological risks of persistent organic pollutants in the surface sediments of Tianjin Coastal area, China. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

MA, J. et al. Biochemical responses to the toxicity of the biocide abamectin on the freshwater snail *Physa acuta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 31-35, 2014.

MAGGIONI, T. et al. Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquía River (Córdoba, Argentina). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, p. 337 – 353, 2012.

.

MANDAL, K; SINGH, B. Dissipation of fipronil granule formulation in sugarcane field soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 142 – 147, 2013.

MARCANTONIO, A.S. et al. Toxicidade do sulfato de zinco para girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*): toxicidade aguda, crônica e parâmetros hematológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n.2, p. 143-154, 2011.

MARGARIDO, T.C.S. **Biomarcadores bioquímicos de contaminação em girinos de anfíbios anuros expostos a Regent®800WG.** 2011. 54f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, São Paulo, 2011.

MARGARIDO, T.C.S. et al. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 61-67, 2013.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>. Acesso em: 27 mar. 2014

MELA, M. et al. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 13-21, 2013.

MÖHLER, H. et al. Specific $GABA_A$ circuits in brain development and theraphy. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 1685 – 1690, 2004.

MONFERRÁN, M.V. et al. Integrated survey of water pollution in the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). **Journal of Environmental Monitoring.** v. 13, p. 398 – 409, 2011.

MONTEIRO, D.A. et al. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 143, p. 141-149, 2006.

MORAES, B.S. et al. Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 57-62, 2009.

MORENO-GONZÁLEZ, R.; CAMPILLO, J.A.; LEÓN, V.M. Influence of an intensive agricultural drainage basin on the seasonal distribution of organic pollutants in seawater from a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). **Marine Pollution Bulletin**, v. 77, p. 400-411, 2013.

MUNARETTO, J.S. et al. Development of a multiresidue method for the determination of endocrine disrupters in fish fillet using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 116, p. 827-834, 2013.

MUNEER, M.; THEURICH, J.; BAHNEMANN, D. Formation of toxic intermediates upon the photocatalytic degradation of the pesticide diuron. **Research on Chemical Intermediates**, v. 25, n. 7, p. 667 – 683, 1999.

NARAHASHI, T. et al. Glutamate-activated chloride channel: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 2, p. 149 – 152, 2010.

PANDOLFI, P.P. et al. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. **The EMBO Journal**, v. 14, n. 21, p. 5209-5215, 1995.

PARAMASIVAM, M.; CHANDRASEKARAN, S. Determination of fipronil and its major metabolites in vegetables, fruit and soil using QuEChERS and gas chromatography-mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 93, n. 11, p. 1203 – 1211, 2013.

PEREIRA, G. et al. **Estudo preliminar do impacto do cultivo da cana-de-açúcar: alterações no albedo e liberação de energia radiativa através das queimadas**. In: Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Natal, Brasil, 25-30 abril 2009, INPE, p. 325-332.

PERET, A.M. et al. Dynamics of fipronil in Óleo Lagoon in Jataí Ecological Station, São Paulo – Brazil. **Chemosphere**, v. 78, n. 10, p 1225 – 1229, 2010.

.

PIASAROLO, L.; RIGITANO, R.L.O.; GUERREIRO, M.C. Influência da polaridade de agrotóxicos não-iônicos sobre sua sorção em um latossolo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1802-1809, 2008

QIN, N. et al. Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water from a large chinese lake based on multiple indicators. **Ecological Indicators**, v. 24, p. 599-608, 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **A Language and environment for statistical computing.** Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2010

RAMESH, A.; BALASUBRAMANIAN, M. Kinetics and hydrolysis of fenamiphos, fipronil, and trifluralin in aqueous buffer solutions. **Journal of Pesticide Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 3367-3371, 1999.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; MCCARTY, L.S. **Introduction to aquatic toxicology**. In: Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. 2nd ed. Taylor & Francis, Cap. 1, p. 3 – 70, New York, USA, 2003.

RANGEL, C.F. **Monitoramento de agrotóxicos em águas brutas e tratadas destinadas ao consume humano, utilizando método multi-resíduo por EFS/CG-EM**. 2008. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2008.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004

RIBEIRO, S.M.R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal of Biosciences**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROSSA-FERES, D.; JIM, J. Similaridade do sítio de vocalização em uma comunidade de anfíbios anuros na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 2, p. 439 – 454, 2001.

SABIN, G.P. **Desenvolvimento e validação de método utilizando SPE e GC-MS para a determinação multiresíduo de agrotóxicos em água potável**. 2007. 140f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

.

SANCHES, A.L.M. **Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax sp.*): testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidative, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação**. 2014. 79f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, São Paulo, 2014.

SAPOZHNIKOVA, Y. Evaluation of low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of 140 pesticides in fish. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3684-3689, 2014.

SAYEED, I. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 295-301, 2003.

SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia. **Brazilian amphibians – List of Species**. 2012. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br>. Acesso em: 07 abr. 2014

SICHILONGO, K.; BANDA, D. GC-MS determination of targeted pesticides in environmental samples from the Kafue Flats of Zambia. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 91, p. 510-516, 2013.

SILVA, M.R.; CAMPOS, A.C.E.; BOHM, F.Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **Revista Saúde e Biologia**, v. 8, n. 2, p. 46-58, 2013.

SILVA, J.M; SANTOS, J.R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 565-573, 2007.

SIMON-DELSO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 5 – 34, 2015.

STARÁ, A.; KOUBA, A.; VELÍSEK, J. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkia*). **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

STRELAU, J.R.M. **Estudo comparativo de métodos de extração para determinação de compostos orgânicos em lixiviados de aterros sanitários por cromatografia gasosa**

.

acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). 2006. 126f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

TAN, B.L.L.; MOHD, M.A. Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cord blood by gas chromatograph-mass spectrometer. **Talanta**, v. 61, p. 385-391, 2003.

TAVAKOLI, M.; HAJIMAHMOODI, M.; SHEMIRANI, F. Trace level monitoring of pesticides in water samples using fatty acid coated magnetic nanoparticles prior to GC-MS. **Analytical Methods**, v. 6, p. 2988-2997, 2014.

TINGLE, C.C. et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 176, p 1 – 66, 2003.

TOLEDO, L.F. et al. A revisão do Código Florestal Brasileiro: impactos negativos para a conservação de anfíbios. **Biota Neotrópica**, v. 10, n. 4, p. 35-38, 2010.

TOMLIN, C.D.S. **The pesticide manual: A world compendium**, The British Crop Protection Council Surrey, U.K., p. 413 – 415, 2000.

TREKELS, H. et al. Species-specific responsiveness of four enzymes to endosulfan and predation risk questions their usefulness as general biomarkers. **Ecotoxicology**, v. 21, o. 268 – 279, 2012.

UNICA. **União da Industria de Cana-de-Açúcar**. Disponível em: < http://www.unica.com.br >. Acesso em: 27 mar. 2014.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. **New pesticide fact sheet.** Washington, 1996.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. **Using amphibians in bioassessments of wetlands**. Washington, 2002.

USGS, United States Geological Survey. **Seasonal and spatial variability of nutrients and pesticides in streams of the Willamete basin, Oregon, 1993-95.** Portland, Oregon, 1998.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

.

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

VAN DER SLUIJS, J.P. et al. 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, p. 148-154, 2015.

VASCONCELOS, A.M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianos* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. 2014. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

VEIGA, M.M. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n.11, p. 2391-2399, 2006.

VÍLCHEZ, J.L. et al. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatograpy A**, v. 919, p. 215 – 221, 2001.

WALKER, C.H. et al. **Principles of ecotoxicology**. Taylor & Francis, Londres, 1996.

WARE, G.W. **The Pesticide Book**. 5th ed. Thomson Publications, p. 69. Fresno, CA, 2000

WOO, S. et al. Transcripts level responses in a marine medaka (*Oryzias javanicus*) exposed to organophosphorus pesticide. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 149, p. 427-432, 2009.

WU, M.; HU, J. Residue analysis of fosthiazate in cucumber and soil by QuEChERS and GC-MS. **Chemical Papers**, v. 68, n. 10, p. 1368-1374, 2014.

YANG, X-B.; YING, G-G.; KOOKANA, R.S. Rapid multiresidue determination for currently used pesticides in agricultural drainage waters and soils using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 45, p. 152-161, 2010.

.

YENISOY-KARAKAS, S.; GAGA, E.O.; Validations of one-step cleanup and separation method of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, and polycyclic aromatic hydrocarbons from atmospheric gas- and particle-phase samples. **Talanta**, v. 115, p. 150-158, 2013.

.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, _____/_____/____

_____
Assinatura