

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

RENATA SIQUEIRA DE MELLO

**COMPORTAMENTO MOTOR COMO UM BIOMARCADOR DE TOXICIDADE
INDUZIDA POR MANCOZEBE EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*
Hamilton-Buchanan, 1822)**

São Gabriel

2018

RENATA SIQUEIRA DE MELLO

**COMPORTAMENTO MOTOR COMO UM BIOMARCADOR DE TOXICIDADE
INDUZIDA POR MANCOZEBE EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*
Hamilton-Buchanan, 1822)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Jeferson Luis Franco

São Gabriel

2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pela autora através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

d278c de Mello, Renata Siqueira

Comportamento motor como um biomarcador de toxicidade induzida
por mancozebe em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio* Hamilton-
Buchanan, 1822).

45 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
Federal do Pampa, CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2018.

"Orientação: Jeferson Luis Franco".

1. Embriotoxicidade. 2. Ecotoxicologia. 3. Ditiocarbamatos. 4. Fungicida.
I. Título.

RENATA SIQUEIRA DE MELLO

**COMPORTAMENTO MOTOR COMO UM BIOMARCADOR DE TOXICIDADE
INDUZIDA POR MANCOZEBE EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*
Hamilton-Buchanan, 1822)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 5 de dezembro de 2018.

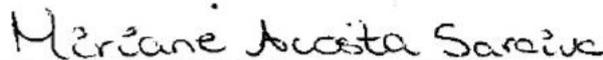
Banca examinadora:



Prof. Dr. Jeferson Luis Franco

Orientador

(Unipampa)



MSc. Miriane Acosta Saraiva

(Unipampa)



MSc. Mauro Eugênio Medina Nunes

(UFSM)

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos Caio e Caroline por tornarem os meus sonhos os seus próprios, por entenderem a minha ausência e por todo carinho, amizade e amor que compartilhamos desde sempre. Ao meu afilhado Arthur, por trazer mais amor pra nossa família, me ensinar outras maneiras de ver a vida e por me dar tanto orgulho da pessoa que se torna a cada dia. Ao meu pai Sergio, por sempre torcer para o meu bem e apoiar minhas decisões. E a minha mãe Marta, que um dia escreveu meu nome em seus agradecimentos e hoje tenho a oportunidade de escrever o dela, que sempre está presente nos meus pensamentos e coração em qualquer que seja a dimensão que agora pertence. Não existe um meio de descrever o quanto eu amo vocês. Obrigada por terem feito tudo isso possível.

As minhas amigas mais sinceras e antigas, que viveram tudo isso comigo mesmo de longe, sem jamais perder o nosso laço: Marina e Yasmin. A minha amiga e irmã de coração Jessica, por dividir uma casa e sua alegria comigo durante esses anos. As minhas meninas Amanda, Michele e Caroline, pela parceria, amizade e risadas compartilhadas nesse tempo, até mesmo em meio ao fim do mundo. Ao meu amigo Hudson, que sempre esteve perto para me arrancar um sorriso. E ao Lucas, por todo aprendizado e carinho compartilhados nesse tempo. Obrigada por serem minha segunda família. Eu sempre estarei aqui por vocês.

Aos meus companheiros de PET por todos os ensinamentos e parceria de grupo e aos professores Felipe Pinheiro e Márcia Spies, por acreditarem em mim mesmo quando eu não acreditava.

Ao professor Jeferson Franco, pelas oportunidades de crescer durante todo esse período e por me acolher como sua orientada. A todos os colegas do GPEOSCEL, que me auxiliaram não somente na realização desse trabalho, mas também na construção da pessoa e profissional que me tornei. Em especial, meus mais sinceros agradecimentos para Dennis, Luana e Mauro.

Aos demais professores da Unipampa, por todo aprendizado e por serem parte integrante da minha formação. E a Unipampa, por ser a porta de entrada para a realização dos meus sonhos.

“São as nossas escolhas que revelam o que realmente somos, muito mais do que as nossas qualidades.”

Alvo Dumbledore

RESUMO

O fungicida mancozebe, ao longo dos anos, tem sido utilizado em larga escala na proteção de monoculturas. O uso intensivo de pesticidas leva a contaminação de matrizes ambientais, como a água. Estudos anteriores demonstram que o mancozebe pode exercer efeitos pró-oxidantes através da formação de espécies reativas de oxigênio. Tendo em vista o fato de que organismos aquáticos são dependentes do equilíbrio redox para regular processos essenciais ao seu desenvolvimento, qualquer fator que altere esse equilíbrio pode resultar em prejuízos no desenvolvimento normal desses organismos. Dessa forma, o fungicida pode causar danos aos ecossistemas aquáticos que são particularmente vulneráveis à contaminação por pesticidas. Neste sentido, buscamos com este trabalho avaliar biomarcadores comportamentais e bioquímicos frente à exposição a concentrações ambientalmente relevantes de mancozebe durante o desenvolvimento embrionário de peixe-zebra. Embriões de 4 horas pós-fertilização (hpf) foram expostos a Mancozebe 96% nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/L, mantendo um grupo controle. A toxicidade do composto foi avaliada através de parâmetros comportamentais e bioquímicos em 24, 72 e 168 hpf. Os resultados obtidos demonstraram que o mancozebe alterou significativamente a taxa de eclosão, o movimento espontâneo dos embriões (24 hpf), inferiu dano a respostas motoras de escape e a capacidade natatória (72 hpf), afetou o comportamento exploratório das larvas (168 hpf) e foi responsável por um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio também em larvas (72 hpf). Dessa forma, o mancozebe, em baixas concentrações, foi capaz de alterar parâmetros comportamentais e causar um aumento de espécies reativas de oxigênio em peixe-zebra em desenvolvimento embrionário. Ressaltamos que os efeitos comportamentais induzidos por mancozebe ocorreram em tempos de exposição anteriores em comparação com as alterações bioquímicas, portanto, apontando para as análises comportamentais como ferramentas sensíveis à detecção precoce dos efeitos causados pela contaminação por produtos agrícolas, uma vez que se manifestam anteriormente aos parâmetros bioquímicos.

Palavras-chave: embriotoxicidade; ecotoxicologia; ditiocarbamatos; fungicida.

ABSTRACT

The mancozeb fungicide, over the years, has been used in a large scale in the protection of monocultures. The intensive use of pesticides leads to contamination of environmental matrices such as water. Previous studies have demonstrated that mancozeb can exert pro-oxidant effects through the formation of reactive oxygen species. In view of the fact that aquatic organisms are dependent on the redox equilibrium to regulate processes essential to their development, any factor that alters this balance may result in damage to the normal development of these organisms. In this way, the fungicide can cause damage to aquatic ecosystems that are particularly vulnerable to pesticide contamination. In this sense, we seek to evaluate behavioral and biochemical biomarkers against exposure to environmentally relevant concentrations of mancozeb during the embryonic development of zebrafish. Embryos of 4 hours post-fertilization (hpf) were exposed to Mancozebe 96% at concentrations of 5, 10 and 20 $\mu\text{g} / \text{L}$, maintaining a control group. The toxicity of the compound was evaluated by behavioral and biochemical parameters at 24, 72 and 168 hpf. The results showed that mancozeb significantly altered the hatching rate, the spontaneous movement of the embryos (24 hpf), inferred damage to escape motor responses and the swimming capacity (72 hpf), affected the exploratory behavior of the larvae (168 hpf) and was responsible for an increase in the generation of reactive oxygen species also in larvae (72 hpf). Thus, mancozeb, at low concentrations, was able to alter behavioral parameters and cause an increase of reactive oxygen species in zebrafish in embryonic development. We emphasize that the behavioral effects induced by mancozeb occurred at previous exposure times in comparison with biochemical alterations, thus pointing to behavioral analyzes as tools sensitive to the early detection of the effects caused by contamination by agricultural products, since they manifest themselves previously than biochemical parameters.

Keywords: embryotoxicity; ecotoxicology; dithiocarbamates; fungicide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Lixiviação e escoamento superficial.....	13
Figura 2 – Estrutura geral de um carbamato.....	14
Figura 3 – Estrutura geral de um ditiocarbamato.....	15
Figura 4 - Estrutura geral de Mancozebe.....	16
Figura 5 - Reação catalisada por Glutathione S-transferase.....	18
Figura 6 - Representação dos sistemas de defesa antioxidante enzimática.....	19
Figura 7 - O peixe-zebra adulto.....	20
Figura 8 - Fases do desenvolvimento embrio-larval de peixe-zebra.....	21
Figura 9 - A exposição ao MZ afeta a eclosão dos embriões.....	29
Figura 10 - Os parâmetros motores são alterados após exposição ao MZ.....	30
Figura 11 - Exposição ao MZ não induz alterações no estado redox e na atividade enzimática antioxidante de embriões.....	31
Figura 12 - Exposição ao MZ leva a um aumento do estado redox pró-oxidante em larvas.....	32
Figura 13 - O comportamento exploratório de larvas é alterado por MZ.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DTCs - Ditiocarbamatos

EBDC - Etilenobisditiocarbamatos

MZ - Mancozebe

Mn - Manganês

Zn - Zinco

ETU - Etilenotiouréia

EU - Etilenouréia

EBIS - Sulfeto de bisisotiocianato de etileno

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

GSH - Glutathiona

GST - Glutathiona S-transferase

SOD - Superóxido dismutase

GPx - Glutathiona Peroxidase

CAT - Catalase

hpf - Horas pós-fertilização

CTL - Controle

dpf - Dias pós-fertilização

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Agricultura e pesticidas.....	12
1.2 Carbamatos e Ditiocarbamatos.....	14
1.3 Mancozebe e toxicidade.....	16
1.4 Mecanismos de toxicidade via estresse oxidativo.....	17
1.5 Peixe-zebra como Modelo Experimental.....	20
2 JUSTIFICATIVA.....	23
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Animais adultos e embriões	25
4.2 Tratamento dos embriões.....	25
4.3 Viabilidade e taxa de eclosão.....	25
4.4 Análises motoras.....	26
4.4.1 Movimento Espontâneo.....	26
4.4.2 Estímulos sensoriais motores.....	26
4.4.3 Comportamento Exploratório.....	26
4.5 Análise de parâmetros bioquímicos.....	27
4.5.1 Preparação das amostras.....	27
4.5.2 Quantificação total de proteínas.....	27
4.5.3 Determinação da geração de EROs.....	27

4.5.4 Ensaio de Glutathiona S-transferase.....	27
4.5.5 Ensaio de Catalase.....	28
4.6 Análise Estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1 A exposição ao MZ comprometeu a eclosão do peixe-zebra.....	29
5.2 MZ em concentrações ambientais foi capaz de alterar parâmetros motores de embriões e larvas.....	29
5.3 MZ não alterou o estado redox e a atividade enzimática em 24 hpf.....	31
5.4 MZ causou um aumento do estado pró-oxidante em larvas de 72 hpf.....	32
5.5 A exposição ao MZ afetou o comportamento exploratório em 168 hpf.....	33
6 DISCUSSÃO.....	34
7 CONCLUSÃO.....	37
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agricultura e Pesticidas

O rápido crescimento do setor industrial, o aumento da população global e, conseqüentemente, maior demanda por exportação de alimentos, afetaram significativamente o mercado de produção agrícola brasileiro nos últimos anos (KNIIVILA, 2007). Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores agropecuários do mundo e o segundo país que mais exporta esses produtos, principalmente devido a extensa área de plantio do país, desempenhando uma função importante na economia (PIGNATI et al., 2017).

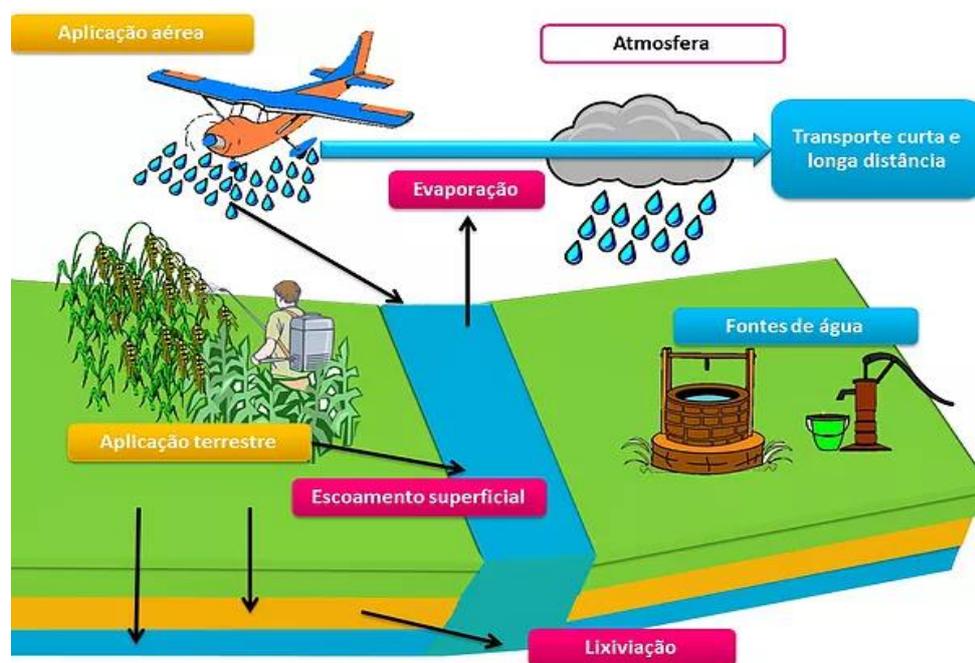
Para manter a produção, este setor utiliza intensivamente insumos químicos, como fertilizantes e agroquímicos (PIGNATI et al., 2017). Os agroquímicos ou pesticidas são produtos que englobam uma vasta gama de substâncias químicas, especificamente projetados para o controle de pragas, ervas daninhas ou doenças de plantas (BOLOGNESI, 2003; PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003). Sua aplicação ainda é a mais efetiva e aceita para a proteção das plantações e contribui significativamente para o aumento e rendimento da produção agrícola em larga escala (BOLOGNESI, 2003). Os pesticidas são classificados de acordo com o tipo de praga que controlam, a estrutura química das substâncias ativas e os efeitos que causam à saúde humana e ao meio ambiente (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

O mercado brasileiro de agroquímicos expandiu rapidamente na última década, em um ritmo de crescimento maior que o dobro do apresentado pelo mercado global, o que coloca o Brasil em primeiro lugar no ranking mundial de consumidores de desses produtos (RIGOTTO et al., 2014; PIGNATI et al., 2017). De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (2016), a venda de agroquímicos no Brasil no ano de 2016 foi três vezes maior em relação ao ano de 2000, quando considerada a quantidade, em toneladas, de ingrediente ativo comercializado.

Apesar dos bons resultados na produção devido ao uso de pesticidas na agricultura, seu uso é geralmente acompanhado de efeitos deletérios prolongados ao ambiente (ZACHARIA, 2011). Os pesticidas são contaminantes ambientais de alta toxicidade biológica capazes de prejudicar também as formas de vida que não são as suas espécies-alvo (ZACHARIA, 2011), principalmente devido a forma de

aplicação desses produtos que, por meio da pulverização nas extensas áreas de cultivo, atingem todas as matrizes ambientais (IBGE, 2015; PIGNATI et al., 2017). Estima-se que aproximadamente 90% da aplicação de pesticidas agrícolas nunca atinja seus organismos-alvo, o que resulta no acúmulo de seus resíduos e metabólitos no solo em níveis muito altos, de forma que se tornam persistentes, móveis e tóxicos, pois tendem a acumular-se no solo e na biota (ORTIZ-HÉRNANDEZ et al., 2011). Uma vez dispersos no ambiente, os pesticidas estão sujeitos a processos de transporte, como escoamento superficial e lixiviação (Figura 1), que são capazes de contaminar as águas (IBGE, 2015). O escoamento superficial favorece a contaminação das águas superficiais através do transporte do pesticida que permanece adsorvido às partículas do solo erodido. Já a lixiviação conduz as moléculas de pesticida para camadas profundas do solo, podendo atingir e, assim, contaminar as massas subterrâneas de água e, portanto, os seres vivos que as têm como habitat (PIGNATI et al., 2017; QUEIROZ et al., 2011).

Figura 1. Lixiviação e escoamento superficial. Através da aplicação aérea e terrestre, os pesticidas entram em contato com o solo, onde podem sofrer processos de escoamento superficial e lixiviação, contaminando os corpos d'água e interferindo no ciclo da água.



Fonte: goo.gl/LMwyoR.

Dessa forma, as propriedades físico-químicas dos agroquímicos, bem como a quantidade e a frequência de uso, métodos de aplicação, características bióticas e

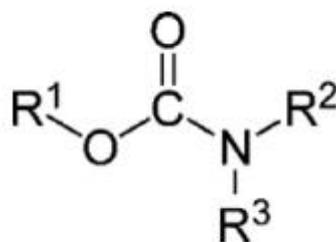
abióticas do ambiente e as condições meteorológicas, determinarão qual será o destino e permanência dos agrotóxicos no ambiente (BORSOI et al., 2014). Assim, torna-se importante a regulação de tais insumos no meio ambiente, principalmente no meio aquático. No Brasil, o controle de agrotóxicos permitidos no meio ambiente é normatizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). A resolução nº 430/CONAMA de 13 de maio de 2011 estabelece limites máximos de contaminantes potencialmente prejudiciais em águas doces, salinas e salobras dependendo de seu destino. Esses teores constituem-se em limites individuais para cada substância que não poderão conferir às águas a capacidade de causar efeitos letais ou alteração de comportamento, reprodução ou fisiologia da vida (BRASIL, 2011).

Apesar disso, a contaminação ambiental pelo acúmulo de agroquímicos pode ocasionar em consequências significativas para as comunidades de seres vivos que compõem o ecossistema até mesmo em concentrações ambientais (BORSOI et al., 2014; DEWER et al., 2016). Essa contaminação está diretamente associada ao contato direto das espécies não-alvo com as plantas, solo e água contaminados com os insumos agrícolas. Além disso, agravos à saúde da população também tem sido relacionados com a contaminação por pesticidas, principalmente após a exposição ocupacional de trabalhadores rurais (KHAN; DAMALAS, 2015; GANGEMI et al., 2016) e resíduos de pesticidas na alimentação (DU et al., 2017; LU et al., 2015).

1.2 Carbamatos e Ditiocarbamatos

Os carbamatos são compostos derivados do ácido carbâmico que foram introduzidos como pesticidas no início do ano de 1950 e, desde então, são amplamente utilizados no controle de pragas das plantações (Figura 2) (STRUGER et al., 2016; SORIANO et al., 2001). São considerados de alta eficácia, visto que são capazes de inibir de forma reversível a enzima acetilcolinesterase no sistema nervoso das suas espécies-alvo, de forma que tem amplo espectro de atividades biocidas, podendo atuar como inseticidas, fungicidas e herbicidas (SORIANO et al., 2001; DHOUIB et al., 2016; STRUGER et al., 2016).

Figura 2. Estrutura geral de um pesticida carbamato, onde R¹, R² e R³ podem ser diferentes tipos de cadeias laterais.

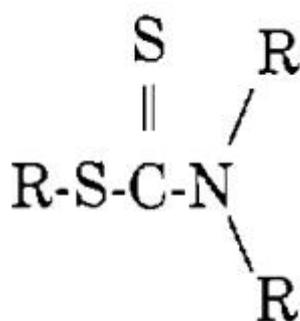


Fonte: DHOUIB et al., 2016.

Devido às suas propriedades específicas, como sua alta solubilidade em água e tendência à lixiviação (SORIANO et al., 2001), os pesticidas carbamatos mesmo quando aplicados corretamente acabam por ser encontrados no solo (JIN et al. 2013), nos alimentos (MOHAPATRA; LEKHA, 2016) e na água (STRUGER et al., 2016). Dessa forma, têm sido associados com processos de toxicidade nos sistemas biológicos de seres humanos e animais expostos às suas formas comerciais (DHOUIB et al., 2016; LEE et al., 2015). Apesar de serem relatados como pouco persistentes no ambiente, os efeitos a longo prazo dos carbamatos nos seres vivos são difíceis de avaliar devido à meia-vida relativamente curta e alta solubilidade da maioria dos compostos (SMITH, 1987).

Dentre às subclasses de carbamatos, os ditiocarbamatos (DTCs) (Figura 3) são caracterizados como compostos organossulfurados inicialmente introduzidos como fungicidas para aplicações comerciais (RATH et al., 2011). Os DTCs são derivados do ácido ditiocarbâmico e categorizados em quatro subclasses baseadas na natureza do elemento que forma um complexo com o seu esqueleto organossulfurado: os metilditiocarbamatos, como o sódio metano, os dimetilditiocarbamatos, como o ziram, ferbam, metam e o tiram, os propilenobisditiocarbamatos, como o propinebe, e os etilenobisditiocarbamatos (EBDC), caracterizados por sais orgânicos de manganês, zinco ou zinco e sódio, como manebe, zineb, nabam, metiram e mancozebe (ARCANJO, 2007; CARVALHO; BARBOSA, 2013; BALARDIN et al., 2017).

Figura 3. Estrutura básica de um ditiocarbamato, onde os grupos R são formados de diferentes íons metálicos.



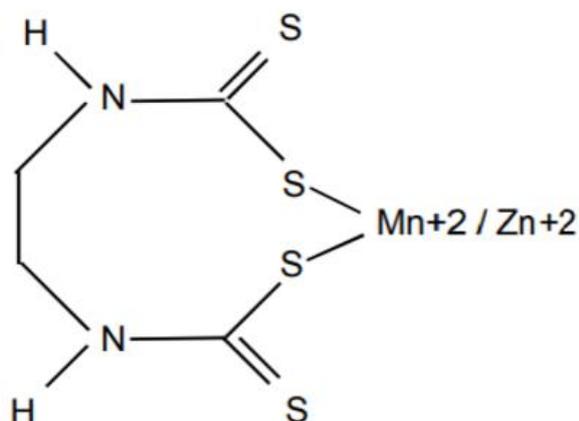
Fonte: SMITH, 1987.

1.3 Mancozebe e toxicidade

O mancozebe (MZ) (Figura 4) é um fungicida do tipo EBDC de manganês e zinco formado de uma mistura de 20% de manganês (Mn) e 2,5% de zinco (Zn) que age como um protetor multissítio, inibindo a germinação de esporos dos fungos que contaminam às plantações (CARVALHO; BARBOSA, 2013; GULLINO et al., 2010).

Introduzido em 1961, o MZ é considerado de acordo com a ANVISA como classe toxicológica III, ou seja, medianamente tóxico, sendo indicado no controle de doenças de hortaliças e frutíferas em geral, também atuando como acaricida (CARVALHO; BARBOSA, 2013). Quanto ao potencial de periculosidade ambiental, pertence à classe II conforme descrito pelo IBAMA, ou seja, é muito perigoso.

Figura 4. Fórmula estrutural do fungicida MZ, destacando para sua composição metálica de Mn e Zn.



Fonte: ARCANJO, 2007.

O MZ é hoje produzido por numerosos fabricantes em todo o mundo e comercializado em mais de 120 países com diferentes formulações (GULLINO et al.,

2010). Embora o uso de MZ em sua forma pura seja muito significativo, o seu ingrediente ativo tem sido aplicado em co-formulações com outros ingredientes ativos, geralmente junto a um fungicida sítio-específico sistêmico (GULLINO et al., 2010; BALARDIN et al., 2017). Dessa forma, atualmente, MZ é o 3º ingrediente ativo mais vendido no Brasil, com mais de 33 mil toneladas vendidas no ano de 2016, segundo dados do IBAMA (2016), sendo considerado como uma ferramenta para ampliar o espectro e resistência do produto final de pesticidas (GULLINO et al., 2010).

MZ tem características similares com os demais EBDCs quando comparado a sua degradação. De acordo com Xu (2000), o MZ possui uma meia-vida de 2 dias em solos aeróbicos e 8 dias em solos anaeróbicos. Porém, na água, o composto é rapidamente hidrolisado e degradado em seus subprodutos, como etilenotiouréia (ETU), etilenouréia (EU), sulfeto de bisotiocianato de etileno (EBIS), Mn e Zn, apresentando meia-vida de 2 dias dependendo do pH. Esses metabólitos são caracterizados por apresentarem uma elevada mobilidade no solo, atingindo facilmente o lençol freático (ARCANJO, 2007).

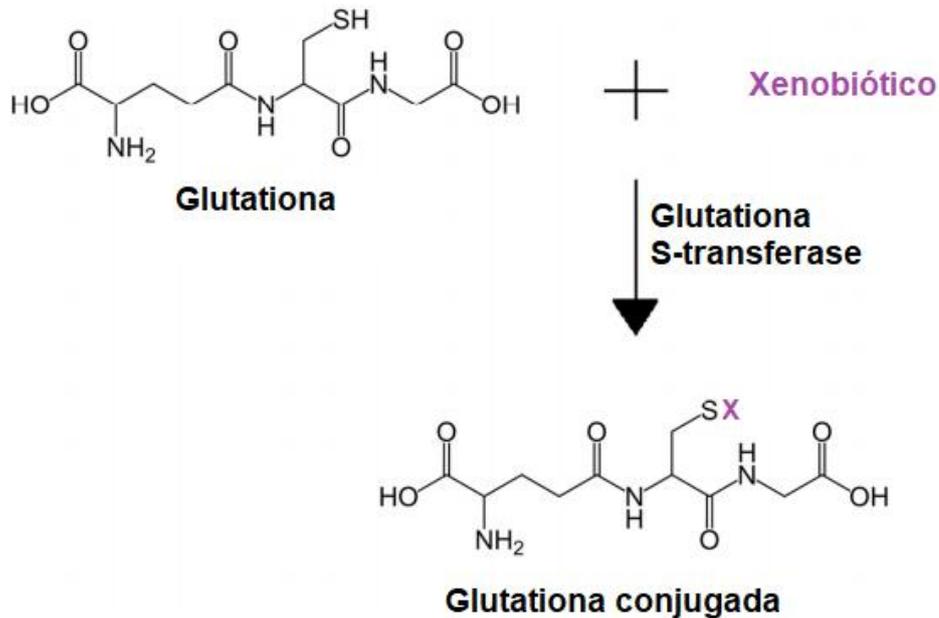
Os produtos de degradação de MZ, como Mn, já foram relatados como presentes em corpos d'água considerados próprios para consumo humano próximos a áreas de intensa atividade agrícola em diferentes países (VAN WENDEL DE JOODE et al., 2016a; FLORES-GARCÍA, 2011). No Brasil, o fungicida MZ é permitido na água potável na concentração de 180 µg/L, sendo 1800 vezes maior do que aquela permitida em países da União Europeia (BOMBARDI, 2017), destacando a importância do estudo da capacidade tóxica desse pesticida no ecossistema. O MZ já foi relatado por sua capacidade de ocasionar distúrbios em seres vivos, como carcinogenicidade em ratos (BELPOGGI et al., 2002), prejuízo no comportamento reprodutivo em aves (PANDEY; TSUTSUI; MOHANTY, 2017), degeneração neural em nematoides (BRODY et al., 2013), alterações no desenvolvimento neural de crianças (VAN WENDEL DE JOODE et al., 2016b), entre outros. Apesar do mecanismo de ação dos EBDCs não estar claro, a toxicidade induzida de MZ é relacionada com o desequilíbrio da homeostase redox do organismo, culminando em estresse oxidativo (COSTA-SILVA et al., 2018b; ATAMANIUK et al., 2013; YAHIA et al., 2014).

1.4 Mecanismos de Toxicidade via Estresse Oxidativo

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, como enzimas e moléculas não enzimáticas, é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (FERREIRA; ABREU, 2007). A utilização de oxigênio (O_2) molecular para geração de energia através da cadeia respiratória é capaz de produzir espécies químicas altamente reativas que podem provocar danos ao metabolismo celular, chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o anião radical superóxido ($O_2 \bullet -$), o radical hidroxila ($HO \bullet$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MORAES; SAMPAIO, 2010). Quando o organismo tende para a exacerbada produção de EROs, dizemos que encontra-se em estresse oxidativo, de modo que as EROs podem oxidar e danificar lipídios, proteínas e DNA, inibindo a sua função normal (FERREIRA; ABREU, 2007).

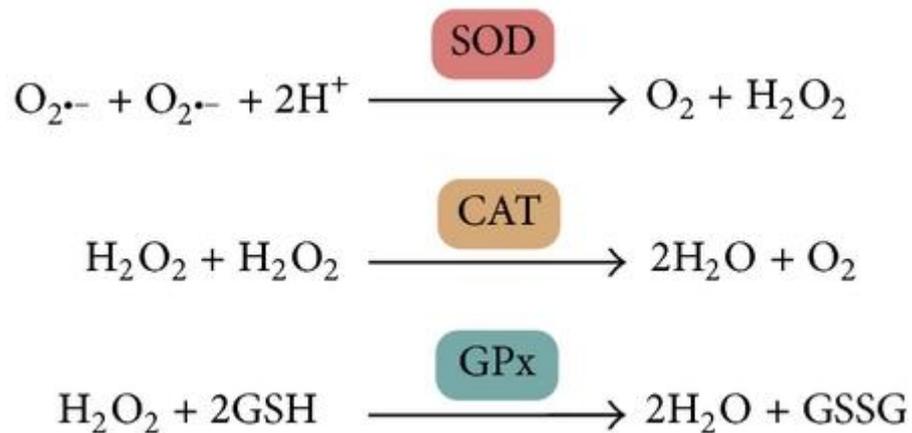
Contudo, defesas antioxidantes foram desenvolvidas pelo organismo com a finalidade de neutralizar e detoxificar as EROs, dentre estes, a principal é o sistema antioxidante que inclui a glutatona (GSH) e enzimas antioxidantes como a glutatona S-transferase (GST) (DAVIES, 2001). A GSH é uma molécula composta pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina que possui funções importantes de proteção celular no organismo, visto que age como uma molécula antioxidante e auxilia na manutenção do estado redox, atuando como um quelante de EROs de forma direta ou como cofator de enzimas antioxidantes (HANSEN; HARRIS, 2015; FERREIRA; ABREU, 2007). Dessa forma, enzimas como a GST atuam na desintoxicação do organismo através da conjugação da GSH com EROs, tornando-as mais solúveis em água e fáceis de serem excretadas (Figura 5) (HANSEN; HARRIS, 2015). Outras famílias de enzimas antioxidantes também atuam na defesa do organismo. As superóxido dismutases (SOD) catalisam a reação de dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio, que é tóxico e deve ser removido através das glutatona peroxidases (GPx) e das catalases (CAT), que catalisam a dismutação de H_2O_2 , reduzindo-o a água e glutatona oxidada (GSSH) e água e oxigênio, respectivamente (Figura 6) (DAVIES, 2001).

Figura 5: Reação catalisada por GST. A GST catalisa a formação de uma ligação tioéster entre a GSH reduzida e o xenobiótico, formando um conjugado e tornando-o mais excretável.



Fonte: Adaptado de KHALIL et al., 2017.

Figura 6. Representação dos sistemas de defesa antioxidante enzimática e suas reações na eliminação de EROs. A SOD catalisa a reação de dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , que é neutralizado pela CAT e GPx através da sua redução em água e GSSH e água e oxigênio, respectivamente.



Fonte: Adaptado de PENG et al., 2014.

Poluentes químicos como os pesticidas são compostos pró-oxidantes que podem se tornar um problema nos sistemas biológicos. O ambiente aquático recebe diariamente grandes quantidades de contaminantes ambientais que têm o potencial de causar estresse oxidativo em organismos aquáticos através de mecanismos de radicais livres e EROs (VALAVANIDIS et al., 2006). Desse modo, organismos aquáticos podem fornecer sistemas modelo eficientes para a investigação da geração de EROs no organismo, visto que são mais sensíveis à exposição e à

toxicidade em comparação com organismos terrestres e permitem a avaliação dos efeitos sutis desencadeados pelo estresse oxidativo (VALAVANIDIS et al., 2006).

1.5 Peixe-zebra como Modelo Experimental

O peixe-zebra (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822) é um peixe de água doce tropical nativo do sudeste da Ásia (Figura 7), com um curto período de geração (2 à 3 meses), pequeno tamanho (3 à 4 cm) e baixo custo (ROPER; TANGUAY, 2018; PARNG et al., 2002). Suas fêmeas são capazes de depositar várias centenas de ovos por reprodução, com fertilização externa, desenvolvimento extrauterino e embriões transparentes, permitindo a visualização durante a embriogênese (PARNG et al., 2002; HAENDEL et al., 2004).

Figura 7. O peixe-zebra adulto, caracterizado pelo seu dimorfismo sexual. Na figura, uma fêmea (A) e um macho (B).



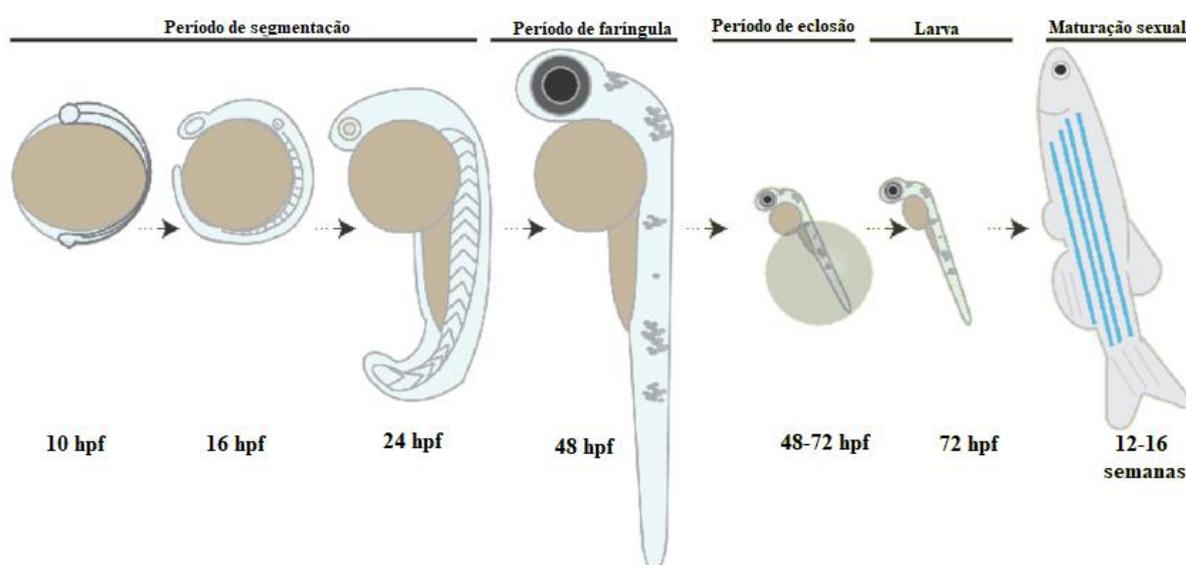
Fonte: <https://bit.ly/2EkjewQ>

Dessa forma, o peixe-zebra tem se destacado como modelo em estudos de drogas, compostos químicos e contaminantes ambientais (PARNG et al., 2002; HILL et al., 2005; HAENDEL et al., 2004) principalmente frente ao seu período embrionário, visto que permite observar o seu desenvolvimento desde as primeiras horas pós-fertilização (hpf) (Figura 8). Organismos em desenvolvimento compreendem um dos grupos mais vulneráveis às conseqüências da exposição a

substâncias tóxicas, já que são suscetíveis a alteração de parâmetros fundamentais, como parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais, nas fases iniciais da vida (RICHENDRFER; CRETON; COLWILL, 2014).

De acordo com a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD (2013), que regulamenta testes toxicológicos em embriões, as exposições a químicos devem ocorrer nas primeiras hpf, nas quais há uma intensa e rápida divisão celular (DENNERY, 2007). Como relata Kimmel (1995), nas primeiras 5 hpf, ocorrem os períodos de clivagem e blástula, nos quais há intensa divisão e repetição de até 9 ciclos celulares completos. No período de gástrula, em 5 hpf, começam os movimentos de extensão do epiblasto, hipoblasto e eixo embrionário. Às 10 hpf, aparecem os somitos, os órgãos primários, a cauda e os primeiros movimentos começam a ser feitos, nesse período conhecido como segmentação. Em 24 hpf, chamado período de faríngula, o eixo do corpo se forma em torno do saco vitelino, a circulação e a pigmentação começam a se desenvolver. No período de eclosão, em 48 hpf, a morfogênese de sistemas de órgãos primários termina, cartilagem é desenvolvida e a eclosão começa a ocorrer de forma desregulada. Com 72 hpf, chamado período de larva jovem, as larvas já são capazes de nadar, procurar alimento e ter comportamentos de proteção.

Figura 8. Representação de algumas fases do desenvolvimento embrio-larval de peixe-zebra até a fase adulta, conforme descritas no texto.



Fonte: Adaptado de ECKHARDT, 2011.

Cada fase do desenvolvimento inicial do peixe-zebra pode ser avaliado através dos chamados parâmetros chaves (do inglês, “*endpoints*”), ou seja, diferentes parâmetros de interesse toxicológico essenciais no entendimento do mecanismo de toxicidade do composto testado relacionados a sua morfologia e fisiologia, como má formações na notocorda, alterações no batimento cardíaco, maior número de movimentos do embrião, comportamento locomotor, entre outros (OECD, 2013; XIA; ZHENG; ZHOU, 2017).

Dentre os parâmetros chaves de análise em peixe-zebra, o comportamento tem se destacado em estudos da toxicidade de diferentes compostos (BRIDI et al., 2017; MITCHELL; MOON, 2016), visto que resulta da integração de condições às quais os organismos estão expostos e apresenta um efeito acumulativo agudo (HELLOU, 2010). Além disso, é uma ferramenta precisa para avaliação de efeitos ecológicos, visto que apresenta maior sensibilidade quando comparada a parâmetros como morfologia e mortalidade, principalmente nas fases iniciais da vida (SLOMAN; MCNEIL, 2012).

Durante os períodos de desenvolvimento inicial, o equilíbrio redox tem influência sob os processos celulares de proliferação, diferenciação e sinalização celular, nos quais as EROs desempenham um papel significativo (DENNERY, 2007). Embora sejam essenciais ao desenvolvimento embrionário, um aumento anormal na produção dessas moléculas pode causar um desequilíbrio da homeostase, culminando em danos oxidativos a biomoléculas essenciais para o funcionamento normal do organismo (FERREIRA; ABREU, 2007). Assim, o estudo de compostos que podem desencadear danos permanentes se torna relevante.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o uso exacerbado de pesticidas na agricultura, ocasionando a contaminação de matrizes ambientais, torna-se importante a avaliação da qualidade ambiental de ecossistemas potencialmente poluídos. Buscando a proteção da vida aquática, principalmente em suas fases de desenvolvimento, visto que são mais suscetíveis aos efeitos de xenobióticos, faz-se necessário buscar ferramentas sensíveis para detectar de forma precoce os potenciais riscos ambientais relacionados ao uso indiscriminado de contaminantes, como os pesticidas, nos ecossistemas aquáticos. Além disso, estudos relacionados ao efeito do fungicida mancozebe em organismos aquáticos ainda são escassos, principalmente relacionados à sua toxicidade induzida por concentrações subletais e de relevância ambiental, as quais, ainda não são conhecidas no modelo experimental peixe-zebra.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial efeito tóxico do fungicida MZ em concentrações subletais e de relevância ambiental sob parâmetros locomotores e bioquímicos durante o desenvolvimento embrio-larval de peixe-zebra.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de sobrevivência de embriões de peixe-zebra expostos a diferentes concentrações subletais de MZ;
- Avaliar a taxa de eclosão de larvas de peixe-zebra expostas a diferentes concentrações de MZ;
- Avaliar os efeitos do MZ em diferentes concentrações sobre parâmetros locomotores durante o desenvolvimento embrionário de peixe-zebra;
- Avaliar os efeitos da exposição ao MZ em diferentes concentrações sobre parâmetros bioquímicos pró e antioxidantes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais adultos e embriões

Espécimes adultas de peixe-zebra (*Danio rerio*) de linhagem selvagem foram mantidos sob condições adequadas em sistema de recirculação Zebtec™ em água de osmose reversa, pH 7,2, condutividade 400 µS, temperatura 28°C, fotoperíodo de 14 horas claro e 10 horas escuro. Sua dieta consiste em ração comercial flocada e alimento vivo (*Artemia salina* e microvermes) suplementadas quatro vezes ao dia, de acordo com protocolo previamente estabelecido (WESTERFIELD, 2000). Os embriões de peixe-zebra utilizados no presente trabalho foram obtidos a partir da reprodução de espécimes adultos e mantidos em incubadora BOD a 28°C. A criação e manutenção de peixe-zebra em biotério foi aprovada e regulamentada pelo CEUA - Unipampa (protocolo 003/2016).

4.2 Tratamento dos embriões

O método de exposição foi realizado baseado no protocolo OECD 236 (2013) com adaptações, de modo que embriões de 4 hpf foram expostos a Mancozebe 96% (Sigma-Aldrich) nas concentrações subletais e de relevância ecológica (BOMBARDI, 2017) de 5, 10 e 20 µg/L em placas de Petri, mantendo um grupo controle (CTL) no qual foi exposto apenas a água do sistema (Zebtec™). As diluições de MZ foram preparadas em água do sistema e os tratamentos (MZ e CTL) foram mantidos em incubadora BOD durante diferentes períodos de tempo (24, 72 e 168 horas), sem troca de solução.

4.3 Viabilidade e taxa de eclosão

A viabilidade dos embriões foi avaliada após 24 hpf através do estereomicroscópio Carl Zeiss Stemi 2000C, considerando não viável quando observada a coagulação dos embriões e ausência de batimento cardíaco. A taxa de eclosão foi avaliada após 72 hpf, considerando eclodidas as larvas que foram

capazes de sair do córion. Ambos de acordo com protocolo previamente estabelecido (OECD, 2013).

4.4 Análises motoras

4.4.1 Movimento Espontâneo

Foram contabilizados o número de movimentos totais do eixo corporal realizados pelos embriões dentro do córion (SAINT-AMANT; DRAPEAU, 1998), de modo que embriões com 24-28 hpf foram aclimatados durante 2 minutos em placas de Petri contendo água do sistema e, depois, seus movimentos espontâneos foram contabilizados durante 1 minuto através do estereomicroscópio Carl Zeiss Stemi 2000C acoplado a uma câmera digital Moticam 2000, de acordo com protocolo previamente estabelecido (XIA; ZHENG; ZHOU, 2017).

4.4.2 Estímulos sensoriais motores

Larvas de 72 hpf foram submetidas ao teste comportamental de resposta ao toque (SAINT-AMANT; DRAPEAU, 1998), de modo que foi depositada uma larva de cada vez no centro de uma placa de Petri contendo 20 mL de água do sistema e, após o estímulo sensorial por toque com auxílio de uma pinça entomológica, foi contabilizado o número de estímulos necessários até que a larva chegasse a periferia da placa, assim como a capacidade do indivíduo de realizar um escape padrão, ou seja, ter uma resposta motora de natação.

4.4.3 Comportamento Exploratório

Larvas de 168 hpf dos grupos CTL e MZ 20 µg/L foram colocadas individualmente em uma placa de cultura celular de 24 poços contendo 2 mL de água por poço e a distância total percorrida e os episódios de imobilidade de cada animal foram avaliados. As sessões foram filmadas e registradas por seis minutos para posterior análise através do software ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA) de acordo com protocolos já estabelecidos (ALTENHOFEN et al., 2017b).

4.5 Análise de parâmetros bioquímicos

4.5.1 Preparação das amostras

Para as análises bioquímicas foram homogeneizados 30 animais inteiros por tratamento realizado após 24 e 72 hpf em 200 µL de tampão HEPES 20 mM, pH 7,0 no homogeneizador *powerlyzer* durante 30 segundos a 2000 rpm. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 4 ° C e 20000 g e o sobrenadante armazenado para análises posteriores.

4.5.2 Quantificação Total de Proteínas

O teor de proteína total foi determinado utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, de acordo com Bradford (1976).

4.5.3 Determinação do estado estável redox

A quantificação da oxidação de diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (H₂DCF-DA) como um índice geral para determinação do estado redox pró ou antioxidante foi realizada de acordo com procedimentos previamente estabelecidos (PÉREZ-SEVERIANO et al., 2004). Para esse ensaio, os embriões de 24 hpf foram retirados do córion através da sua imersão em pronase 10 mg/mL por 10 minutos. Após a preparação das amostras, os animais de 24 e 72 hpf foram monitorados quanto a sua emissão de fluorescência resultante da oxidação de H₂DCF-DA em intervalos regulares a um comprimento de onda de excitação/emissão de 485/530 nm através de um leitor de microplacas (PerkinElmerEnspire 2300).

4.5.4 Ensaio de Glutathiona S-transferase

A avaliação da atividade da enzima GST foi baseada no método descrito por Habig e Jakoby (1981). Após a preparação das amostras em 24 e 72 hpf, foi adicionado ao sobrenadante um mix de tampão fosfato, constituído por EDTA

0,0025 M, K_2HPO_4 0,25 M, KH_2PO_4 0,25 M, pH 7,0 e GSH 100 mM. A reação tem início após a adição de 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB) e a atividade da enzima é avaliada através da conjugação do grupamento tiol da GSH com o CDNB durante 2 minutos pelo espectrofotômetro Agilent Cary 60 UV / VIS à 340 nm.

4.5.5 Ensaio de Catalase

A atividade da enzima CAT foi realizada através da análise de depuração de H_2O_2 no meio de reação contendo tampão fosfato 0,05 M à pH 7,0, EDTA 0,5 mM, H_2O_2 10 mM, TRITON X100 a 0,012%, pH 7,0 de acordo com o procedimento de Aebi (1984). A atividade CAT é avaliada através do espectrofotômetro Agilent Cary 60 UV / VIS à 240 nm. Uma unidade de atividade CAT é definida como a quantidade de enzima degradando 1,0 μ mol de H_2O_2 por min nas condições do ensaio.

4.6 Análise Estatística

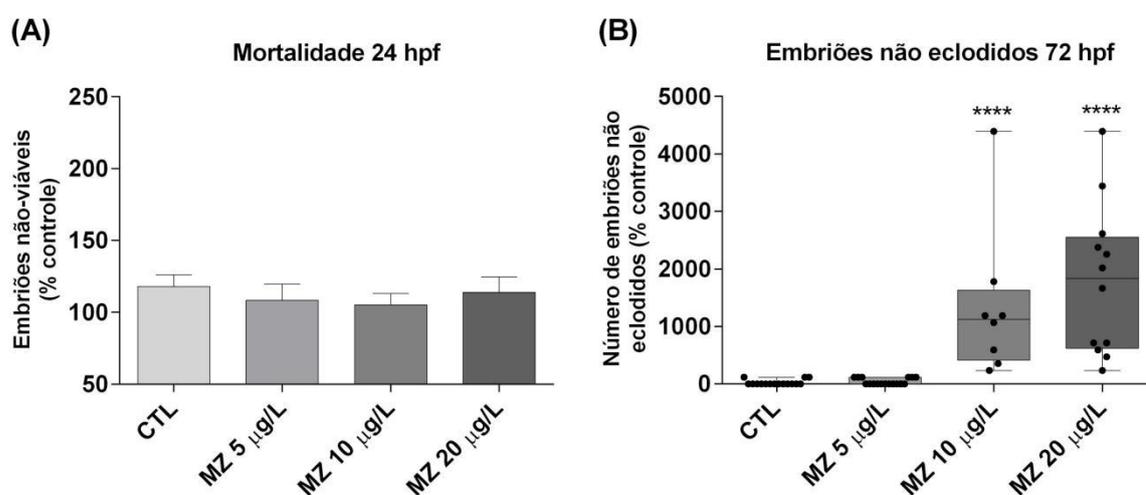
Para análise estatística dos dados, foram aplicados testes de normalidade e homogeneidade. Os resultados foram expressos em porcentagem pelo controle como média \pm erro padrão (S.E.M.). Para os dados não paramétricos, a análise foi feita através do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn ou através do teste de Kolmogorov Smirnov. Para os dados paramétricos, a análise foi feita através de one-way ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey ou através do teste t não pareado. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes com $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 A exposição ao MZ comprometeu a eclosão do peixe-zebra

Em relação a mortalidade dos embriões, o grupo MZ não diferiu em relação ao grupo controle (Figura 9A), sugerindo que as concentrações utilizadas não comprometem a sobrevivência desses embriões e são, portanto, subletais. Porém, a taxa de eclosão se mostrou estatisticamente diferente (Figura 9B), visto que nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/L}$ o número de embriões não eclodidos foi maior em comparação ao grupo controle ao final de 72 hpf.

Figura 9. Mortalidade e eclosão de embriões expostos a diferentes concentrações de MZ. (A) Número de embriões mortos após 24 hpf; (B) Número de embriões não eclodidos após 72 hpf. Os resultados foram expressos em porcentagem do CTL com média \pm SEM, sendo * $p < 0,05$.



Fonte: da autora, 2018.

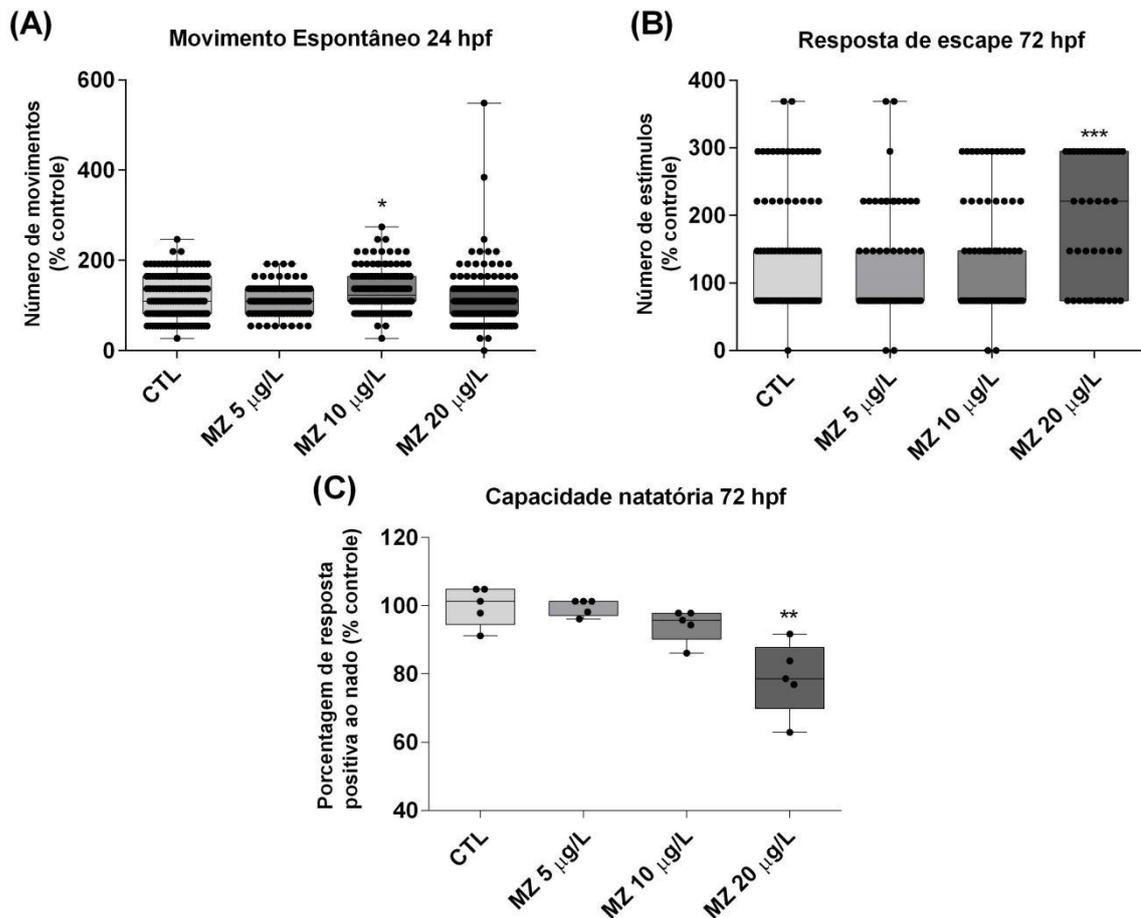
5.2 MZ em concentrações ambientais foi capaz de alterar parâmetros motores de embriões e larvas

Em relação às análises motoras comportamentais, a exposição ao MZ resultou em um aumento significativo no número de movimentos espontâneos dos

embriões com 24 hpf na concentração de 10 $\mu\text{g/L}$ em comparação ao CTL (Figura 10A).

Através de estímulos sensoriais, pode-se observar que larvas de 72 hpf expostas a concentração de 20 $\mu\text{g/L}$ necessitaram de um maior número de estímulos para apresentar uma resposta de escape (Figura 10B), bem como demonstraram estar com sua capacidade natatória prejudicada (Figura 10C).

Figura 10. Análises motoras em peixe-zebra sob diferentes concentrações de MZ. (A) Número de movimentos espontâneos por minuto em 24 hpf; (B) Número de estímulos motores de resposta de escape em 72 hpf; (C) Porcentagem de resposta positiva ao nado em 72 hpf. Os resultados foram expressos em porcentagem do CTL com média \pm SEM, sendo * $p < 0,05$.

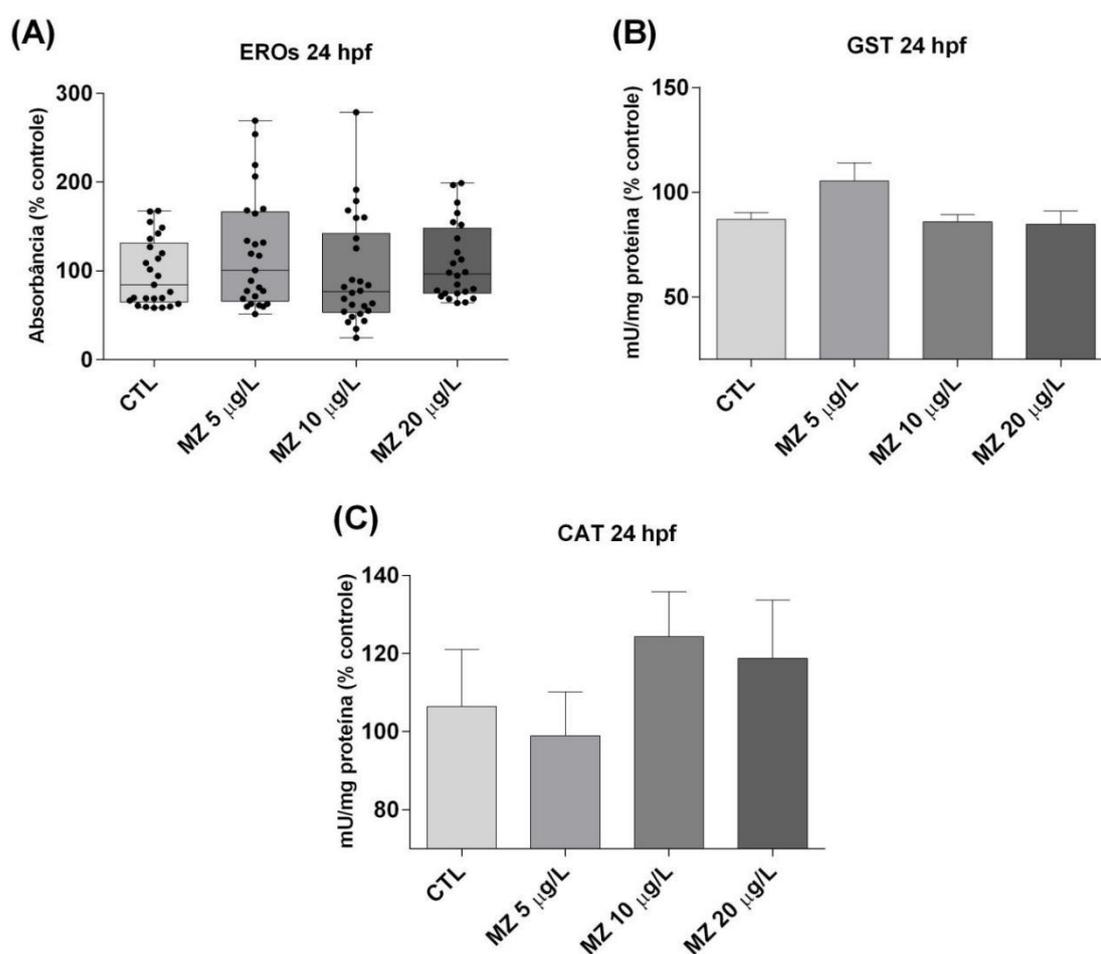


Fonte: da autora, 2018.

5.3 MZ não alterou o estado redox e a atividade enzimática em 24 hpf

A exposição de embriões de 24 hpf ao MZ não resultou em alterações estatisticamente significativas em relação ao CTL no estado redox em nenhuma das concentrações testadas (Figura 11A). Além disso, as atividades das enzimas antioxidantes GST (Figura 11B) e CAT (Figura 11C) não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao CTL.

Figura 11. Parâmetros bioquímicos de avaliação de toxicidade em 24 hpf. (A) Quantificação da fluorescência através do corante H₂DCF-DA; (B) Atividade da enzima antioxidante GST expressa por mU/mg de proteína; (C) Atividade da enzima antioxidante CAT expressa por mU/mg de proteína. Os resultados foram expressos pela porcentagem do CTL com média \pm SEM, sendo * $p < 0,05$.

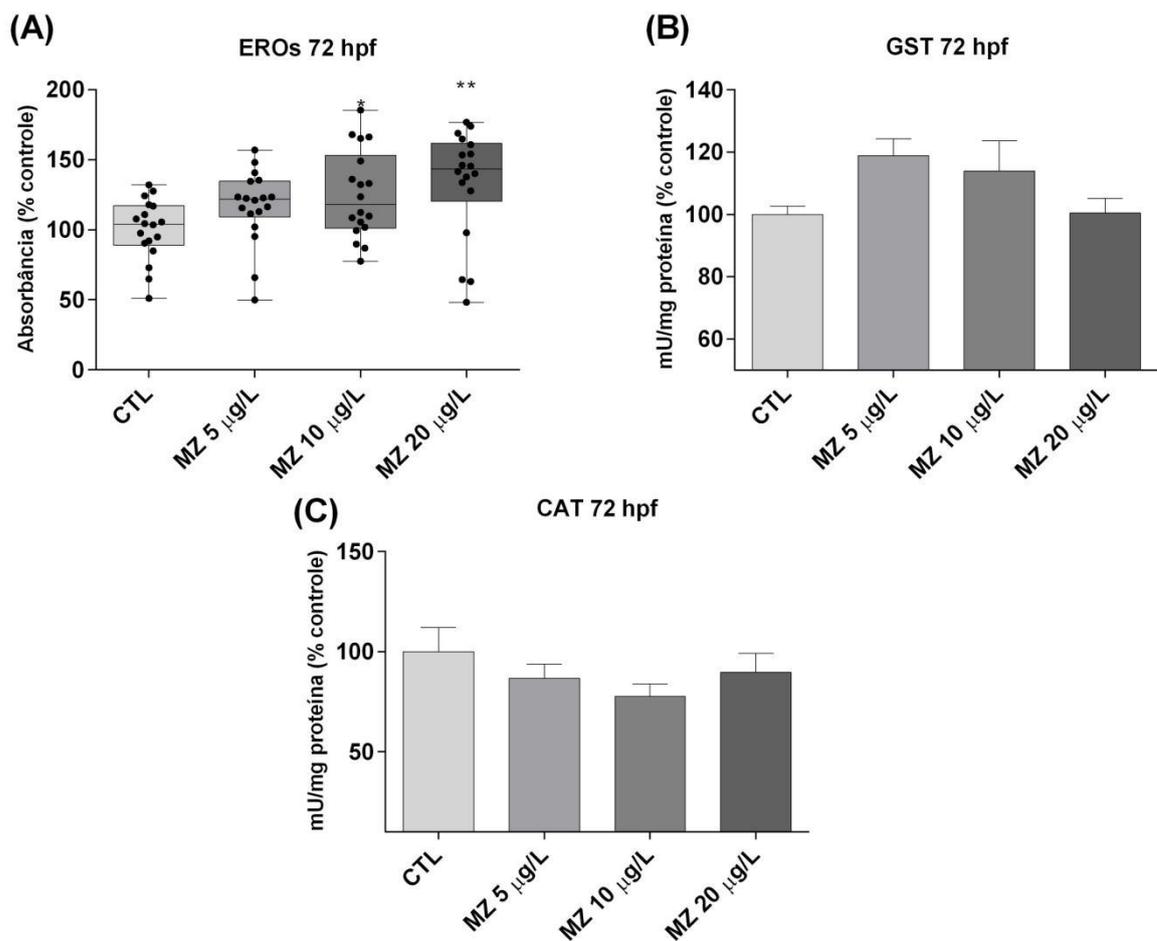


Fonte: da autora, 2018.

5.4 MZ causou um aumento do estado pró-oxidante em larvas de 72 hpf

A exposição ao MZ resultou em alterações estatisticamente significativas em relação ao CTL no estado redox, ocasionando um aumento nos níveis de EROs na concentração de 20 $\mu\text{g/L}$ (Figura 12A). Contudo, as atividades das enzimas antioxidantes GST (Figura 12B) e CAT (Figura 12C) não apresentaram diferenças entre os grupos CTL e MZ.

Figura 12. Parâmetros bioquímicos de avaliação de toxicidade em 72 hpf. (A) Quantificação da fluorescência através do corante $\text{H}_2\text{DCF-DA}$; (B) Atividade da enzima antioxidante GST expressa por mU/mg de proteína; (C) Atividade da enzima antioxidante CAT expressa por mU/mg de proteína. Os resultados foram expressos em porcentagem do CTL com média \pm SEM, sendo * $p < 0,05$.

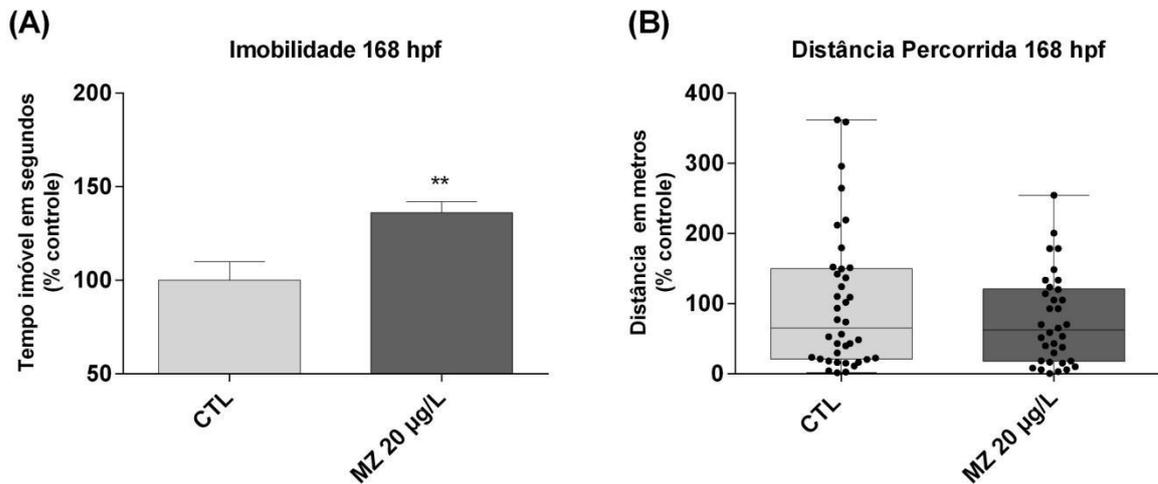


Fonte: da autora, 2018.

5.5 A exposição ao MZ afetou o comportamento exploratório em 168 hpf

Em relação às análises comportamentais exploratórias em 168 hpf ou 7 dias pós fertilização (dpf), larvas tratadas com MZ na concentração de 20 µg/L se mostraram estatisticamente diferentes em comparação ao grupo CTL em relação ao tempo que permaneceram imóveis (Figura 13A). Porém, em relação a sua distância percorrida (Figura 13B), os grupos não apresentaram diferença estatística.

Figura 13. Análise do comportamento exploratório de larvas com 168 hpf. (A) Tempo imóvel em segundos; (B) Distância percorrida em metros. Os resultados foram expressos em porcentagem do CTL com média \pm SEM, sendo * $p < 0,05$.



Fonte: da autora, 2018.

6 DISCUSSÃO

O fungicida MZ, ao longo dos anos, tem sido utilizado em larga escala na proteção de monoculturas (GULLINO et al., 2010). Com isso, pode vir a causar danos aos ecossistemas aquáticos e, conseqüentemente, aos animais que são particularmente vulneráveis à contaminação de pesticidas, como os peixes (VALAVANIDIS et al., 2006). Neste sentido, o presente trabalho buscou avaliar biomarcadores comportamentais e bioquímicos nas concentrações de MZ encontradas nos corpos d'água.

Em relação a mortalidade, pode-se observar que as diferentes concentrações de relevância ambiental testadas se mostraram subletais, de modo que não causaram a mortalidade dos embriões. Com relação a eclosão em 72 hpf, o número de embriões não eclodidos foi maior nas concentrações de 10 e 20 µg/L, podendo indicar um possível dano no desenvolvimento embrionário em razão da exposição ao composto, visto que a eclosão é um importante indicador da qualidade do desenvolvimento das larvas e está diretamente associada com o sistema motor (MU et al., 2016).

Em relação as análise motoras, a exposição ao MZ resultou em um aumento significativo no número de movimentos espontâneos dos embriões em 24 hpf na concentração de 10 µg/L, podendo sugerir uma hiperatividade nos embriões expostos a essa concentração, enquanto que na concentração de 20 µg/L não houve diferença em relação aos embriões do grupo CTL. Outros estudos já apresentaram dados similares, Mu et al. (2013) relataram que embriões de peixe-zebra expostos ao fungicida Difenconazole apresentaram uma indução no movimento espontâneo dos embriões na concentração de 1,5 mg/L e uma posterior diminuição nas concentrações de 2 e 2,5 mg/L.

Nas respostas mediadas por estímulos motores em 72 hpf, larvas expostas a concentração de 20 µg/L apresentaram um déficit motor quando comparadas ao grupo controle, necessitando de um maior número de estímulos para apresentar uma resposta de escape, bem como tiveram sua capacidade natatória prejudicada. Nesse contexto, Andrade et al. (2016) demonstraram que larvas de peixe-zebra expostas ao pesticida Carbendazim em concentrações de relevância ambiental apresentam uma resposta locomotora alterada em relação a natação, mesmo nas concentrações mais baixas, indicando o comportamento como um biomarcador

extremamente sensível e ecologicamente relevante, visto que é associado com a busca por alimentos e resposta anti-predatória.

Além disso, a exposição na concentração de 20 µg/L de MZ demonstrou efeitos também no comportamento exploratório em 168 hpf, levando a um maior tempo de imobilidade das larvas quando comparadas ao CTL. Esta alteração no comportamento exploratório pode indicar que larvas de peixe-zebra submetidas a exposição continuada ao composto podem ser mais suscetíveis à predação em um ambiente natural, uma vez que seu estado locomotor foi alterado após essa exposição ao fungicida. Em estudos anteriores, Altenhofen et al. (2017a) observaram que larvas de peixe-zebra expostas a baixas concentrações do fungicida Tebuconazole analisadas em 120 hpf reduziram sua capacidade exploratória, apresentando uma redução da distância percorrida. Assim como Bridi et al. (2017), que demonstraram o mesmo resultado em larvas de 168 hpf expostas aos pesticidas Glifosato e Roundup®.

As alterações motoras comportamentais de peixe-zebra apresentadas nesse trabalho podem estar associadas aos subprodutos de degradação de MZ. O Mn, constituinte principal do MZ, tem sido apontado como o possível mecanismo de toxicidade associado a danos motores através da alteração do movimento espontâneo dos embriões em 24 hpf, da resposta de escape e da capacidade natatória em 72 hpf (COSTA-SILVA et al., 2018b). Além disso, Altenhofen et al. (2017b) observaram anteriormente que a exposição ao cloreto de manganês (MnCl₂) é capaz de alterar o comportamento de natação das larvas de peixe-zebra em 5, 7 e 10 dias pós fertilização (dpf), sugerindo danos ao sistema dopaminérgico devido a exposição prolongada ao Mn e a quebra da homeostase redox nesses organismos, podendo ocasionar danos via estresse oxidativo.

O desenvolvimento embrionário é caracterizado por uma alta taxa de diferenciação que depende principalmente da homeostase redox (DENNERY, 2007). Porém, uma tendência para a produção exacerbada de EROs pode perturbar esse equilíbrio, causando distúrbios no desenvolvimento (WANG et al., 2018), podendo levar a déficits locomotores e comportamentais em peixe-zebra.

Tendo em vista a avaliação de parâmetros bioquímicos, pode-se observar através da exposição ao MZ em 24 hpf que não houveram alterações em nenhum dos parâmetros em comparação com o CTL. Entretanto, as larvas de 72 hpf apresentaram um desequilíbrio do seu estado redox devido ao aumento da geração

de EROs, quando tratadas com MZ 20 µg/L, sugerindo um potencial pró-oxidante já descrito em outros DTCs (TILTON; LA DU; TANGUAY, 2008; GROSICKA-MACIĄG et al., 2012), embora as enzimas antioxidantes não tenham diferido do CTL.

Dessa forma, pode-se inferir que a análise de parâmetros bioquímicos não se mostrou um biomarcador precoce de contaminantes ambientais em concentrações de relevância ecológica, visto que só foi capaz de detectar alterações redox em 72 hpf. Em contrapartida, as alterações comportamentais já eram apresentadas em embriões de 24 hpf tratados com MZ, indicando uma maior sensibilidade desse parâmetro, de forma que se torna um potencial biomarcador precoce da toxicidade induzida por MZ. A literatura traz resultados similares, Liang et al. (2017) observaram que embriões de peixe-zebra expostos a concentrações ambientais de tributilestanho, composto ativo de biocidas, são mais sensíveis a alterações de parâmetros comportamentais em comparação com parâmetros moleculares e metabólicos.

Como descrito por Hellou (2010), os parâmetros comportamentais são bons candidatos como sinais de alerta precoce e avaliação de risco de potenciais contaminantes ambientais. Os testes comportamentais são rápidos, simples, não invasivos e possuem alta relevância ecológica. Assim, são ferramentas essenciais para o estudo de respostas biológicas em toxicologia e potenciais biomarcadores sensíveis na avaliação de ecossistemas sustentáveis.

7 CONCLUSÃO

Desse modo, pode-se concluir que o Mancozebe, mesmo em concentrações baixas, é capaz de alterar parâmetros motores e comportamentais em peixe-zebra, tornando as análises comportamentais e motoras ferramentas sensíveis à detecção precoce de potenciais riscos ambientais relacionados ao uso indiscriminado de produtos agrícolas, uma vez que tais alterações se manifestam anteriormente a distúrbios relacionados a parâmetros bioquímicos. Porém, mais estudos são necessários para elucidar as vias biológicas dessas alterações nesse organismo modelo, principalmente em concentrações subletais, visto que possuem grande relevância ecotoxicológica com o constante crescimento da agricultura no Brasil.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Regularização de Produtos - Agrotóxicos**. Monografias de Agrotóxicos.

ALTHENOFEN, S.; NABINGER, D. D.; WIPRICH, M. L.; PEREIRA, T. C. B.; BOGO, M. R.; BONAN, C.D. Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v.180, p.484-490. 2017.

ALTHENOFEN, S.; WIPRICH, M. T.; NERY, L. R.; LEITE, C. E.; VIANNA, M. R. M. R.; BONAN, C. D. Manganese (II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v.182, p.172-183, 2017b.

ANDRADE, T. S.; HENRIQUES, J. F.; ALMEIDA, A. R.; MACHADO, A. L.; KOBAYASHI, O.; GIANG, P. T.; SOARES, A. M. V. M.; DOMINGUES, I. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v.170, p.390-399. 2016.

ARCANJO, M. E. **Monitoramento do Agrotóxico Mancozeb no Solo em Diferentes Sistemas de Plantios de Tomate**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade do estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ATAMANIUK, T.; KUBRAK, O.; HUSAK, V.; STOREY, K.; LUSHCHAK, V. The mancozeb-containing carbamate fungicide tattoo induces mild Oxidative Stress in goldfish brain, liver, and kidney. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 11, p.1227-1235. 2013.

BALARDIN, R. S.; MADALOSSO, M. G.; STEFANELLO, M. T.; MARQUES, L. N.; DEBORTOLI, M. P. **Mancozebe: muito além de um fungicida**. 1 ed. Porto Alegre: Bookman, 2017.

BELPOGGI, F.; SOFFRITTI, M.; GUARINO, M.; LAMBERTINI, L.; CEVOLANI, D.; MALTONI, C. Results of Long-Term Experimental Studies on the Carcinogenicity of Ethylene-bis- Dithiocarbamate (Mancozeb) in Rats. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 982, p. 123-136. 2002.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 543, p. 251-272. 2003.

BORSOI, A.; DOS SANTOS, P. R. R.; TAFFAREL, L. E.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, v. 3 n. 1, p. 86-100. 2014.

BOMBARDI, L. M. Laboratório de Geografia Agrária FFLCH - USP. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Européia**. 1. ed. São Paulo, 2017. 296p.

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

BRASIL. O CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, no uso das atribuições que lhe confere pelo inciso VII, art. 8º da Lei nº 6.938 de 31 de agosto de 1981, regulamentada pelo Decreto 99.274, de 6 de junho de 1990, estabelece em anexo à portaria nº 168 de 31 de junho de 2005 a **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 430**, de 13 de maio de 2011.

BRIDI, D.; ALTENHOFEN, S.; GONZALEZ, J. B.; REOLON, G. K.; BONAN, C. D. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Toxicology**, v. 392, p. 32–39. 2017.

BRODY, A.; CHOU, E.; GRAY, J. M.; POKYRWKA, N. J.; RALEY-SUSMAN, K. M. Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. **NeuroToxicology**, v. 34, n. 1, p. 74–81. 2013.

CARVALHO, R. D. E.; BARBOSA, F. H. F. Resíduos de agrotóxicos organofosforados e ditiocarbamatos presentes na cultura de tomate consumidos no estado de Minas Gerais nos anos de 2006, 2007 e 2008: Avaliação da exposição humana. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 13, n. 1, p. 171-190. 2013.

COSTA-SILVA, D. G., et al. Mancozeb exposure results in manganese accumulation and Nrf2-related antioxidant responses in the brain of common carp *Cyprinus carpio*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 16, p. 15529-15540. 2018a.

COSTA-SILVA, D. G., et al. N-acetylcysteine inhibits Mancozeb-induced impairments to the normal development of zebrafish embryos. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 68, p. 1-12. 2018b.

DAVIES, K. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4, p. 279–289, out. 2001.

DENNERY, P. A. Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 81, n. 3, p. 155–162. 2007.

DEWER, Y.; POTTIER, M. A.; LALOUETTE, L.; MARIA, A.; DACHER, M.; BELZUNCES, L. P.; SIAUSSAT, D. Behavioral and metabolic effects of sublethal doses of two insecticides, chlorpyrifos and methomyl, in the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23 n. 4, p. 3086–3096. 2016.

DHOUIB, I. B.; ANNABI, A.; JALLOULI, M.; MARZOUKI, S.; GHARBI, N.; ELFAZAA, S.; LASRAM, M. M. Carbamates pesticides induced immunotoxicity and

carcinogenicity in human: A review. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 14, n. 2, p. 85–90. 2016.

DU, J.; GRIDNEVA, Z.; GAY, M. C. L.; TRENGOVE, R. D.; HARTMANN, P. E.; GEDDES, D. T. Pesticides in human milk of Western Australian women and their influence on infant growth outcomes: A cross-sectional study. **Chemosphere**, v. 167, p. 247–254. 2017.

ECKHARDT, S. **Le complexe MILI/mHEN1 et études fonctionnelles des protéines DrTDRD1 et DrMOV10L**. 2011. Tese (Doutorado em Biologia Celular), Universidade de Grenoble, Grenoble.

FERREIRA, I. C.; ABREU, R. M. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, ano IV, n. 2, p. 32–39. 2007.

FLORES-GARCÍA, M. E.; MOLINA-MORALES, Y.; BALZA-QUINTERO, A.; BENÍTEZ-DÍAZ, P. R.; MIRANDA-CONTRERAS, L. Residuos de plaguicidas en aguas para consumo humano en una comunidad agrícola del estado Mérida, Venezuela. **Investigacion Clinica**, v.52, n.4, p.295-311. 2011.

GANGEMI, S., et al. Occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for the development of chronic diseases in humans (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 5, p. 4475–4488. 2016.

GROSICKA-MACIĄG, E.; KURPIOS-PIEC, D.; SZUMIŁO, M.; GRZELA, T.; RAHDEN-STAROŃ, I. Dithiocarbamate fungicide zineb induces oxidative stress and apoptosis in Chinese hamster lung fibroblasts. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 1, p. 95–101. 2012.

GULLINO, M. L., et al. Mancozeb: Past, Present and Future. **Plant Disease**, v. 94, n.9, p. 1076-1087. 2010.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 398–405. 1981.

HAENDEL, M. A.; TILTON, F.; BAILEY, G. S.; TANGUAY, R. L. Developmental Toxicity of the Dithiocarbamate Pesticide Sodium Metam in Zebrafish. **Toxicological Sciences**, v.81, n. 2, p. 390-400. 2004.

HANSEN, J. M.; HARRIS, C. Glutathione during embryonic development. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1850, n. 8, p. 1527–1542. 2015.

HELLOU, J. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 1, p. 1-11. 2011.

HILL, A. J. et al. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6–19. 2005.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **6º Indicadores de desenvolvimento sustentável**. 10. ed. Rio de Janeiro, 2015. 348 p.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Ministério do Meio Ambiente. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. Boletim 2016.

JIN, X.; REN, J.; WANG, B.; LU, Q.; YU, Y. Impact of coexistence of carbendazim, atrazine, and imidacloprid on their adsorption, desorption, and mobility in soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 9, p. 6282–6289. 2013.

KHALIL, S.; ABBAS, O.; KIBBI, A. G.; KURBAN, M. Scabies in the age of increasing drug resistance. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–10. 2017.

KHAN, M.; DAMALAS, C. A. Occupational exposure to pesticides and resultant health problems among cotton farmers of Punjab, Pakistan. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 25, n. 5, p. 508–521. 2015.

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

KNIIVILÄ, M. Industrial development and economic growth: Implications for poverty reduction and income inequality. In: UNITED NATIONS, **Industrial Development for the 21st Century**. 2004, p. 295–332.

LEE, I.; ERIKSSON, P.; FREDRIKSSON, A.; BURATOVIC, S.; VIBERG, H. Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and biomolecular studies on chlorpyrifos and carbaryl. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 288, n. 3, p. 429–438. 2015.

LIANG, X.; SOUDERS, C. L.; ZHANG, J.; MARTYNIUK, C. J. Tributyltin induces premature hatching and reduces locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae at environmentally relevant levels. **Chemosphere**, v. 189, p. 498–506. 2017.

LU, D., et al. Organochlorine pesticides and their metabolites in human breast milk from Shanghai, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 12, p. 9293–9306. 2015.

MITCHELL, K. M.; MOON, T. W. Behavioral and biochemical adjustments of the zebrafish *Danio rerio* exposed to the β -blocker propranolol. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 199, p. 105-114. 2016.

MOHAPATRA, S.; LEKHA, S. Residue level and dissipation of carbendazim in/on pomegranate fruits and soil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 7, p. 1-10. 2016.

MORAES, C.; SAMPAIO, R. C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. Motriz. **Revista de Educação Física**. UNESP, v. 16, n; 2, p. 506–515. 2010.

MU, X.; PANG, S.; SUN, X.; GAO, J.; CHEN, J.; CHEN, X.; LI, X.; WANG, C. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 147-157. 2013.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 236**. Paris, 2013. 22p.

ORTIZ-HÉRNANDEZ, M. L.; SÁNCHEZ-SALINAS, E.; OLVERA-VELONA, A.; FOLCH-MALLOL, J. L. Pesticides in the Environment: Impacts and Their Biodegradation as a Strategy for Residues Treatment. In: STOYTCHIEVA, M. **Pesticides - Formulations, Effects, Fate**. Intech Open, 2011. p. 551-574.

PANDEY, S. P.; TSUTSUI, K.; MOHANTY, B. Endocrine disrupting pesticides impair the neuroendocrine regulation of reproductive behaviors and secondary sexual characters of red munia (*Amandava amandava*). **Physiology and Behavior**, v. 173, p. 15–22. 2017.

PARNG, C.; SENG, W. L.; SEMINO, C.; MCGRATH, P. Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 1, n. 1, p. 41–48. 2002.

PENG, C., et al. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. **BioMed Research International**. p. 1-13. 2014.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos , saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: Peres, F.; Moreira, J. C.; Dubois, G. S. **É Veneno Ou é Remédio? Agrotóxicos, Saúde e Ambiente**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. 384 p.

PÉREZ-SEVERIANO, F. et al. S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 8, p. 1175–1183, dez. 2004.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F.; LARA, S. S.; CORREA, M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 3281-3293. 2017.

QUEIROZ, G. M. P.; DA SILVA, M. R.; FERRAZ BIANCO, R. J.; PINHEIRO, A., & KAUFMANN, V. Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. **Química Nova**, v. 34, n.2, p. 190–195. 2011.

RATH, N. C.; RASAPUTRA, K. S.; LIYANAGE, R.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E. Dithiocarbamate Toxicity - An Appraisal. In: STOYTCHIEVA, M. **Pesticides in the Modern World – Effects of Pesticides Exposure**. Intech Open, 2011. p. 323-340.

RICHENDRFER, H.; CRETON, R.; COLWILL, R. The embryonic zebrafish as a model system to study the effects of environmental toxicants on behaviour. In: LESSMAN, C. A.; CARVER, E. A. **Zebrafish**. Nova Science Publishers, 2014. p. 245-264.

ROPER, C.; TANGUAY, R. L. Zebrafish as a Model for Developmental Biology and Toxicology. In: SLIKKER, W.; PAULE, M. G.; WANG, C. **Handbook of Developmental Neurotoxicology**. Academic Press, 2018. p. 143-151.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Caderno Saúde Pública**, v. 30 n. 7, p. 1–3. 2014.

SAINT-AMANT, L.; DRAPEAU, P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. **Journal of neurobiology**, v. 37, n. 4, p. 622–32. 1998.

SLOMAN, K. A.; MCNEIL, P. L. Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. **Journal of Fish Biology**, v. 81, n. , p. 2175-2198. 2012.

SMITH, G. J. Pesticide use and toxicology in relation to wildlife: Organophosphorus and carbamate compounds. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, U.S. **Fish and Wildlife Service Publications**, v. 170, 1987.

SORIANO, J. M.; JIMÉNEZ, B.; FONT, G.; MOLTÓ, J.C. Analysis of Carbamate Pesticides and Their Metabolites in Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 19–52. 2001.

STRUGER, J.; GRABUSKI, J.; CAGAMPAN, S.; SVERKO, E.; MARVIN, C. Occurrence and Distribution of Carbamate Pesticides and Metalaxyl in Southern Ontario Surface Waters 2007-2010. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 4, p. 423–431. 2016.

TILTON, F.; LA DU, J. K.; TANGUAY, R. L. Sulfhydryl systems are a critical factor in the zebrafish developmental toxicity of the dithiocarbamate sodium metam (NaM). **Aquatic toxicology**, v. 90, n. 2, p. 121–7. 2008.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178–189. 2006.

VAN WENDEL DE JOODE, et al. Manganese concentrations in drinking water from villages near banana plantations with aerial mancozeb spraying in Costa Rica: Results from the Infants' Environmental Health Study (ISA). **Environmental Pollution**, v. 215, p. 247–257. 2016a.

VAN WENDEL DE JOODE, et al. Pesticide exposure and neurodevelopment in children aged 6–9 years from Talamanca, Costa Rica. **Cortex**, v. 85, p. 137–150. 2016b.

WANG, X. H.; SOUDERS, C. L.; ZHAO, Y. H.; MARTYNIUK, C. J. Mitochondrial bioenergetics and locomotor activity are altered in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to the bipyridylum herbicide diquat. **Toxicology letters**, v. 283, p. 13-20. 2018.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book: A Guide for The Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*)**. 4 ed. Eugene: University of Oregon Press, 2000.

XIA, L.; ZHENG, L.; ZHOU, J. L. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 182, p. 416– 425. 2017.

XU, S. ENVIRONMENTAL FATE OF MANCOZEB. **Environmental Monitoring & Pest Management**, p. 1-9, out. 2000.

YAHIA, E.; AICHE, M. A.; CHOUABBIA, A.; BOULAKOUD, M. S. Subchronic mancozeb treatment induced liver toxicity via oxidative stress in male wistar rats. **Communications in agricultural and applied biological sciences**. v. 79, n.3, p. 553-9. 2014.

ZACHARIA, J. T. Ecological Effects of Pesticides. In: STOYTCHEVA, M. **Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits**. Intech Open, 2011. p. 129-142.