

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

LUÍS FELIPE ONISANTI KNAPIK

**ECOTOXICIDADE DO INSETICIDA MALATHION E SEUS EFEITOS
SOBRE OS BIOMARCADORES ENSAIO COMETA E
ACETILCOLINESTERASE EM *Daphnia magna***

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2018**

LUÍS FELIPE ONISANTI KNAPIK

**ECOTOXICIDADE DO INSETICIDA MALATHION E SEUS EFEITOS
SOBRE OS BIOMARCADORES ENSAIO COMETA E
ACETILCOLINESTERASE EM *Daphnia magna***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Wanessa Algarte Ramsdorf

**CURITIBA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

K67e Knapik, Luís Felipe Onisanti
2018 Ecotoxicidade do inseticida malathion e seus efeitos sobre os biomarcadores ensaio cometa e acetilcolinesterase em daphnia magna / Luís Felipe Onisanti Knapik.-- 2018.
58 f.: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web.
Texto em português com resumo em inglês.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2018.
Bibliografia: p. 45-52.

1. Toxicologia genética. 2. Compostos organofosforados. 3. Neurotoxicidade. 4. Tecnologia ambiental - Dissertações. I. Ramsdorf, Wanessa Algarte, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. inst. III. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus Curitiba
Bibliotecária Lucia Ferreira Littiere - CRB 9/1271

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 089

A Dissertação de Mestrado intitulada ECOTOXICIDADE DO INSETICIDA MALATHION E SEUS EFEITOS SOBRE OS BIOMARCADORES ENSAIO COMETA E ACETILCOLINESTERASE EM DAPHNIA MAGNA, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Luis Felipe Onisanti Knapik**, no dia 23 de fevereiro de 2018, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias E Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata - Presidente - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Adriane Martins De Freitas - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Cintia Mara Ribas De Oliveira – UP

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 23 de fevereiro de 2018.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Rita e Luis, e meus irmãos por todo apoio e suporte durante o processo.

À professora Dra. Wanessa, pelo incentivo e ter resgatado minha vontade de seguir na área acadêmica. Gostaria de agradecer todo apoio e confiança prestados a mim e a excelente convivência durante todo o trabalho.

Às professoras doutoras Cintia Mara Ribas de Oliveira e Adriane Martins de Freitas membras da banca avaliadora por todas as sugestões, recomendações e imensa sabedoria oferecidas a mim.

À professora Lucia Regina, por sua imensa sabedoria e por sempre ter me auxiliado mesmo não tendo a obrigação para tal.

À professora Flávia Yamamoto, sem a qual não teria sido possível a realização dos ensaios bioquímicos.

Ao programa por ter aceitado e compreendido meu limitante de tempo.

Aos meus colegas de laboratório, cujo apoio foi essencial para a conclusão deste trabalho. Obrigado Monike, Vinícius, Rayssa, Eliane, Rafael e Camila.

Às minhas amigas Mayara e Regiane, que são as melhores amigas que eu poderia ter. Obrigado por sempre estarem presentes em todas as etapas desde a graduação, tenho vocês para sempre comigo.

Aos meus amigos: Filipe, Milton e Diego que estiveram de alguma forma presentes durante essa trajetória, mesmo que fosse para aguentar os momentos de desespero!

Ao Edimar por ter tido toda paciência do mundo de me aturar na reta final deste trabalho.

Aos funcionários e funcionárias do DAQBI e do PPGCTA por serem prestativos e terem paciência de receber diversas vezes o mesmo documento mal preenchido.

Sou imensamente agradecido a todos vocês!

*“O tempo nos levou para onde a água
estava, e isto é o que a água me deu.”*

Florence Welch

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 ECOTOXICOLOGIA E TOXICIDADE	13
3.2 INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS	14
3.2.1 Malathion	15
3.3 BIOMARCADORES	18
3.3.1 Ensaio Cometa	19
3.3.2 Acetilcolinesterase (AChE)	20
3.4 <i>Daphnia magna</i> COMO ORGANISMO-TESTE	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 INSETICIDA MALATHION	24
4.2 CULTIVO E MANEJO DE <i>Daphnia magna</i>	24
4.3 TESTE PRELIMINAR DE TOXICIDADE COM <i>Daphnia magna</i>	24
4.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>Daphnia magna</i>	25
4.5 EXPOSIÇÃO SUBLETAL DE <i>Daphnia magna</i>	26
4.6 ENSAIO COMETA COM <i>Daphnia magna</i>	26
4.7 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (BRADFORD)	28
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE AChE EM <i>Daphnia magna</i>	29
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 ENSAIO PRELIMINAR DE ECOTOXICIDADE	31
5.2 ECOTOXICIDADE AGUDA COM <i>Daphnia magna</i>	32
5.3 ENSAIO COMETA COM <i>Daphnia magna</i>	35
5.3.1 Metodologias de ensaio cometa com <i>D. magna</i>	38
5.4 ATIVIDADE DE ACETILCOLINESTERASE EM <i>Daphnia magna</i>	40
5.4.1 Metodologias de AChE utilizando <i>D. magna</i> como organismo teste	43
6 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE A	53
APÊNDICE B	55
ANEXO A	56
ANEXO B	57
ANEXO C	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina.

AChE – Acetilcolinesterase.

CAT – Catalase.

CbE – Carboxilesterases.

CE50 – Concentração efetiva média que afeta 50% dos organismos expostos.

ChE – Colinesterases.

GPx - Peroxidases glutaciona dependentes.

ICSU - International Council of Scientific Unions.

NRC - National Research Council.

OF – Organofosforados.

SOD - Superóxido-desmutase

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Concentrações nominais de malathion encontradas no meio ambiente.	17
Quadro 2 Dados de ensaios de toxicidade aguda para malathion, utilizando-se neonatos de <i>D. magna</i>	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inseticidas organofosforados inibidores de AChE.....	15
Tabela 2. Características do malathion.	16
Tabela 3. Ecotoxicidade aguda do malathion para <i>D. magna</i>	33
Tabela 4. Variações de parâmetros nas metodologias de ensaio cometa utilizando-se <i>D. magna</i> como organismo teste.	39
Tabela 5. Valores médios da atividade de AChE para cada grupo de exposição.	41
Tabela 6. Variações de parâmetros nas metodologias de AChE utilizando-se <i>D. magna</i> como organismo teste.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do malathion.	16
Figura 2. Mecanismo de inibição da AChE.	21
Figura 3. <i>Daphnia magna</i>	22
Figura 4. Metodologia do ensaio cometa utilizando-se <i>D magna</i> como organismo teste.	27
Figura 5. Metodologia do ensaio de AChE utilizando-se <i>D. magna</i> como organismo teste.....	29
Figura 6 CE50 (48h) para malathion. Valores de concentração normalizados para base logarítmica para melhor correlação dos valores dose-resposta.	32
Figura 7. Classificação visual dos danos (0 – 3) no material genético de <i>D. magna</i> exposta ao malathion durante 48 horas.	35
Figura 8. Danos individualizados.	36
Figura 9. Medianas obtidas a partir dos escores de dano.....	37
Figura 10. Atividade enzimática da acetilcolinesterase em <i>D. magna</i>	40

RESUMO

KNAPIK, L. ECOTOXICIDADE DO INSETICIDA MALATHION E SEUS EFEITOS SOBRE OS BIOMARCADORES ENSAIO COMETA E ACETILCOLINESTERASE EM *Daphnia magna*. 2018. 60 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

Malathion, inseticida organofosforado, apresenta alta toxicidade e é um dos mais utilizados no mundo. A *Daphnia magna* é um microcrustáceo mundialmente empregado em estudos ecotoxicológicos, para análise da toxicidade aguda de efluentes líquidos e substâncias químicas. Biomarcadores são respostas que os organismos vivos apresentam após contaminação e têm, como vantagens, a detecção precoce dos danos e potencial para avaliar a magnitude da contaminação e grau de severidade dos efeitos. Na literatura, encontramos diversos biomarcadores empregando diferentes organismos-teste, entretanto, poucos são os trabalhos empregando biomarcadores em *D. magna*. Nesse sentido, o presente estudo investigou a ecotoxicidade aguda (determinação da CE50) e os efeitos genéticos e neurotóxicos do inseticida malathion em *D. magna*, através do ensaio cometa e da avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase, respectivamente, nas concentrações subletais de $1,26 \cdot 10^{-3}$ ng L⁻¹ e $4,7 \cdot 10^{-4}$ ng L⁻¹. O ensaio cometa, foi realizado através de eletroforese em gel de células obtidas de *D. magna* após desagregação dos organismos neonatos, e leitura de danos feita visualmente em microscópio de epifluorescência. A atividade enzimática dos extratos (neonatos desagregados) foi medida por leitura em leitor de microplacas a 405 nm por 5 min. A ecotoxicidade aguda do composto para *D. magna* apresentou CE50 (48h) de $1,26 \cdot 10^{-3}$ ng L⁻¹, valor indicativo de extrema ecotoxicidade. Através do ensaio cometa, foram observados danos ao material genético dos organismos expostos ao malathion, e diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações testadas e os grupos controle. A atividade enzimática apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os controles e a concentração $4,7 \cdot 10^{-4}$ ng L⁻¹. Esses resultados demonstram a elevada ecotoxicidade e capacidade de danos ao material genético e neurotoxicidade aos neonatos mesmo em concentrações abaixo das ambientais.

Palavras-chave: Organofosforado. Genotoxicidade. Neurotoxicidade.

ABSTRACT

KNAPIK, L. MALATHION INSECTICIDE ECOTOXICITY AND ITS EFFECTS ON THE BIOMARKERS COMET ASSAY AND ACETILCOLINESTERASE IN *Daphnia magna*. 2018. 60 p. Masters Dissertation (Master in Environmental Science and Technology) - Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Parana. Curitiba, 2018.

Malathion, an organophosphate insecticide, presents high toxicity and is one of the most used in the world. *Daphnia magna* is a world-wide used microcrustacean in ecotoxicological studies, to analyze the acute toxicity of liquid effluents and chemical substances. Biomarkers are responses that live organisms exhibit after contamination and have, as an advantage, the early detection of damage and the potential to assess the magnitude of contamination and degree of severity of effects. In the literature, we found several biomarkers employing different test organisms, however, few studies are using biomarkers in *D. magna*. In this sense, the present study investigated the acute ecotoxicity (EC50 determination) and the genetic and neurotoxic effects of the insecticide malathion on *D. magna*, through the comet assay and evaluation of the activity of the enzyme acetylcholinesterase, respectively, in the sublethal concentrations of $1.26 \cdot 10^{-3} \text{ ng L}^{-1}$ and $4.7 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$. The comet assay, was performed by gel electrophoresis of cells obtained from *D. magna* after disaggregation of the newborn organisms, with damage reading done visually in an epifluorescence microscope. The enzymatic activity of extracts (obtained after unbundling of the neonates) was measured by reading in microplate reader at 405 nm for 5 min. The acute ecotoxicity of the compound for *D. magna* presented an EC50 (48h) of $1.26 \cdot 10^{-3} \text{ ng L}^{-1}$, indicative of extreme ecotoxicity. Through the comet assay, damage to the genetic material of organisms exposed to malathion was observed, and significant difference ($p < 0.05$) between the concentrations tested and the control groups. The enzymatic activity presented a significant difference ($p < 0.05$) between controls and the concentration $4.7 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$. These results demonstrate the high ecotoxicity and ability to harm genetic material and neurotoxicity to neonates even at below-ambient concentrations.

Keywords: Organophosphate. Genotoxicity. Neurotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos muitas vezes são receptores finais de contaminantes liberados no ambiente, podendo ser afetados por contaminantes aéreos, que sofrem deposição atmosférica, e contaminantes terrestres, que atingem estes ambientes através do escoamento de chuvas (DOMINGOS, 2006).

Devido à necessidade de preservar a saúde e o bem-estar humano, bem como o equilíbrio ecológico aquático, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), por meio da Resolução CONAMA nº 430 de 2011, dividiu os sistemas hídricos em 13 classes de acordo com o tipo e usos de suas águas, impondo limites de concentrações de cada poluente ao ser despejado num corpo da água. Uma vez que estes valores limítrofes são ultrapassados, está caracterizada contaminação.

As atividades agropecuárias aparecem como grandes responsáveis pela degradação intensa das águas (DE DEUS; BAKONYI, 2012). A visão de que os corpos aquáticos podiam depurar os contaminantes neles despejados chegou ao limite, sendo uma das causas do uso inadequado de agrotóxicos. Rachel Carson em seu livro intitulado Primavera silenciosa, publicado em 1962, levantou pela primeira vez a hipótese de que praguicidas utilizados na agricultura, naquele caso o Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), apresentariam efeitos adversos às espécies não alvo da substância (ROSSI, 2013).

De acordo com dados da Secretaria de Saúde do estado do Paraná (2013), o estado é o terceiro maior consumidor de agrotóxicos no país, sendo que os 97% mais utilizados são organofosforados. De acordo com a Secretaria, Ponta Grossa, Cascavel e Londrina apresentaram os maiores consumos, com valores superiores a $15,0 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$.

O malathion, considerado como um possível substituto ao DDT, ganha destaque por ser um inseticida organofosforado com alta toxicidade para as pragas em agriculturas. É um dos mais utilizados no mundo, sendo geralmente empregado para o controle de insetos na produção de alimentos. Todavia, a contaminação de corpos aquáticos por malathion pode alterar a temperatura da água, reprodução de organismos e promover efeitos sobre a enzima acetilcolinesterase nos seres vivos, inclusive espécies não-alvo (SALER; SAGLAM, 2005).

Considerando-se a problemática relacionada aos praguicidas, estudos ecotoxicológicos têm sido utilizados para verificar os seus efeitos tóxicos em organismos aquáticos. A *Daphnia magna*, microcrustáceo com reprodução assexuada e sensível a uma grande gama de substâncias tóxicas é um exemplo destes organismos (NAGATO; SIMPSON; SIMPSON, 2016). Essa avaliação pode ser realizada através da realização de bioensaios de toxicidade aguda, crônica, subcrônica, além da análise de biomarcadores (KNIE; LOPES, 2004; SILVA, 2008; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; RAMSDORF, 2011).

Biomarcadores são respostas bioquímicas, fisiológicas ou parâmetros morfológicos alterados, causados pela exposição de um organismo a uma determinada substância possivelmente tóxica, que podem ser mensurados em células, fluidos corporais, tecidos ou órgãos de um organismo (DOMINGOS, 2006; LAN; GRAY, 2001; VAN DER OOST et al., 2003).

O ensaio cometa é um biomarcador molecular, rápido e sensível, que visa detectar danos ao DNA de células individuais expostas a agentes genotóxicos e é frequentemente realizado com células de peixes (KAPCZINSKI et al., 2004; ROCHA et al., 2009; RAMSDORF, 2011), havendo poucos trabalhos empregando *D. magna* como organismo teste (PARRELLA et al., 2015 e PARK; CHOI, 2007). A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável pela regulação da neurotransmissão, prevenindo contínuas passagens de impulsos nervosos (SANTOS, 2009) e a avaliação da sua atividade é um biomarcador de neurotoxicidade muito empregado em estudos ecotoxicológicos, entretanto, também são escassos os trabalhos na literatura com *Daphnia magna* como organismo-teste (GUILHERMINO et al, 2000; JEMEC et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi a avaliação ecotoxicológica do inseticida malathion em *Daphnia magna* e a análise dos seus efeitos genotóxicos e neurotóxicos através do ensaio cometa e avaliação da atividade de AChE, respectivamente, após exposição hídrica aguda subletal. Além disso, estabelecer um protocolo para o ensaio cometa com *Daphnia magna* no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ecotoxicidade aguda e os efeitos genotóxicos e neurotóxicos do inseticida malathion em *Daphnia magna*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade de *Daphnia magna* ao malathion, mediante exposição hídrica aguda subletal, estática, em diferentes concentrações.
- Avaliar os efeitos genotóxicos do malathion à neonatos de *Daphnia magna* através do ensaio cometa após exposição aguda subletal.
- Avaliar os efeitos neurotóxicos do malathion à neonatos de *Daphnia magna* através da atividade da enzima acetilcolinesterase após exposição aguda subletal.
- Desenvolvimento do protocolo do ensaio cometa com *Daphnia magna* no Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ECOTOXICOLOGIA E TOXICIDADE

René Truhaut, toxicologista francês, em junho de 1969 durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU)*, em Estocolmo, propôs pela primeira vez o termo ecotoxicologia. Segundo ele, ecotoxicologia pode ser definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

A ecotoxicologia estuda os impactos deletérios de poluentes ambientais sobre populações de organismos vivos ou ecossistemas, considerando a interação dos poluentes com o meio ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Assim, sendo utilizada como ferramenta de monitoramento ambiental, baseada principalmente na resposta de organismos perante estressores químicos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Bioensaios ecotoxicológicos são empregados no monitoramento de efluentes, substâncias químicas e poluentes emergentes lançados em corpos receptores (BRESOLA, 2007). A partir da exposição de organismos-teste à várias diluições da amostra a ser testada, por um período determinado de tempo, os valores são obtidos em fatores de toxicidade aguda, crônica, subcrônica ou genotoxicidade (ABNT, 2009).

Toxicidade aguda é definida, segundo Knie e Lopes (2004), como sendo um efeito deletério causado aos organismos em um curto período de exposição em relação ao seu ciclo de vida. Estudos de toxicidade aguda com microcrustáceos em ambientes aquáticos envolvem, normalmente, a determinação da concentração efetiva média (CE50) (AZEVEDO; CHASIN, 2004) analisando-se como efeito deletério a concentração que causa efeito agudo, como imobilidade, a 50% dos organismos na coluna d'água.

Com relação à toxicidade subcrônica, devido ao intervalo de tempo analisado, sua definição é, por muitas vezes, controversa. De forma geral, avalia-se os efeitos causados pela substância ou contaminante em um estágio de tempo que não exceda 10% do ciclo de vida do organismo (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

3.2 INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Ésteres de ácido fosfórico, conhecidos como compostos organofosforados (OF) (REBECHI, 2012), são um grande grupo de agentes químicos utilizados como pesticidas (ZENG et al., 2014), como uma alternativa perante pesticidas mais persistentes no meio ambiente, como organoclorados (NAGATO; SIMPSON; SIMPSON, 2016).

Inseticidas organofosforados são amplamente utilizados na agricultura (BARATA; SOLAYAN; PORTE, 2004; DAMÁSIO et al., 2007; HONGCUI; BINGQIANG; SHAONAN, 2012) devido a sua alta toxicidade a organismos alvo, baixa persistência e rápida degradação no meio ambiente (SALER; SAGLAM, 2005). Por não apresentarem um organismo-alvo específico, tendem a afetar populações de espécies não-alvo, podendo selecionar indivíduos resistentes na população das espécies afetadas (DAMÁSIO et al., 2007; KIM et al., 2016; MALEKMOHAMMADI; GALEHDARI, 2016).

Segundo Kapka-Skrzypczak et al. (2011), resíduos de OF foram encontrados acima do limite permitido em produtos agroindustriais. No entanto, de acordo com Chambers et al. (2002), o baixo coeficiente de partição octanol/água e altas taxas de biotransformação, previnem a biomagnificação destes compostos nas cadeias tróficas.

De acordo com Cavalcanti et al. (2016), compostos organofosforados são responsáveis por 2/3 de mortes humanas por intoxicação do mundo, sendo registrados anualmente 250.000 mortes, a maioria em sociedades agrícolas, por intoxicação não intencional. Segundo o mesmo autor, no caso do Brasil, os casos de intoxicação por defensivos agrícolas é de 1:50.

O mecanismo de ação destes inseticidas consiste na inibição de esterases, como colinesterases (ChE) e carboxilesterases (CbE) por comprometer o sítio de ação enzimático (DAMÁSIO et al., 2007), sendo a enzima acetilcolinesterase a mais comumente afetada (BARATA; SOLAYAN; PORTE, 2004). Com isso, a função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético é interrompida (REBECHI, 2012). Esse bloqueio causa limitação respiratória, hiperestimulação colinérgica, danos irreversíveis e pode acabar levando o organismo à morte por asfixia (SHAONAN; YAJUN, 2011; CAVALCANTI et al., 2016). Outros inseticidas organofosforados que inibem a ação da AChE estão presentes na Tabela 1.

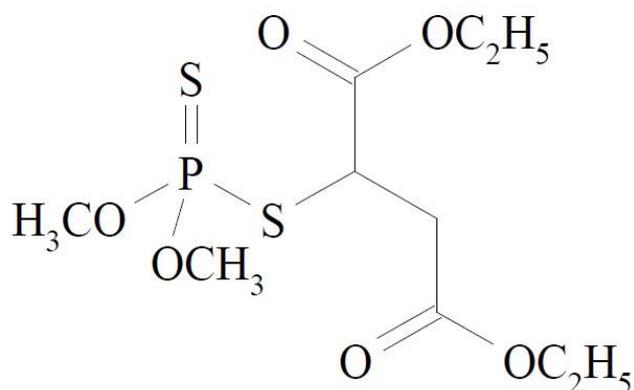
Tabela 1. Inseticidas organofosforados inibidores de AChE.

Composto	Referência
Etil-paraoxon	Cavalcanti et al. 2016
DIPF (fosfofluoridrato)	Cavalcanti et al. 2016
Parathion	Dos Santos et al. 2007
Chlorthion	Dos Santos et al. 2007
Fenthion	Dos Santos et al. 2007
Demeton-S	Dos Santos et al. 2007

3.2.1 MALATHION

Conforme a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) (2009), malathion, O,O-dimetil-ditiofosfato-de-dietil-mercaptopuccinato, é um inseticida sintético (Figura 1). É considerado como um possível substituto ao DDT e atualmente ganha destaque por ser reconhecido como o primeiro inseticida organofosforado com alta toxicidade e um dos mais utilizados no mundo (SALER; SAGLAM, 2005). Também possui tempo de meia vida relativamente curto, se comparado a outros inseticidas sintéticos, de 1,65 dias (pH 8) ou 17 dias (pH 6) (REBECHI, 2012).

Figura 1. Estrutura química do malathion.



Fonte: Adaptado de USEPA, 2009.

Em temperatura ambiente, apresenta-se como um líquido de coloração castanho-amarelada, solúvel em etanol, acetona e éter etílico (ATSDR, 2003). Farenhorst, Andronak e Mcqueen (2015) ressaltam que o malathion é empregado para controle de insetos na produção de alimentos através de pulverização (REBECHI, 2012), desta maneira, entrando em contato com o meio ambiente. Outras características relacionadas ao malathion podem ser vistas na tabela 2.

Tabela 2. Características do malathion.

Fórmula empírica	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Nome comercial	Malathion
Classe química	Organofosforado
Registro CAS*	121-75-5
Aparência	Líquido castanho-amarelado
Massa molar (g mol ⁻¹)	330,4
Solubilidade em água a 20°C (mg L ⁻¹)	148
Ponto de ebulição (°C)	156 - 157
Log K _{ow} em pH 7,0 a 20°C	2,75
Pressão de vapor (Pa) a 30°C	5×10 ⁻³

Fonte: Adaptado de COLEONE, 2014; USEPA, 2009 e WHO, 2004.

**Chemical Abstracts Service.*

Uma vez no ambiente, o malathion pode sofrer biodegradação, hidrólise, fotólise ou degradação por reação com radicais hidroxila (COLEONE, 2014). Quando em condições de pH baixo ou baixo teor de matéria orgânica, a persistência do inseticida pode durar meses (WHO, 2004). É importante ressaltar que um de seus metabólitos, o malaoxon formado por monoxigenases, pode ser até 33 vezes mais tóxico que a molécula original (NPIC, 2010).

Saler e Saglam (2005) ressaltam que a contaminação de corpos aquáticos por malathion pode alterar a temperatura da água, reprodução de organismos e efeitos sobre a enzima acetilcolinesterase em organismos não-alvo.

O malathion é utilizado para o controle de pragas mundialmente e em específico no Brasil para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da Dengue, pela saúde pública (COLEONE, 2014; GOMES, 2014). As concentrações de malathion determinadas no meio ambiente por outros estudos, estão listadas no quadro 1.

Quadro 1. Concentrações nominais de malathion encontradas no meio ambiente.

Origem	Concentração	Localidade	Referência
Córrego Urbano	648 ng L ⁻¹	Estados Unidos	USEPA,2009
Água de precipitação	6 ng L ⁻¹	Yokohama, Japão	BARATA; SOLAYAN; PORTE, 2004
Deposição total	5200 ng L ⁻¹	Winnipeg, Canadá	FARENHORST; ANDRONAK; MCQUEEN, 2015
Água superficial	180 ng L ⁻¹	Estados Unidos	ATSDR, 2003
Água para consumo	100 ng L ⁻¹	Estados Unidos	ATSDR, 2003
Ar	6,2 – 220 ng m ⁻³	Área rural, Estados Unidos	ATSDR, 2003
Solo	2000 ng kg ⁻¹	Fazenda experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP	COLEONE, 2014

3.3 BIOMARCADORES

Em 1987 o *Committee on Biological Markers of National Research Council* (NRC) definiu o termo biomarcador pela primeira vez como sendo um sinalizador de eventos em sistemas biológicos, objetivando-se avaliar a exposição, efeitos adversos e susceptibilidade de organismos expostos a algum composto tóxico (VAN DER OOST et al., 2003). Em 1992, Peakall recomendou utilizar o termo biomarcador visando a avaliação de efeitos em um organismo individual, e o termo bioindicador para avaliação de sistemas maiores, como populações.

Atualmente, definem-se como biomarcadores, as respostas bioquímicas, fisiológicas ou parâmetros morfológicos alterados, causados pela exposição de um organismo a uma determinada substância possivelmente tóxica, que podem ser mensuradas em células, fluidos corporais, tecidos ou órgãos de um organismo (DOMINGOS, 2006; LAN; GRAY, 2001; VAN DER OOST et al., 2003), sendo que estes podem ser divididos em três classes:

- Biomarcadores de exposição: estimam a biodisponibilidade de um xenobiótico (qualquer substância estranha à um organismo) ou de seus metabólitos em um organismo exposto (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).
- Biomarcadores de efeito: respostas observadas em nível molecular (bioquímico, fisiológico e histológico) (PÍCOLI, 2004), em geral não sendo específicas em relação ao estressor (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).
- Biomarcadores de susceptibilidade: indicadores de variações inerentes ou adquiridas por um organismo ao longo do tempo e/ou entre a exposição e efeito de um xenobiótico (VAN DER OOST et al., 2003; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

O interesse na utilização de biomarcadores no monitoramento ambiental surgiu devido a diversas vantagens, dentre elas a detecção precoce da existência de contaminação por substâncias tóxicas (DOMINGOS, 2006). Assim como, avaliação mais realista dos efeitos dessa contaminação (JEMEC et al., 2007) e testes mais rápidos, relativamente simples e baratos, dentre os quais incluem diversos organismos e substâncias químicas aos quais os biomarcadores podem ser avaliados (MARTINS; OLIVIA TELES; VASCONCELOS, 2007).

Estudos indicam que exposições crônicas a pesticidas podem ocasionar efeitos como danos no DNA, teratogênese e câncer (ZEPEDA-ARCE et al., 2017; PAMPLONA, 2009). Os sítios mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alcali-lábeis, crosslinks e quebras resultantes de reparo por excisão (KAPCZINSKI et al., 2004). Os danos ao DNA podem ser avaliados pelo teste de Ames, teste de micronúcleos e o ensaio cometa, entre outros (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003).

3.3.1 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa é um método de eletroforese em microgel, demonstrado pela primeira vez por Rydeberg e Johanson (1978) e modificado por Singh et al. (1988) para a detecção e quantificação de quebras das fitas do DNA, em células individuais, usando microscopia e pH alcalino ($\text{pH} > 13$) (PARK; CHOI, 2007; ZAIA, 2015). O método baseia-se na lise de membranas celulares, seguida pela indução da migração eletroforética (microeletroforese) do DNA liberado em matriz de agarose (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009). A célula migrada, quando vista no microscópio, adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça, a região nuclear, e cauda, a qual contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009).

Partindo-se do princípio de que a maioria dos agentes genotóxicos induzem mais quebras em fitas simples do que em fitas duplas do DNA, a versão alcalina da técnica apresenta maior sensibilidade para a detecção da indução de danos ao DNA (TICE et al., 2000). Segundo Rojas et al. (1999), isso se dá pelo fato de que, durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e desespiralização dos sítios de rompimento da molécula do DNA.

É um biomarcador genético que se desenvolveu rapidamente e ganhou popularidade (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003; ZAIA, 2015), tornando-se amplamente utilizado como ferramenta no biomonitoramento. Segundo Gonçalves, Conceição e Resgalla-junior (2003), as vantagens deste ensaio incluem a sua simplicidade (análise de pequeno número de células), rápido desempenho, e sua

alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA em qualquer tipo de célula, desde que nucleada.

Uma desvantagem deste teste é a diversidade de métodos para quantificação do dano, podendo ser utilizado: o tamanho da cauda comparada ao núcleo, à porcentagem e intensidade de fragmentação da cauda, ou até mesmo ambas as medições (MOREIRA, 2010). Logo, a padronização do método de interpretação dos resultados é essencial para análise dos dados.

3.3.2 Atividade da acetilcolinesterase (AChE)

Acetilcolinesterase é uma enzima, pertencente à família das colinesterases, localizada no sistema nervoso central e periférico (CAVALCANTI et al., 2016), a qual apresenta um importante papel regulatório de neurotransmissão, prevenindo contínuas passagens de impulsos nervosos (SANTOS, 2009). A AChE permite a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético durante a transmissão colinérgica (JEMEC et al., 2007; OLIVEIRA, 2014).

É vital que a acetilcolina seja degradada rapidamente antes da chegada de outro impulso nervoso para garantir um normal funcionamento do sistema sensorial e neuromuscular (STENESH, 1998).

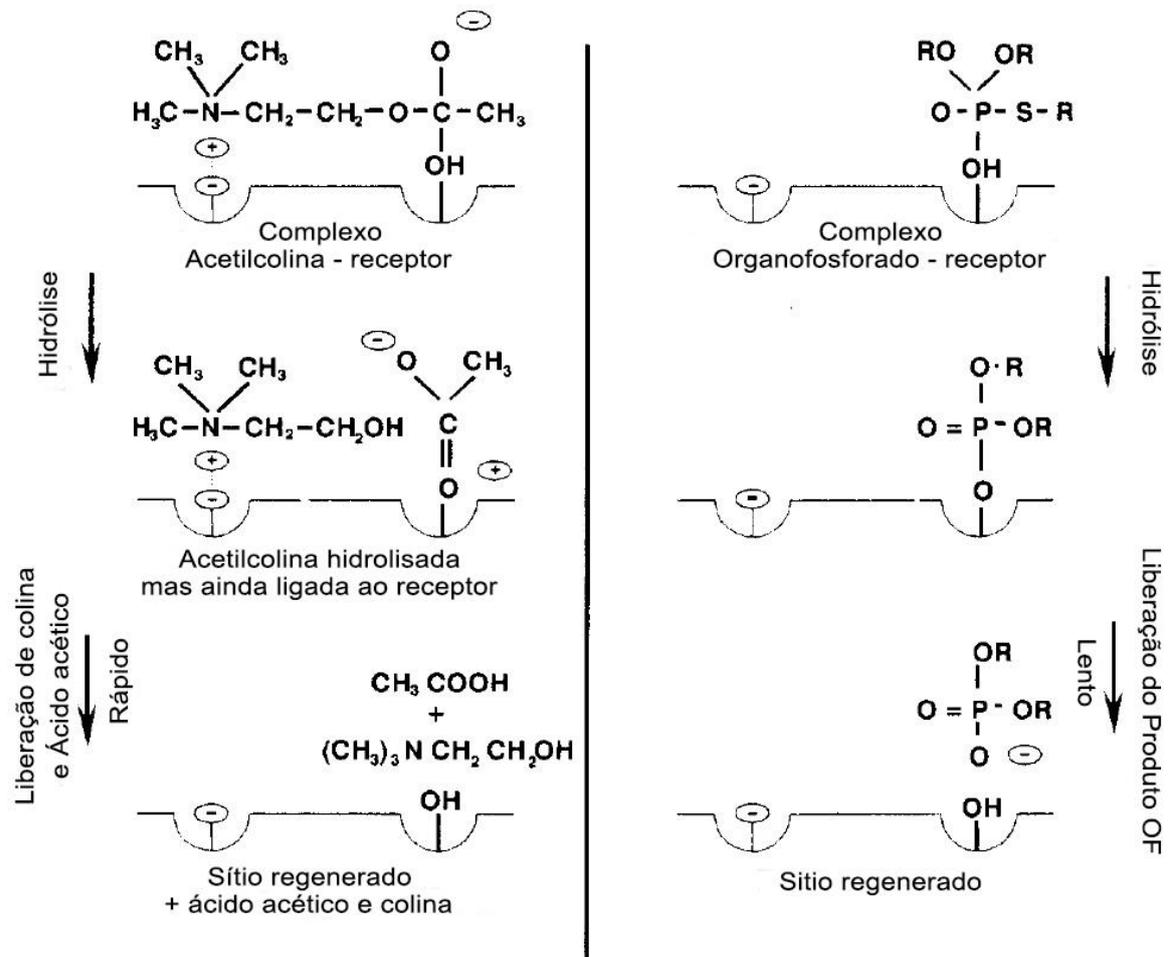
Barata; Solayan e Porte (2004) ressaltam que a AChE é a enzima alvo de pesticidas organofosforados, carbamatos e metais, os quais atuam na inibição da sua atividade. Quando inibida, a hidrólise não ocorre, resultando em acúmulo anormal de acetilcolina nos tecidos musculares (JEMEC et al., 2007). Conseqüentemente, ocorre uma grande estimulação que leva a hiperatividade, asfixia, paralisia e morte do organismo (YAWETZ et al., 1993).

Essa especificidade faz com que AChE seja amplamente utilizada como biomarcador de neurotoxicidade na avaliação de efeitos causados em organismos expostos a compostos organofosforados, carbamatos e metais (BARATA; SOLAYAN; PORTE, 2004; TOUMI et al., 2015).

O efeito sobre a AChE é considerado irreversível, pois a recuperação de sua atividade depende da desfosforilação espontânea do sítio inibido e da produção de

mais AChE, um processo que é lento (Figura 2) e por isso o organismo exposto não resiste aos efeitos da exposição (Peakall, 1992).

Figura 2. Mecanismo de inibição da AChE.



Adaptado de Peakall, 1992

3.4 *Daphnia magna* COMO ORGANISMO-TESTE

Daphnia magna (Straus, 1820), é um microcrustáceo planctônico de água doce, que mede em cerca de 5 a 6 mm de comprimento, encontrado em lagos, represas, rios e planícies inundadas (Figura 3). Sua população é composta basicamente de fêmeas, uma vez que sua reprodução é assexuada por partenogênese em condições ambientais favoráveis (KNIE; LOPES, 2004;

HECKMANN et al., 2008; ALTSHULER et al., 2011; NAGATO; SIMPSON; SIMPSON, 2016).

Figura 3. *Daphnia magna*.



Fonte: Adaptado de GARCIA, 2016.

Este organismo é indicado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas para análise da toxicidade aguda de efluentes líquidos, apresentando um papel importante na comunidade zooplanctônica, pois compõe um elo entre os níveis tróficos inferiores e superiores da cadeia alimentar de um ecossistema (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Seu manejo e cultivo, frente às condições favoráveis em laboratório são fáceis, uma vez que apresentam um ciclo de vida curto (cerca de 45 dias) e um padrão reprodutivo assexuado. Portanto, seu genótipo padrão garante uma uniformidade nos resultados de bioensaios (KNIE; LOPES, 2004).

Daphnia magna é utilizada internacionalmente pelos órgãos e institutos ambientais de diversos países pelo fato da padronização de seus bioensaios (GUILHERMINO et al., 2000). Além disto, é amplamente indicada por apresentar características significativas como abundância em meio aquático e sensibilidade a substâncias tóxicas (NAGATO; SIMPSON; SIMPSON, 2016).

O quadro 2 lista as concentrações nominais encontradas para malathion em ensaios de ecotoxicidade utilizando neonatos de *Daphnia magna*.

Quadro 2. Concentrações nominais de toxicidade aguda para malathion, utilizando-se neonatos de *D. magna*.

Expressão	Malathion	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
CE 50 (48 h)	Modelo De sona de Pesticida (PRZM)	1,0	USEPA,2009
CE 50 (24 h)	Sigma-Aldrich Pestanal 97,5%	3,8	NAGATO; SIMPSON; SIMPSON, 2016.
CE 50 (48 h)	Fyfanon 50 EC 500 g L ⁻¹	0,36	TOUMI, et al., 2015
CE 50 (24 h)	Fyfanon 50 EC 500 g L ⁻¹	0,53	TOUMI, et al., 2015

Poucos trabalhos avaliando a genotoxicidade através do ensaio cometa em *D. magna* foram encontrados na literatura (LEE; STEINERT, 2003; PARK; CHOI, 2007; LEE; KIM; CHOI, 2009; PARRELLA et al., 2015), sendo que nestes trabalhos também foram observadas diferentes metodologias, tanto quanto ao número de indivíduos utilizados quanto ao volume de tampão para homogeneização.

Guilhermino (1996), Jemec et al. (2007) e Oliveira, et al. (2015) utilizaram de 30 a 100 neonatos por teste, entre 600 μL a 800 μL de tampão fosfato.

Assim como para genotoxicidade, poucos trabalhos avaliando a atividade enzimática de acetilcolinesterase em *D. magna* foram encontrados na literatura (GUILHERMINO, 1996; JEMEC et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015; TRAC; ANDERSEN; PALMQVIST, 2016).

Guilhermino (1996), Jemec et al. (2007) e Oliveira, et al. (2015) utilizaram de 30 a 100 neonatos por teste, entre 600 μL a 800 μL de tampão fosfato e de 6.000 a 15.000 g para centrifugação dos homogeneizados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INSETICIDA MALATHION

Uma solução estoque de $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ (250 mL) foi preparada a partir do padrão analítico Malathion – Pestanal® 100 mg, Sigma-Aldrich, de massa molar igual à $330,36 \text{ g mol}^{-1}$. A dissolução da substância foi realizada em álcool etílico padrão analítico Alphatec 99,5% (REBECHI, 2012).

4.2 CULTIVO E MANEJO DE *Daphnia magna*

Os neonatos das culturas-estoque de *D. magna* foram cultivados em grupos de 50 indivíduos por béquer (2.000 mL) contendo aproximadamente 2 L de água de cultivo, meio M4 (Anexo A), preparado e mantido no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Os lotes foram mantidos em câmara de incubação, tipo BOD, climatizada a 20°C , com luminosidade de 1.000 lux e fotoperíodo de 16 horas de luz. A alimentação foi realizada diariamente com uma suspensão de células de alga da espécie *Desmodesmus subspicatus*, na concentração de 5×10^6 células de alga por *Daphnia*, aproximadamente 0,25 mL de suspensão por organismo, uma vez ao dia.

A partir da substância de referência, o cloreto de potássio (KCl), os organismos tiveram sua sensibilidade testada mensalmente, para garantia de resultados uniformizados, sendo os resultados registrados em carta-controle mantida no laboratório (Anexo B).

4.3 TESTE PRELIMINAR DE TOXICIDADE COM *Daphnia magna*

Nesse ensaio, foi analisada a maior diluição que causa imobilidade de 100% dos organismos e a menor diluição que imobiliza menos que 10%. Desta forma, otimizou-se o preparo dos testes posteriores.

O intervalo de diluição analisado foi feito com base nas concentrações de CE50 do quadro 1. A partir dos resultados desse teste preliminar, preparou-se a solução estoque de $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ (250 mL) de malathion em álcool ultrapuro.

O teste preliminar foi realizado de acordo com a metodologia da NBR 12.713, assim como o teste de toxicidade aguda com *D. magna* (ABNT, 2016). O mesmo consistiu na distribuição em grupos de dez indivíduos em recipientes contendo 25 mL, em triplicata, da amostra a ser testada. O teste teve um período de exposição de 48 horas, sendo armazenado em BOD escura com temperatura na faixa de 18 a 22°C. Após o tempo de duração do teste, foi avaliado o número de organismos imóveis por concentração testada.

4.4 TESTE DE ECOTOXICIDADE AGUDA COM *Daphnia magna*

Para o teste, as amostras foram diluídas em meio básico de cultivo (Anexo C). Os organismos-teste tinham de 2 a 26 horas de vida, e foram separados de sua cultura matriz e mantidos alimentados em um recipiente por no mínimo 2 horas antes do ensaio com as concentrações de malathion.

Os testes foram realizados em triplicata em concentrações nominais de $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ ng L}^{-1}$, $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ ng L}^{-1}$, $9,5 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$ e $4,7 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$, um controle contendo apenas água de diluição e outro com água de diluição e 235 μL de álcool ultrapuro. O controle contendo álcool foi testado para ver se a concentração do solvente não apresentaria ecotoxicidade aos organismos, assim interferindo na análise do efeito do pesticida. Os organismos foram distribuídos em grupos de dez indivíduos em recipientes contendo 25 mL da amostra a ser testada. O teste teve um período de 48 horas, armazenado em BOD escura com temperatura na faixa de 18 a 22°C. Os resultados foram expressos em CE50, concentração efetiva que causa efeito de imobilidade em 50% dos organismos, determinada através do método estatístico Probit de análise de sobrevivência, através do software Graphpad Prism 6®.

4.5 EXPOSIÇÃO SUBLETAL DE *Daphnia magna*

Após a realização dos testes de toxicidade aguda e determinação da CE50, foram selecionadas duas concentrações que não apresentaram efeito de imobilidade nos organismos durante o tempo de exposição de 48 horas. As concentrações selecionadas foram: $4,7 \cdot 10^{-4}$ ng L⁻¹ e $2,3 \cdot 10^{-4}$ ng L⁻¹ e um controle contendo apenas água de diluição e outro controle com água de diluição e 235 µL de álcool ultrapuro.

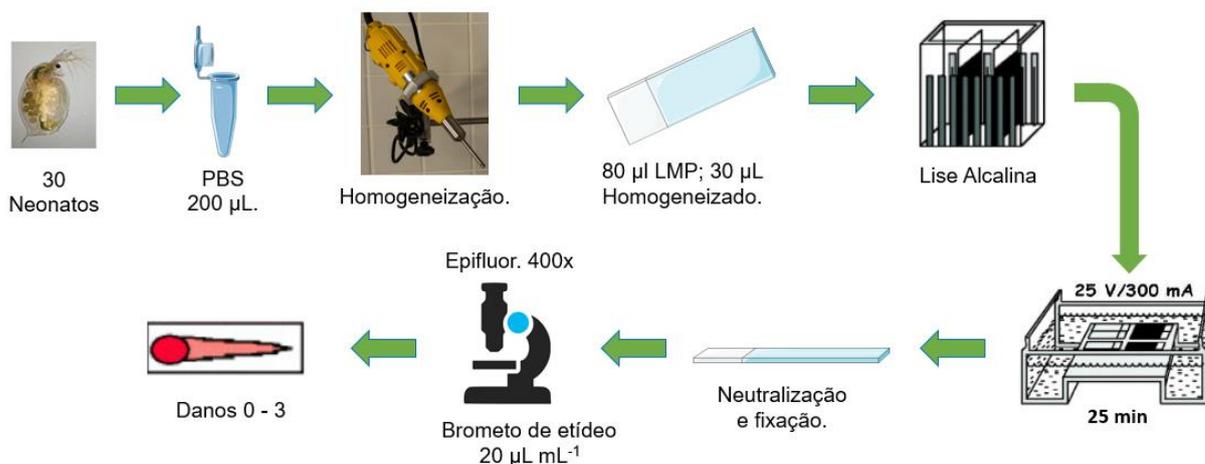
A exposição dos organismos foi realizada da mesma forma que no teste de ecotoxicidade aguda. No final do teste, os organismos móveis foram utilizados para análise dos biomarcadores ensaio cometa e avaliação da atividade da acetilcolinesterase.

4.6 ENSAIO COMETA COM *Daphnia magna*

A técnica utilizada para o teste foi a descrita por Singh et al. (1988), com algumas alterações para análise de danos ao DNA de *Daphnia magna* (PARRELLA et al., 2015 e PARK; CHOI, 2007). Anterior à montagem das lâminas, estas foram pré-cobertas por imersão em agarose normal 1,5%, aquecida e liquefeita, e deixadas secar em temperatura ambiente, sob um plano reto por 24 horas.

A figura 4 representa o esquema da metodologia do ensaio cometa com *D. magna*.

Figura 4. Metodologia do ensaio cometa utilizando-se *D. magna* como organismo teste.



A suspensão celular foi obtida após a homogeneização, em um homogeneizador rotativo de tecidos, de 30 neonatos em 200 µL tampão PBS (pH 7,4) em microtubos de centrifugação.

Em microtubos limpos, foram adicionados 80 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) 0,05% e 30 µL de suspensão celular, proveniente dos organismos desagregados. A suspensão foi adicionada sobre as lâminas previamente cobertas com agarose, e recobertas com uma lamínula e acondicionadas na geladeira por 20 minutos. Para cada concentração testada, foram obtidas 24 lâminas para análise.

Em sequência, as lamínulas foram removidas e as lâminas mantidas em uma solução de lise (2.5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris) em uma cubeta, por no mínimo 24 horas a 4°C, para remoção dos conteúdos celulares e exposição do material genético. Após isso, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese e imersas em uma solução tampão de eletroforese (NaOH 300 mM e EDTA 200 mM) (pH maior que 13), ficando em repouso nesta solução por 30 minutos e, em seguida, foi realizada a corrida eletroforética por 25 minutos, a 25 V e 300 mA, para migração do DNA (SINGH et al., 1988). Todo esse procedimento foi realizado na ausência de luz. Após eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com três banhos de solução de Tris (pH 7,5), com intervalos de 5 minutos e fixadas em etanol por 5 minutos e guardadas para posterior análise.

A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência LEICA DMLS, com aumento de 400x. Para a análise, foi adicionado 25 µl de corante brometo de etídeo (20 µl mL⁻¹) sobre as lâminas que foram analisadas. A quantificação dos danos foi realizada visualmente, com a análise de 100 nucleóides por lâmina, com as classes variando entre 0 (sem dano aparente) a 3 (DNA danificado), adaptado de Parrella et al. (2015). Para determinação dos danos, considerou-se a intensidade de fragmentação da cauda. Após análise dos danos, para cada lâmina, foi atribuído um escore. O escore (Equação 1) foi calculado através do somatório do número de nucleóides com o dano vezes o valor do dano (COLLINS et al., 1997).

Equação 1. Cálculo do escore atribuído ao dano ao DNA

$$Escore = (n \text{ classe } 0 \times 0) + (n \text{ classe } 1 \times 1) + (n \text{ classe } 2 \times 2) + (n \text{ classe } 3 \times 3)$$

Onde: n classe = total de danos classificados como 0, 1, 2 ou 3.

4.7 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (BRADFORD)

Para determinação de proteínas totais, 100 neonatos, expostos às concentrações subletais de malathion, foram homogeneizados, utilizando-se um homogeneizador de tecidos rotativo, em 400 µL de tampão fosfato (0,1 M) em pH 7,5. As soluções obtidas foram centrifugadas a 6.000 g por 6 min a 4^o C. O sobrenadante foi armazenado em ultrafreezer (OLIVEIRA et al., 2015).

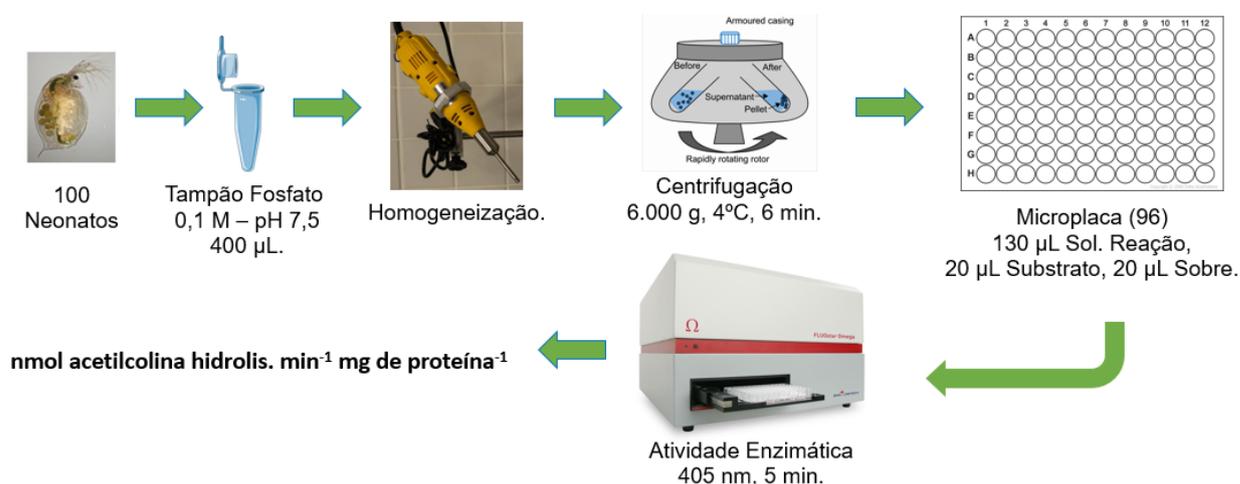
A determinação de proteínas totais seguiu o método descrito por Bradford (1976). Na microplaca, foram adicionados 10 µL do sobrenadante e 250 µL de reativo de Bradford (REBECHI, 2012). A absorbância foi lida em comprimento de onda de 595 nm e os resultados foram expressos em µg mL⁻¹ (RAMSDORF, 2011).

A concentração de proteínas totais foi utilizada para equivaler à atividade da AChE a 1 mg de proteína.

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE AChE EM *Daphnia magna*

A atividade do biomarcador foi determinada adaptando a metodologia utilizada por Guilhermino et al. (2000) adaptada para microplaca, baseado no método de Ellman et al. (1961) para *Daphnia magna*, após exposição aguda subletal a diferentes concentrações do inseticida malathion (Figura 5).

Figura 5. Metodologia do ensaio de AChE utilizando-se *D. magna* como organismo teste.



Para preparação da amostra, 100 neonatos de *D. magna*, expostos às concentrações subletais de malathion, foram homogeneizados em 400 µL de tampão fosfato (0,1 M; pH 7,5), em um homogeneizador de tecidos rotativo. Cada grupo constitui 5 *pools*, que foram analisados em triplicata, total de 15 *pools* por grupo testado. Adaptando-se de Jemec et al. (2007), os homogeneizados foram centrifugados a 6.000 g, a 4°C durante 6 min. A partir disso, 130 µL de solução de reação, composta por 13,5 mL de tampão fosfato, 500 µL do reagente DTNB (5,5-ditio-bis-2 nitrobenzoato) a 10 mM e 20 µL do substrato ATC (iodeto de acetilcolina), a 0,075 mol L⁻¹ foram adicionados a 20 µL do sobrenadante em microplaca de 96 poços.

As atividades enzimáticas foram medidas por leitura em um espectrofotômetro a 405 nm, sendo realizada leitura por 5 min após adição da

solução de reação. Os resultados foram expressos em nmol de acetilcolina hidrolisada $\text{min}^{-1} \text{mg}$ de proteína⁻¹.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A determinação da concentração efetiva que afeta 50% dos organismos-teste (CE50) foi realizada utilizando-se o *software* Graphpad Prism 6[®], a partir dos dados ecotoxicológicos obtidos através dos bioensaios de exposição aguda.

Para análise dos biomarcadores ensaio cometa e atividade da AChE, realizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis - seguido dos testes de Tukey e Student-Newman-Keuls para analisar diferenças significativas entre os grupos. Os dados foram analisados pelo *software* Graphpad Prism 6[®]. Todos os testes foram reconhecidos como estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO PRELIMINAR DE ECOTOXICIDADE

De acordo com Knie e Lopes (2004), ensaios preliminares têm como objetivo reconhecer a faixa de ação de um xenobiótico, a fim de aumentar a eficiência do ensaio. Esse tipo de bioensaio é realizado nas mesmas condições de um teste definitivo (podendo o número de organismos utilizados e o tempo de exposição ser menor) e determina a maior diluição que imobiliza 100% dos organismos e a menor diluição que imobiliza até 10% dos organismos expostos.

Neste estudo, o ensaio preliminar foi realizado com dois objetivos: conhecer a faixa de ação do composto malathion para determinação da ecotoxicidade aguda, e determinar a menor concentração em que não apresentaria imobilidade dos organismos.

Para reconhecer a ação do composto, adotou-se como maior diluição a menor CE50 (48h), presente no quadro 2, $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$ (TOUMI et al., 2015). A partir desta concentração, foi observado que a faixa de efeito de imobilização do composto para os organismos estava no intervalo: $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ ng L}^{-1}$, $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ ng L}^{-1}$, $9,5 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$ e $4,7 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$. Essa faixa de concentrações foi utilizada para determinação da CE50 (48h).

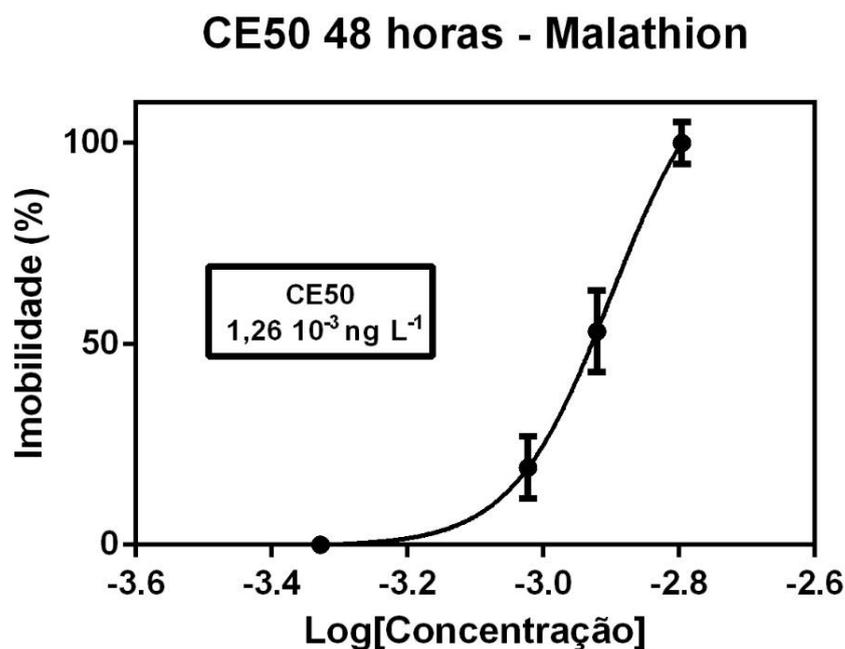
Já para determinar a menor concentração que não causou imobilidade nos organismos, o valor encontrado foi o de $4,7 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$. Assim, para realização do ensaio com os biomarcadores ensaio cometa e avaliação da atividade da acetilcolinesterase foram utilizadas as concentrações $4,7 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$ e $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$.

Nos grupos controle (água de diluição e água de diluição com 235 μL de álcool ultrapuro) não foi identificada imobilidade dos organismos.

5.2 ECOTOXICIDADE AGUDA COM *Daphnia magna*

A ecotoxicidade aguda da solução de malathion foi avaliada após exposição dos organismos por 48 horas à amostra nas concentrações: $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ ng L}^{-1}$, $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ ng L}^{-1}$, $9,5 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$ e $4,7 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$, com um controle contendo apenas água de diluição e outro com água de diluição e 235 μL de álcool ultrapuro. O ensaio foi realizado em triplicata. A CE50 (48h) encontrada após análise no programa estatístico GraphPad Prism 6 foi de $1,26 \cdot 10^{-3} \text{ ng L}^{-1} \pm 0,08 \cdot 10^{-3}$ (Figura 4).

Figura 6. CE50 (48h) para malathion. Valores de concentração normalizados para base logarítmica para melhor correlação dos valores concentração-resposta.



De acordo com a USEPA (2009), malathion é classificado como altamente tóxico para invertebrados de água doce, apresentando uma CE50 (exposição de 48h) de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Também foram registrados efeitos crônicos sobre populações de *D. magna* expostas a $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ (BARATA; SOLAYAN; PORTE, 2004). Coleone (2014), baseada na classificação de Zucker (1986), classificou o malathion como extremamente tóxico para *D. magna*, com valor de CE50 (48h) de $0,16 \mu\text{g L}^{-1}$. A

CE50 (48 h) encontrada no presente estudo foi de $1,26 \cdot 10^{-3} \text{ ng L}^{-1}$ (Tabela 3). De acordo com a classificação de Zucker (1986), este valor indica extrema ecotoxicidade, uma vez que para pesticidas organofosforados o autor confere esta categorização a valores de CE50 (48h) iguais ou inferiores a $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 3. Ecotoxicidade aguda do malathion para *D. magna*.

Composto	Exposição (Horas)	CE50 (ng L ⁻¹)	Intervalo de confiança (95%)
Malathion	48	$1,26 \cdot 10^{-3}$	$1,18 \cdot 10^{-3} < \text{CE50} < 1,34 \cdot 10^{-3}$

Os valores de concentração de efeito médio encontrados estão abaixo dos encontrados na literatura. Zagatto e Bertoletti (2006) relatam que fatores como temperatura do meio, pH, oxigênio dissolvido e dureza da água podem influenciar na ecotoxicidade aguda de um composto.

De acordo com Sten et al. (2014), que obtiveram uma CE50 de $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$ (48h), além dos fatores já citados anteriormente, a condição de cultivo e manutenção de *D. magna* também pode influenciar a ecotoxicidade de um composto, uma vez que estes organismos são sensíveis quanto ao manejo do cultivo. Desta forma, alterações no cultivo poderiam resultar em organismos mais sensíveis a exposição aguda. No entanto, sabendo-se que o ambiente natural não apresenta condições constantes, variações ambientais poderiam fazer com que baixas concentrações já afetassem os organismos sensíveis presentes no ambiente. Além do mais, de acordo com Mangas-Ramirez, Sarma e Nandini (2004), *D. magna* e *Ceriodaphnia dubia* são parte da comunidade zooplanctônica, a qual é responsável por até 80% da produção secundária de um ambiente aquático, danos e alterações a essas populações podem alterar a dinâmica de todo o ecossistema a qual elas estão presentes.

Assim como observado em nosso trabalho, Printes e Callaghan (2004) ao obterem CE50 (48h) para malathion de $9,48 \text{ pM}$ em *D. magna*, indicaram um relação dose-resposta para ecotoxicidade aguda. Portanto, com o aumento das

concentrações de malathion, espera-se maior imobilização dos organismos expostos.

Analisando-se a carta controle (Anexo B) entre os testes de sensibilidade de números 15 a 20 (Dezembro/2016 a Maio/2017), verificou-se que a sensibilidade dos organismos estava próximo da média estabelecida (707,92 mg L⁻¹ de KCl). Isso poderia indicar que os organismos não estavam mais sensíveis que o padrão quando expostos ao malathion, reforçando nossos dados de extrema toxicidade do composto ao organismo.

Sumon et al. (2016) realizaram uma análise de risco em cultivos de arroz nos quais pesticidas organofosforados são aplicados por *spray* em Bangladesh, e determinou que resíduos de malathion, clorpirifós e cipermitrina têm elevado potencial de toxicidade aguda e crônica aos invertebrados de regiões próximas aos cultivos. Halsted, Civitello e Rohr (2015) afirmam que conhecendo-se as propriedades físico-químicas de pesticidas organofosforados, pode-se prever respostas em organismos ainda não expostos a OFs para testes, facilitando análise de riscos de áreas possivelmente contaminadas.

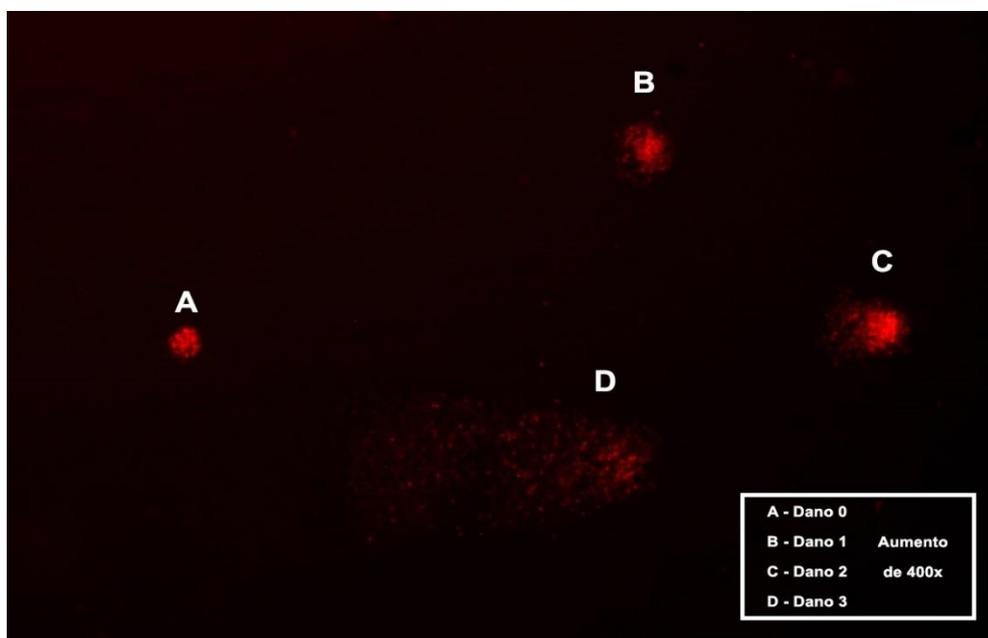
Coleone (2014) que avaliou a dissipação de malathion para o controle da dengue em São Paulo, afirma que a aplicação do pesticida para o controle do mosquito *A. aegypti* é feita principalmente no verão. Um período com maior incidência de precipitação, e maior probabilidade de escoamento de malathion para os corpos aquáticos. Desta forma afetando os organismos não-alvo presentes no ecossistema aquático.

Segundo Bownik (2017), exposições agudas ao malathion alteram o comportamento natatório de *D. magna*, afetando parâmetros como velocidade, tempo e direção de nado. O autor recomenda a utilização destes parâmetros como um biomarcador para exposições agudas de *D. magna*. Neste trabalho foi observado velocidade de nado reduzida após 48 horas de exposição dos organismos expostos às concentrações de malathion perante aos controles. No entanto, esse parâmetro foi observado visualmente apenas, mas pode ser considerado em análises futuras.

5.3 ENSAIO COMETA COM *Daphnia magna*

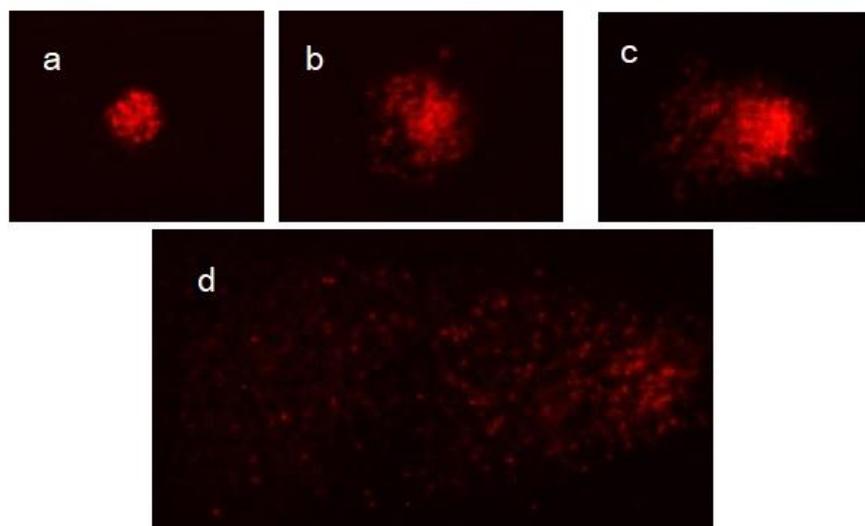
Genotoxicidade é a capacidade de uma amostra em alterar a estrutura do DNA, induzindo modificações, que podem interferir em diversos processos vitais de forma reversível ou irreversível (SILVA, 2008; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). O ensaio cometa tem um importante papel na avaliação da genotoxicidade, pois trata-se de um ensaio capaz de detectar danos e quebras na molécula de DNA provocados por uma ampla variedade de substâncias (COLLINS et al., 1997; PARRELLA et al., 2015). No presente estudo, o ensaio foi realizado em células do organismo inteiro (homogeneizado). Os danos (Figuras 5 e 6) foram determinados perante a intensidade de material fragmentado que migrou durante a eletroforese (PARRELLA et al., 2015).

Figura 7. Classificação visual dos danos (0 – 3) no material genético de *D. magna* exposta ao malathion durante 48 horas.



A – sem danos aparentes, B – poucos danos, C – danos intermediários e D – DNA danificado.

Figura 8. Danos individualizados.

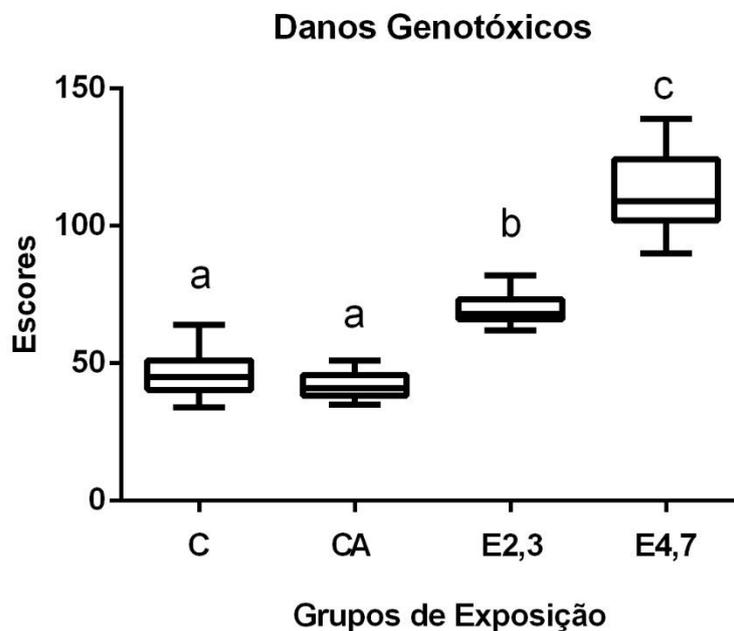


Onde, a – dano 0, b – dano 1, c – dano 2 e d – dano 3.

Para análise, foram avaliadas 24 lâminas por grupo de exposição, com a contabilização de 100 nucleóides por lâmina (Apêndice A). Após a análise dos danos, foi atribuído um escore para cada lâmina (Equação 1). Com o cálculo dos escores, foi obtida a mediana de cada grupo exposto. A figura 7 apresenta as medianas para cada grupo.

A partir dos resultados, foi observado que o material genético de *D. magna* apresentou maior índice de danos nas duas concentrações de malathion testadas ($2,3 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$ e $4,7 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$) comparando-se com os controles. Diferenças significativas entre os grupos de exposição ($p = 0.0027$) foram determinadas através do teste de Tukey indicando boa relação dose-resposta do organismo perante o composto (PARRELLA et al., 2015). Os grupos exposição também apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos controles ($p < 0,0001$), após análise através do pós-teste Student-Newman-Keuls. Os grupos controle (C) e controle com álcool (CA) não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,2071$), e o grupo exposto ao álcool não apresentou efeito genotóxico, reforçando a validação do ensaio.

Figura 9. Medianas obtidas a partir dos escores de dano.



C: Grupo controle. **CA:** Controle mais Álcool. **E2,3:** exposição $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$. **E4,7:** exposição $4,7 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatística significativa após o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Derarfield et al. (1993), analisaram pesticidas organofosforados e observaram a capacidade destes de apresentarem propriedades mutagênicas *in vitro* e *in vivo*. Compostos organofosforados são agentes alquilantes e podem causar a fosforilação do DNA (RAHMAN et al., 2002). Lee, Kim e Choi (2009), avaliando a nanotoxicidade de dióxido de titânio através de ensaio cometa com *D. magna*, ressaltam que pelo fato do organismo ser filtrador e apresentar maior área de contato com os compostos, torna-se mais suscetível à intoxicação. Em nosso trabalho, verificamos que, mesmo em concentrações muito baixas, o malathion apresentou capacidade de promover danos genotóxicos nas células de *D. magna*. Na literatura, dados relacionados à genotoxicidade do malathion e outros organofosforados são inconclusivos e muitos obtidos *in vitro*, ressaltando a importância de estudos com organismos *in vivo* (GIRI et al., 2002; BARCELOS et al., 2007; KUMAR et al., 2010).

Blasiak et al. (1999), analisaram uma solução pura de malathion e determinou que o Malaoxon, metabólito do malathion formado por oxidação (GIRI et

al., 2002), foi responsável pelo aumento significativo de material genético migrado durante o ensaio cometa em linfócitos humanos. Os autores ressaltaram que a taxa de reparo do material genético decaiu devido a ação do metabólito, inviabilizando até 80% das células, em concentrações de 8 a 66 $\mu\text{g mL}^{-1}$. É sabido que danos genotóxicos podem ser reparados (LEE; STEINERT, 2003), no entanto, poderia ser proposto que o malathion e seu metabólito podem vir a prejudicar esse processo também em invertebrados de água doce em concentrações baixas.

Segundo Lee, Kim e Choi (2009), estudos de genotoxicidade são amplamente estabelecidos em sua maioria com células derivadas de peixes e larvas de mosquito (BRESOLA, 2007; DOMINGOS, 2006; GHELFI, 2014; PAMPLONA, 2009; REBECHI, 2012; SANTOS, 2009), assim os autores reforçam a utilização de invertebrados aquáticos como a *D. magna* para ensaios de genotoxicidade. Segundo os autores, ensaios com esses organismos expostos a nanopartículas e pesticidas podem analisar a sensibilidade das espécies perante uma grande gama de contaminantes. Como visto em nosso estudo, os neonatos de *D. magna* demonstram elevada sensibilidade ao malathion, e mesmo em concentrações muito baixas apresentaram danos em seu DNA.

De acordo com Depledge (1998), mesmo sabendo-se que poluentes podem causar danos ao material genético de populações, a detecção e relevância ecológica desses resultados ainda é de difícil obtenção. No entanto, a detecção de danos ao DNA e genotoxicidade *in vivo* é necessária, pois quanto maior a presença de compostos capazes de induzir alterações no DNA, maiores são os riscos para saúde humana e ao meio ambiente (PARK; CHOI, 2007).

5.3.1 Metodologias de ensaio cometa com *D. magna*

Em relação ao ensaio cometa com *D. magna*, mesmo com as metodologias encontradas na literatura sendo baseadas em Singh et al. (1988), elas apresentam muitas variações, como pode ser visto na tabela 4.

Tabela 4. Variações de parâmetros nas metodologias de ensaio cometa utilizando-se *D. magna* como organismo teste.

Autores	Neonatos	Eletroforese	PBS	Centrifugação	Células Analisadas	Danos
Parrela, et al. 2009	20	400 mA 20 min	1 mL	Não	50	0 a 3
Park e Choi 2007	15	300 mA 25 min	1 mL	Não	50	0 a 3
Lee, Kim, Choi 2009	150	300 mA 25 min	1 mL	Não	50	0 a 4
Knapik 2018	30	300 mA 25 min	200 µL	Não	100	0 a 3

Parrela et al. (2009) realizaram corrida eletroforética a 400 mA por 20 min, enquanto Park e Choi (2007) utilizaram 300 mA por 25 min. O número de organismos também variou entre os autores citados anteriormente, sendo 20 e 15 neonatos em 1 mL de PBS sem centrifugação, respectivamente. Já Lee, Kim e Choi (2009) analisaram 150 neonatos (1 mL de PBS sem centrifugação) e realizaram corrida em 300 mA por 25 min. Todos os autores citados avaliaram 50 células por lâmina, porém Parrela et al. (2009) e Park e Choi (2007) classificaram os danos de 0 a 3, enquanto Lee, Kim e Choi (2009) trabalharam com danos variando de 0 a 4.

Nosso trabalho teve como base essas metodologias, sendo elas testadas individualmente e suas variações. Obtivemos os melhores resultados quando trabalhando com os parâmetros: homogeneização de 30 neonatos em 200 µL de PBS, sem centrifugação; corrida eletroforética em 300 mA, 25 V por 25 min e classificação de danos de 0 a 3. Isso demonstra que a metodologia do ensaio cometa em *D. magna* ainda necessita ser explorada para padronização dos ensaios e possibilidade de melhores comparações entre estudos.

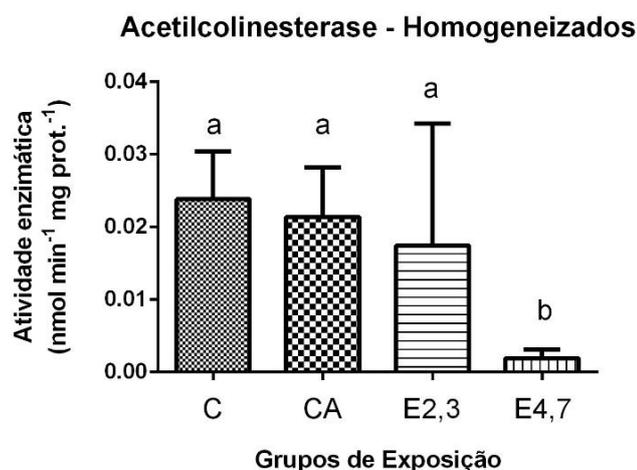
5.4 ATIVIDADE DE ACETILCOLINESTERASE EM *Daphnia magna*

Primeiramente, os dados obtidos foram analisados para terem sua normalidade testada pelos testes: Anderson-Darling, Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk e Ryan-Joiner, e como resultado os dados não apresentaram-se normais. Por esta razão foi utilizado o teste Kruskal-Wallis para análise estatística dos resultados.

O teste tem como princípio detectar o 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina e o 5-tio-2-nitrobenzoato formados pela reação entre a tiocolina e o DTNB a 405 nm. Sendo assim possível calcular e comparar a atividade da AChE nos organismos (ELLMANN et al., 1961). Segundo Printes e Callaghan (2004) estudos sobre neurotoxicidade em *D. magna* e outros invertebrados aquáticos ainda são pouco explorados.

Foi observada diferença significativa ($p = 0,0001$) na atividade da enzima acetilcolinesterase entre os neonatos dos grupos controle quando comparados aos expostos à concentração de $4,7 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$. Por outro lado, a atividade enzimática nos organismos expostos à concentração de $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$ não apresentou diferença estatística em comparação aos controles (Figura 8).

Figura 10. Atividade enzimática da acetilcolinesterase em *D. magna*.



C: Grupo controle. **CA:** Controle mais Álcool. **E2,3:** exposição $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$. **E4,7:** exposição $4,7 \cdot 10^{-4} \text{ ng L}^{-1}$. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

A inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase é reconhecida pela ação de pesticidas organofosforados, fármacos e tensoativos e poluentes de misturas complexas (RAMSDORF, 2011; OLIVEIRA et al., 2015). De acordo com Cavalcanti et al. (2016), a maior dificuldade em encontrar um antídoto para reverter o efeito causado por organofosforados sobre a AChE é que o mecanismo de ativação e inibição da enzima difere tanto em tecidos e órgãos, quanto ao tipo de composto. Assim, não é possível ser feita uma predição de como o organismo exposto responderá à exposição.

Phan et al. (2017) avaliaram os efeitos do malathion sobre o crustáceo *Cherax destructor*, e observaram que concentrações subletais, como as empregadas em nosso estudo, apresentaram efeito sobre a atividade da AChE. Segundo o autor, os organismos levaram 14 dias para apresentarem um bom processo de regeneração do sítio de reação da enzima, o que demonstra o quão lento é o processo de regeneração após exposição a OF (PEAKALL, 1992).

Os valores médios de atividade de AChE de cada grupo de homogeneizados podem ser vistos na Tabela 4. Esses valores estão abaixo dos reportados por Guilhermino et al. (2000), que variaram de 8,25 a 8,90 nmol min⁻¹ mgprot⁻¹ para os grupos controle, e 0,72 nmol min⁻¹ mgprot⁻¹ para neonatos de *D. magna* expostos a agentes surfactantes. Toumi et al. (2015) reportou valores de 4,44 nmol min⁻¹ mgprot⁻¹ para grupos controles e 2,86 nmol min⁻¹ mgprot⁻¹ para grupos de *D. magna* expostos a 0,55 µg L⁻¹ de deltametrina. Os autores ressaltam que variações de resultados entre estudos, que mesmo utilizando as mesmas condições de cultivo, deve-se a sensibilidade dos organismos expostos e a fatores como bioacumulação e biotransformação dos compostos testados.

Tabela 5. Valores médios da atividade de AChE para cada grupo de exposição.

Grupos	Atividade Média - AChE (nmol min⁻¹ mgprot⁻¹)	Desvio Padrão
C	0,0238	0,0065
CA	0,0214	0,0067
E2,3	0,0174	0,0068
E4,7	0,0014	0,0013

Trac, Andersen e Palmqvist (2016) expuseram, por 48 horas, neonatos de *D. magna* a $15 \mu\text{L}^{-1}$ de malathion e observaram redução na atividade de AChE ($p < 0,0001$) dos neonatos expostos. Exposições agudas apresentam danos maiores sobre a atividade enzimática do que exposições crônicas a menores concentrações (PRINTES; CALLAGHAN, 2004). Isso pode estar relacionado à capacidade de regeneração do sítio ativo, um processo lento (PEAKALL, 1992; TRAC; ANDERSEN; PALMQVIST, 2016), portanto mais improvável de ocorrer em exposições agudas a altas concentrações.

Printes e Callaghan (2004) observaram uma relação direta entre o aumento da concentração de pesticidas em solução e aumento na inibição de neonatos de *D. magna* e diminuição de até 20% da mobilidade dos organismos expostos. Como citado anteriormente, em nosso trabalho também foi percebida diminuição na mobilidade dos organismos expostos às concentrações de malathion em comparação aos controles, e também diminuição na atividade enzimática na maior concentração testada.

O estudo da neurotoxicidade e utilização de biomarcadores bioquímicos, como a AChE em invertebrados aquáticos é de suma importância para identificação de compostos anticolinérgicos presentes no meio. Porém, estudos afirmam que relacionar a diminuição de mobilidade diretamente com a redução da atividade de AChE precisa ser melhor explorada, uma vez que a atividade desta enzima é variável entre tecidos e entre organismos (PEAKALL, 1992) e que outros fatores ambientais devem ser levados em conta (BOCQUENE; GALGANI, 1991; PRINTES; CALLAGHAN, 2004).

Mesmo com essa ressalva, estudos (BOCQUENE; GALGANI, 1991; PRINTES; CALLAGHAN, 2004; TRAC, ANDERSEN; PALMQVIST, 2016), assim como este, observam uma relação aparente entre os organismos invertebrados estarem com a mobilidade diminuída e resultados de inibição enzimática nos mesmos quando comparados aos controles. Isto gera uma discussão sobre estabelecer ou não uma relação dose-resposta para AChE, assim como é feito em testes de ecotoxicidade aguda com *D. magna* (PRINTES; CALLAGHAN, 2004).

5.4.1 Metodologias de AChE utilizando *D. magna* como organismo teste

Assim como com o ensaio cometa utilizando *D. magna*, o ensaio para avaliar a atividade de AChE não apresenta uma metodologia estabelecida, diferentemente dos trabalhos que empregam vertebrados (PRINTES; CALLAGHAN, 2004), existindo portanto, estudos com diferentes parâmetros e procedimentos, mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Variações de parâmetros nas metodologias de AChE utilizando-se *D. magna* como organismo teste.

Autores	Neonatos	Tampão	Centrifugação
Guilhermino, 1996	30	800 µL pH 7,5	12.000 g, 20 min, 4°C
Jemec et al., 2007	70 - 100	600 µL pH 7	15.000 g, 15 min, 4°C
Oliveira et al., 2015	40	800 µL pH 7,2	6.000 g, 3 min, 4°C
Knapik, 2018	100	400 µL pH 7,5	6.000 g, 6 min, 4°C

Guilhermino (1996) utilizou 30 neonatos em 800 µL de tampão fosfato (pH 7,5), com centrifugação a 12.000 g por 20 min a 4°C. Já Jemec et al. (2007) utilizaram 70 a 100 neonatos para cada *pool* homogeneizado em 600 µL de tampão fosfato (pH 7,0), com centrifugação a 15.000 g por 15 min a 4°C. Oliveira et al. (2015) utilizaram 40 neonatos em 800 µL de tampão fosfato (pH 7,2) com centrifugação a 6.000 g por 3 min a 4°C. Em nosso trabalho, estas metodologias e variações foram testadas, sendo que obtivemos resultados com 100 neonatos em 400 µL de tampão fosfato (pH 7,5) com centrifugação a 6.000 g por 6 min a 4°C.

Esses resultados indicam que a metodologia para análise de biomarcadores envolvendo *D. magna* como organismo teste ainda deve ser mais estudada para que se obtenha uma padronização dos métodos e melhor comparação entre estudos.

6 CONCLUSÕES

Durante o período analisado, os organismos demonstraram elevada sensibilidade ao inseticida organofosforado malathion, desde os ensaios preliminares.

Os dados de CE50 obtidos estão muito abaixo dos valores apresentados na literatura e também são inferiores às concentrações determinadas nos ambientes naturais. Entretanto, através da análise do ensaio cometa, verificamos que mesmo em concentrações muito baixas desse composto, os organismos possam estar sendo prejudicados em exposições por curtos períodos de tempo. Os controles utilizados não apresentaram imobilidade, estando assim, o teste validado.

No ensaio cometa, o malathion apresentou capacidade de causar danos ao DNA de *D. magna*. Os grupos controle não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), já os grupos de exposição diferiram estatisticamente tanto entre si, quanto aos controles ($p < 0,05$).

O protocolo do ensaio cometa para *Daphnia magna*, utilizado em nosso trabalho foi desenvolvido e implementado no Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR, fazendo parte integrante dos ensaios de rotina executados pelo laboratório.

Na análise da atividade do biomarcador bioquímico acetilcolinesterase, foi observada diferença significativa entre a maior concentração de exposição perante os controles ($p < 0,05$), o que poderia sugerir inibição da ação da enzima em baixas concentrações de exposição.

Entretanto, ressalta-se a importância da padronização destes ensaios utilizando *Daphnia magna* como organismo teste, uma vez visto que as metodologias e parâmetros avaliados variam entre os trabalhos encontrados na literatura.

REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for malathion**. U.S. Public Health Service, 2003.

ALTSHULER, I.; DEMIRI, B., XU, S.; CONSTANTIN, A.; YAN, N.D.; CRISTESCU, M.E. An integrated multi-disciplinary approach for studying multiple stressors in freshwater ecosystems: *Daphnia* as a model organism. **Integrative and Comparative Biology**, v. 51, p. 623–633, 2011.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum***. 2003. 135 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT. **NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)** Rio de Janeiro, 2016.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A. A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 340p, 2003.

BARATA, C.; SOLAYAN, A.; PORTE, C. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 125-139, 2004.

BLASIAK, J.; JALOSZYNSKI, P.; TRZECIAK, A.; SZYFTER, K. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. **Mutation Research**. v. 445, p. 275-283, 1999.

BOCQUENE, G; GALGANI, F. Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and phosalone: Choice of a method for detecting effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 22, p. 337-344, 1991.

BOWNIK, A. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 601-602, p. 194-205, 2017.

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

BRESOLA, R.C. **Avaliação de toxicidade de mananciais em áreas degradadas pela mineração com a utilização do bioindicador *Scenedesmus subspicatus* e implementação de metodologia de toxicidade com peixe *Danio rerio* popular “zebrafish”**. 2007, 69 f. Monografia (Engenharia Ambiental) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.

BRIANEZI, G. S.; CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do Cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

CAVALCANTI, L. P. A. N.; AGUIAR, A. P.; LIMA, J. A.; LIMA, A. L. S. Intoxicação por organofosforados: tratamento e metodologias analíticas empregadas na avaliação da reativação e inibição da acetilcolinesterase. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 739-766, 2016.

CHAMBERS, J.E.; BOONE, J.S.; CARR, R.L.; CHAMBERS, H.W.; STRAUS, D.L. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. **Human and Ecological Risk Assessment**. v. 8, p. 165–176, 2002.

COLEONE, C. C. **Avaliação da dissipação do inseticida malation utilizado em nebulização a ultrabaixo volume no controle da dengue: avaliação ecotoxicológica e de risco ambiental**. 2014, 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

COLLINS A., DUSINSKÁ M., FRANKLIN M., SOMOROVSKÁ M., PETROVSKÁ H., DUTHIE S., FILLION L., PANAYIOTIDIS M., RASLOVÁ K., VAUGHAN N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications, **Environmental and Molecular Mutagenesis**. Vol. 30 (2), P139–146, 1997.

COLLINS, A.; DOBSON, V. L.; DUSINSKA, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**. v. 375. p. 183-193, 1997.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA 430/11 – **Resolução CONAMA 430 de 13 de maio de 2011**. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <www.mma.gov.br>. Acesso em: 22 Abr. 2016.

DAMÁSIO, J. et al. Biochemical mechanisms of resistance in *Daphnia magna* exposed to the insecticide fenitrothion. **Chemosphe**, v. 70, p. 74-82, 2007.

DE DEUS, R. M.; BAKONYI, S.M.C. O impacto da agricultura sobre o meio ambiente. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v.7, nº 7, p. 1306-1315, 2012.

DEARFIELD, K. L.; STACK, H. F.; QUEST, J. A., WHITING, R. J.; WATERS, M. D. A survey of EPA/OPP and open literature data on selected pesticide chemicals tested for mutagenicity. **Mutation Research**. v. 297, p. 197-233, 1993.

DE DEUS, R. M.; BAKONYI, S.M.C. O impacto da agricultura sobre o meio ambiente. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, V.7, nº 7, p. 1306-1315, 2012

DEPLEDGE, M. H. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. **Mutation Research**, v. 23, p. 109-122, 1998

DOMINGOS, F. X. V. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes.** 2006, 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

DOS SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DA COSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química nova**, v. 30, n. 1, p. 159-170.

ELLMANN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemistry Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FARENHORST, A.; ANDRONAK, L. A.; MCQUEEN, R. D. A. Bulk Deposition of Pesticides in a Canadian City: Part 2. Impact of Malathion Use Within City Limits. **Water Air and Soil Pollution**, v. 226, n. 3, 2015.

GARCIA, D. **Daphnia magna**. Fotografia, colorida. Disponível em: < <http://www.aquarium-kosmos.de/inhalt/57/> > Acessado em: 24 de Abr. 2016.

GHELFI, A. 2014. **Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes Rhamdia quelen.** 72 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GONÇALVES, L.M.; CONCEIÇÃO, M.B.; RESGALLA-JUNIOR, C. Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açu e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão *Perna perna* através do Ensaio do Cometa. In: **II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**, Itajaí, SC. Livro de Resumos. Vol.1. Itajaí: UNIVALI, p 384, 2003.

GUILHERMINO, L., LOPES, M.C., CARVALHO, A.P., SOARES, A.M.V.M. Acetylcholinesterase activity in juveniles of *Daphnia magna* Straus. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 57, p. 979–985, 1996.

GUILHERMINO, L.; LACERDA, M. N.; NOGUEIRA, A. J. A.; SOARES, A. M. V. M. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. **The Science of the Total Environment**, V. 247, p. 137-141, 2000.

GOMES, W. **Uso de inseticida (organofosforado) no combate à dengue e os possíveis danos à saúde pública na área urbana de Foz do Iguaçu-PR.** 2014. 42f. Monografia para Especialista na Pós-Graduação em Gestão Ambiental em Municípios. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. 2014

HALSTED, N. T.; CIVITELLO, D. J.; ROHR, J. R. Comparative toxicities of organophosphate and pyrethroid insecticides to aquatic macroarthropods. **Chemosphere**, v. 135, p. 265-271, 2015.

HECKMANN, L.; SIBLY, R.M.; CONNON, R.; HOOPER, H.L.; HUTCHINSON, T.H.; MAUND, S.J.; HILL, C.J.; BOUETARD, A.; CALLAGHAN, A. Systems biology meets stress ecology: linking molecular and organismal stress responses in *Daphnia magna*. **Genome Biology**, v. 9, p. 40.0-40.13, 2008.

HONGCUI, L.; BINGQIANG, Y.; SHAONAN, L. Altered quantities and in vivo activities of cholinesterase from *Daphnia magna* in sub-lethal exposure to organophosphorus insecticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 118-125, 2012.

JEMEC, A; DROBNE, D; TISLER, T; TREBSE, P; ROS, M; SEPCIC, K. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 144, p. 303-309, 2007.

KAPCZINSKI, F.; SANTIN A.; ANDREAZZA, A.C.; FREY, N.B.; ERDTMANN, B.; CERESER, M.M.K.; SALVADOR, M.; ROMBALDI, F.; COSTA, C.S. **Avaliação de Danos Oxidativos ao DNA de Pacientes Portadores de Transtorno do Humor Bipolar em Comparação com Controles Comunitários**, p 1-2., 2004.

KAPKA-SKRZYPCZAK, L. et al. Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure - state of the art. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 18, n. 2, p. 294-303, 2011.

KIM, S.; PARK, M. Y.; KIM, H. J.; SHIN, J. Y.; KO, K. Y.; KIM, D. G.; KIM, M.; KANG, H. G.; SO, B.; PARK, S. W. Analysis of Insecticides in Dead Wild Birds in Korea from 2010 to 2013. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 25-30, Jan 2016.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. FATMA, Florianópolis, 288 p., 2004.

KUMAR, R; NAGPURE, N. S; KUSHWAHA, B; SRIVASTAVA, S. K, LAKRA, W. S. Investigation of the Genotoxicity of Malathion to Freshwater Teleost Fish *Channa punctatus* (Bloch) Using the Micronucleus Test and Comet Assay. **Environmental Contamination and Toxicology**. v. 58, p. 123-130, 2010.

LAN, P. K. S. & GRAY, J. S. Predicting effects of toxic chemicals in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin.**, v.42 (3), p. 169-173, 2003.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**. v. 544, p. 43-64, 2001

LEE, S.W; KIM, S. M.; CHOI, J. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.28, p. 86-91, 2009.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v. 12, n. 3, p. 355-381. 2008.

MALEKMOHAMMADI, M.; GALEHDARI, H. Target site insensitivity mutations in the AChE enzyme confer resistance to organophosphorous insecticides in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 126, p. 85-91, 2016.

MANGAS-RAMIREZ, E.; SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) density and ammonia concentration on the population dynamics of *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macropoda* (Cladocera). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 216-222, 2004.

MARTINS, J.; OLIVIA TELES, L. VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. **Environment International**, v. 33, p. 414-425, 2007.

MOREIRA L.L. **Avaliação Ecotoxicológica Preliminar De Efluentes Contendo Brometo De Etídeo**. 2010. 33 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2010.

NAGATO, E. G.; SIMPSON, A. J.; SIMPSON, M. J. Metabolomics reveals energetic impairments in *Daphnia magna* exposed to diazinon, malathion and bisphenol-A. **Aquatic Toxicology**. v. 170, p. 175-186, 2016.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER (NPIC). **Malathion – Technical fact sheet**. Oregon State University. 17p. 2010.

OLIVEIRA, L. L. D. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos**. 2014, 279 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

OLIVEIRA, L. L. D; ANTUNES, S. C.; GONÇALVES, F.; NUNES, B. Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 119, p. 123-131, 2015.

PAMPLONA, J. H. **Avaliação dos Efeitos Tóxicos da Dipirona Sódica em Peixe Rhamdia Quelen: Estudo Bioquímico, Hematológico e Histopatológico**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PARRELLA, A.; LAVORGNA, M.; CRISCUOLO, E.; RUSSO, C.; ISIDORI, M. Eco-genotoxicity of six anticancer drugs using comet assay in daphnids. **Journal of Hazardous Materials**. v. 286, p. 573-580, 2015.

PARK, S. Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environmental International**. V. 33, p. 817-822, 2007.

PEAKALL, D. **Animal biomarkers as pollution indicators**. Editora Chapman & Hall, Londres. 37p., 1992.

PHAN, B.; MIRANDA, A.; ALLINSON, G.; NUGEGODA, D. Evaluating the non-lethal effects of organophosphorous and carbamate insecticides on the yabby (*Cherax destructor*) using cholinesterase (AChE, BChE), Glutathione S-Transferase and ATPase as biomarkers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, p. 283-288, 2017.

PÍCOLI, M. E. F. S **Uma abordagem proteômica na identificação do citocromo P450 em *Prochilodus scrofa*: uma nova ferramenta em ensaios ecotoxicológicos**. 2004, 143 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

PRINTES, L. B.; CALLAGHAN, A. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 1241-1247, 2004.

RAHMAN, M. F.; MAHBOOB, M.; DANADEVI, K.; BANU, B. S.; GRIVER, P. Assessment of genotoxic effects of chloropyrifos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. **Mutation Research**. v. 516, p. 139-147, 2002.

RAMSDORF, W. **Avaliação da Toxicidade dos compostos Fipronil, Nitrato de Chumbo e Naftaleno em Peixes**. 2011. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

REBECHI, D. **Efeitos ecotoxicológicos em *Chironomus sanctiparoli* Strixino & Strixino, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) expostos ao Malathion**. 2012. 85f Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ROCHA, C. A. M.; CUNHA, L. A.; PINHEIRO, R. H. S.; ALMEIDA, V. H. C.; SAGICAJUNIOR, J. C.; SOUZA, Y. S. R.; MORAES, L. S. Avaliação da genotoxicidade através do ensaio cometa em *Aequidens tetramerus* (Perciformes: Cichlidae) expostos ao metilmercúrio. **Anais do 55º Congresso Brasileiro de Genética**. Águas de Lindóia, SP. 2009.

ROJAS, J.R., TRIEVEL, R.C., ZHOU, J., MO, Y., LI, X., BERGER, S.L., ALLIS, MARMORSTEIN, R. Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. **Nature** v. 401, p. 93–98, 1999.

ROSSI, S.C. **Estudo ecotoxicológico da exposição ao chumbo e à nanopartícula de dióxido de titânio em *Hoplias malabaricus***. 2013, 100 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SALER, S.; SAGLAN, N. Acute toxicity of Malathion on *Daphnia magna* Straus, 1820. **Journal of Biological Sciences**. v.5, p. 297-299, 2005.

SANTOS, P. I. M. **Avaliação da toxicidade aguda do inseticida metomil e seu efeito sobre a atividade da acetilcolinesterase do peixe *Danio rerio***. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos no paraná**. Curitiba, 2013.

SHAONAN, L.; YAJUN, T. Hormetic response of cholinesterase from *Daphnia magna* in chronic exposure to triazophos and chlorpyrifos. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23(5), p. 852-859, 2011.

SILVA, P. S. **Avaliação da toxicidade e genotoxicidade das águas do rio criciúma (sc) utilizando como organismos bioindicadores *Artemia* sp., *Daphnia magna* e *Allium cepa***. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas UNESC, 2008.

SINGH, N. P.; MACCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, p. 184-191, 1988.

STENESH, J. **Biochemistry**. Editora Plenum, Nova Iorque. 568 p., 1998

SUMON, K. A.; RICO, A.; HORST, M. M. S. T.; BRINK, P. J. V.; HAQUE, M. M.; RASHID, H. Risk assessment of pesticides used in rice-prawn concurrent systems in Bangladesh. **Science of The Total Environment**, v. 568, p. 498-506, 2016.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TOUMI, H.; BOUMAIZA, M.; MILLET, M.; RADETSKI, C. M.; FELTEN, V. FÉRARD, J. F. Investigation of differences in sensitivity between 3 strains of *Daphnia magna* (crustacean Cladocera) exposed to malathion (organophosphorous pesticide). **Journal of Environmental Science and Health**, v. 50, p. 34-44, 2014.

TOUMI, H.; BOUMAIZA, M.; MILLET, M.; RADETSKI, C. M.; FELTEN, V. FÉRARD, J. F. Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure?. **Chemosphere**, v. 120, p. 351-356, 2015.

TRAC, L. N.; ANDERSEN, O.; PALMQVIST, A. Deciphering mechanisms of malathion toxicity under pulse exposure of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, p. 394-403, 2016.

U.S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Reregistration Eligibility Decision (RED) for Malathion Revised**. U.S, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC, 2009.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Malathion in Drinking Water**. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. 2004

YAWETZ, A.; MANELIS, R; GASITH, A. Cholinesterase enzymatic profiles and the exposure of fish to organophosphorous and carbamate pesticides in Israel. **Wat. Sci. Tech**, V.27, p. 465-472, 1993

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos. 464 p., 2006.

ZAIA, M. G. **Efeito da *Mentha peperita* L. durante a infecção experimental por *Schistosoma mansoni***. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

ZENG, H.-H; LEI, C. W; ZHANG, Y. H; CAO, Y; LIU, Z. T. Prediction of the joint toxicity of five organophosphorus pesticides to *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 10, p. 1870-1877, 2014.

ZEPEDA-ARCE, R.; TRINIDAD, A. B.; DIAZ, I. M. M.; OCHOA, I. H.; GARCIA, A. E. R.; MORENO, J. F. H., VIVANCO, B. S. B.; HEREDIA, M. J. S.; VILLEGAS, G. P.; HERNANDEZ, Y. Y. B., Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid pesticides. **Environmental Toxicology**. v. 32, p. 1754-1764, 2017.

ZUCKER, E. **Hazard evaluation division standard evaluation procedure ecological risk assessment**. EPA, Estados Unidos, 1986.

APÊNDICE A

Classes de danos de 2400 células analisadas, por grupo de exposição.

Grupos	Classe de Dano				Total	Escore	Mediana
	0	1	2	4			
C	62	35	1	2	100	43	47,50
	66	29	4	1	100	40	
	60	32	6	2	100	50	
	44	50	4	2	100	64	
	60	37	1	2	100	45	
	57	36	6	1	100	51	
	50	45	4	1	100	56	
	62	32	5	1	100	45	
	50	44	4	2	100	58	
	56	39	3	2	100	51	
	51	47	1	1	100	52	
	59	35	3	3	100	50	
	59	34	5	2	100	50	
	58	35	4	3	100	52	
	68	30	2	0	100	34	
	59	38	2	1	100	45	
	62	36	1	1	100	41	
	62	34	3	1	100	43	
	66	30	3	1	100	39	
	65	32	2	1	100	39	
61	35	3	1	100	44		
66	30	3	1	100	39		
62	34	3	1	100	43		
62	36	2	0	100	40		
CA	56	40	3	1	100	49	45,50
	60	38	2	0	100	42	
	55	41	2	2	100	51	
	62	37	1	0	100	39	
	66	32	2	0	100	36	
	55	41	3	1	100	50	
	63	34	2	1	100	41	
	61	38	1	0	100	40	
	60	38	2	0	100	42	
	65	33	1	1	100	38	
	69	28	2	1	100	35	
	66	30	2	2	100	40	
	67	30	3	0	100	36	
	64	32	3	1	100	41	
	62	36	1	1	100	41	
	66	32	1	1	100	37	
	58	40	1	1	100	45	
	58	38	3	1	100	47	
	62	32	4	2	100	46	
	63	33	3	1	100	42	
59	35	4	2	100	49		
63	35	2	0	100	39		
65	33	2	0	100	37		
62	36	2	0	100	40		

C: Grupo controle. CA: Controle mais Álcool. E2,3: exposição 2,3 10⁻⁴ ng L⁻¹.
E4,7: exposição 4,7 10⁻⁴ ng L⁻¹

Classes de danos de 2400 células analisadas, por grupo de exposição.

Grupos	Classe de Dano				Total	Escore	Mediana
	0	1	2	4			
E2,3	34	57	5	4	100	79	73,00
	35	56	5	4	100	78	
	40	55	4	1	100	66	
	41	50	6	3	100	71	
	44	48	6	2	100	66	
	35	58	4	3	100	75	
	42	55	2	1	100	62	
	42	54	2	2	100	64	
	40	51	4	5	100	74	
	38	51	6	5	100	78	
	40	56	2	2	100	66	
	40	55	4	1	100	66	
	34	54	8	4	100	82	
	41	53	4	2	100	67	
	43	49	5	3	100	68	
	41	51	6	2	100	69	
	42	51	4	3	100	68	
	42	53	3	2	100	65	
	42	50	4	4	100	70	
	36	60	4	0	100	68	
40	52	6	2	100	70		
44	50	4	2	100	64		
41	52	3	4	100	70		
40	57	2	1	100	64		
E4,7	29	36	16	19	100	125	106,00
	40	38	14	8	100	90	
	35	42	9	14	100	102	
	37	40	12	11	100	97	
	30	44	12	14	100	110	
	33	37	17	13	100	110	
	27	37	16	20	100	129	
	31	34	17	18	100	122	
	23	38	16	23	100	139	
	32	46	12	10	100	100	
	34	41	11	14	100	105	
	38	34	16	12	100	102	
	26	37	16	21	100	132	
	31	43	14	12	100	107	
	22	45	11	22	100	133	
	37	33	16	14	100	107	
	24	50	12	14	100	116	
	24	50	16	10	100	112	
	28	30	22	20	100	134	
	36	36	12	16	100	108	
31	49	11	9	100	98		
36	42	8	14	100	100		
30	42	14	14	100	112		
30	50	8	12	100	102		

**C: Grupo controle. CA: Controle mais Álcool. E2,3: exposição 2,3 10⁻⁴ ng L⁻¹.
E4,7: exposição 4,7 10⁻⁴ ng L⁻¹**

APÊNDICE B**Concentração de proteínas totais por grupo de exposição.**

Grupos	Concentração Proteica (mg mL⁻¹)
C(1)	0,4595
C(2)	0,4245
C(3)	0,5016
C(4)	0,3865
C(5)	0,2780
CA(1)	0,4803
CA(2)	0,4625
CA(3)	0,3637
CA(4)	0,3373
CA(5)	0,3008
E4,7(1)	0,3403
E4,7(2)	0,4139
E4,7(3)	0,2455
E4,7(4)	0,3413
E4,7(5)	0,3355
E2,3(1)	0,2572
E2,3(2)	0,2911
E2,3(3)	0,3779
E2,3(4)	0,6294
E2,3(5)	0,4945

**C: Grupo controle. CA: Controle mais Álcool. E4,7: exposição 4,7 10⁻⁴ ng L⁻¹
E2,3: exposição 2,3 10⁻⁴ ng L⁻¹.**

ANEXO A

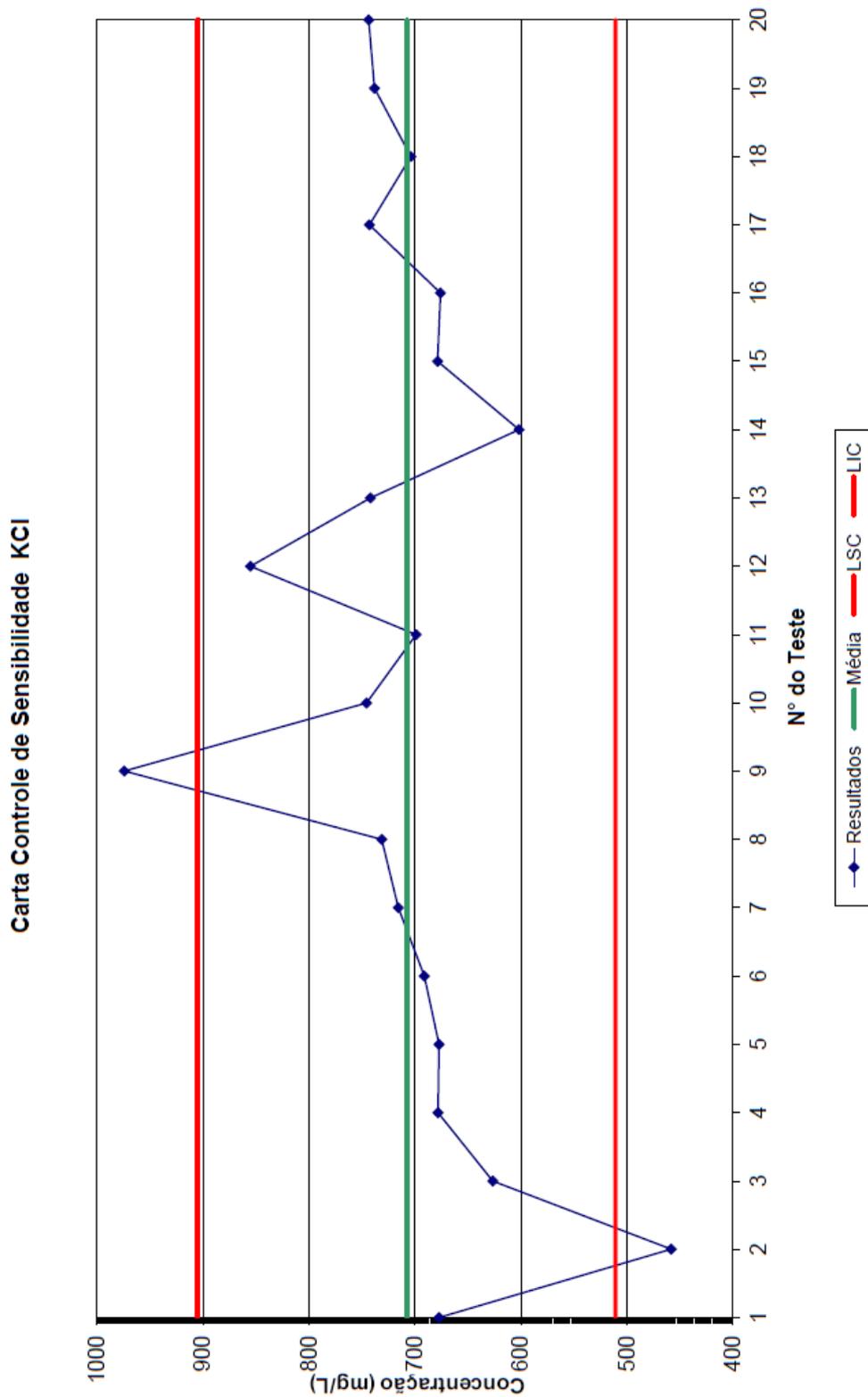
Composição do meio Básico + M4 para cultivo de *D. magna*

Solução	Reagente	Fórmula	Concentração g L ⁻¹
1	Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl ₂ 2H ₂ O	73,50
2	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO ₄ 7H ₂ O	123,30
3	Cloreto de potássio	KCl	5,80
4	Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	64,80
	Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl ₂ 4H ₂ O	7,21
	Cloreto de lítio	LiCl	6,12
	Cloreto de rubídio	RbCl	1,42
5	Cloreto de estrôncio hexa-hidratado	SrCl ₂ 6H ₂ O	3,04
	Cloreto de cobre di-hidratado	CuCl ₂ 2H ₂ O	0,335
	Cloreto de zinco	ZnCl ₂	0,26
	Cloreto de cobalto hexa-hidratado	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,20
	Nitrato de sódio	NaNO ₃	0,548
	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	5,72
	Brometo de sódio	NaBr	0,032
6	Molibdato de sódio di-hidratado	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,126
	Metavanadato de amônio	NH ₄ VO ₃	0,00115
	Iodeto de potássio	KI	0,0065
	Selenito de sódio	NaSe ₂ O ₃	0,00438
7	Silicato de sódio	Na ₂ SiO ₃	21,47
8	Titriplex III	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	0,50
	Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,199
9	Ortofosfato di-hidrogenado de potássio	KH ₂ PO ₄	0,286
	Ortofosfato hidrogenado de dipotássio	K ₂ HPO ₄	0,368
	Hidrocloreto de tiamina		0,750
10	Cianocobalamina (Vitamina B12)		0,01
	D (+) Biotina		0,0075

Meio básico: Soluções 1 – 4; M4: Soluções 5 – 10.

Fonte: Adaptado de Knie e Lopes, 2004.

ANEXO B

Carta controle de Sensibilidade de *D. magna* ao KCL.

Período de Abril/2016 a Maio/2017
 Fonte: Laboratório de Ecotoxicologia UTFPR

ANEXO C**Composição do meio Básico para diluição de amostras.**

Solução	Reagente	Fórmula	Concentração g L ⁻¹
1	Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl ₂ 2H ₂ O	73,50
2	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO ₄ 7H ₂ O	123,30
3	Cloreto de potássio	KCl	5,80
4	Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	64,80

Fonte: Adaptado de Knie e Lopes, 2004.