



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**Toxicidade do biocida clorotalonil para o
peixe estuarino *Poecilia vivipara***

Fernanda Chaves Lopes

Orientador: Camila de Martinez Gaspar Martins

Rio Grande
2017



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



Toxicidade do biocida clorotalonil para o peixe estuarino
Poecilia vivipara

Aluno: Fernanda Chaves Lopes

Orientadora: Camila de Martinez Gaspar Martins

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2017

*Loving can heal
Loving can mend your soul
And it's the only thing that I know
I swear it will get easier
Remember that with every piece of you
And it's the only thing we take with us when we die*

*We keep this love in a photograph
We made these memories for ourselves
Where our eyes are never closing
Our hearts were never broken
And time's forever frozen still.*

Photograph – Ed Sheeran

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de Pós Graduação Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC) pela oportunidade e contribuição na minha formação durante esses dois anos, A CAPES pela concessão da bolsa, ao Instituto de Ciências Biológicas por todo suporte de estrutura física dado a minha pesquisa, estendendo o agradecimento a equipe técnica da Fisiologia, que são peças fundamentais no funcionamento dos laboratórios e ao Gilson Cordeiro.

Agradeço as colaborações do pessoal do CONECO, LACOM, em especial a Fiamma, Augusto e Liziane e ao Professor Antonio Sergio e sua equipe de trabalho.

Aos meus colegas e amigos do PPGBAC que fiz durante esse tempo, agradeço aos conhecimentos compartilhados, a companhia e as risadas. Espero ver muito ainda o sucesso de vocês.

Agradeço ao pessoal da salinha 1 do prédio da Ciências Fisiológicas pela receptividade, companhia e conversas e principalmente aos colegas que ajudaram de alguma forma para que esse trabalho fluísse, como tirando dúvida com algum protocolo, com as planilhas de excel, emprestando algum material, entre outros. Muito obrigada!

Em especial agradeço a Jéssica Albañil pela contribuição a esse trabalho, pelas dúvidas tiradas e também pela companhia, conversas e risadas. Muchas gracias, Jess! Ao Fábio Tarouco pela grande ajuda com todos os experimentos, por ser essa pessoa dedicada ao que faz e que está sempre disposta a ajudar. Muito obrigada, Fábio!

Não poderia deixar de agradecer a Ana Laura Escarrone que chegou no finalzinho do mestrado, mas que deu uma grande ajuda e está sempre disposta a contribuir, obrigada Ana! E também a Inês pelo carinho, preocupação e pela companhia de todos nós que em dias de experimento ficamos além do horário de expediente no prédio da Fisio.

Agradeço imensamente a minha orientadora Professora Dra. Camila Martins por primeiro, me aceitar e acreditar em mim mesmo inexperiente. Segundo, por toda dedicação a ensinar, por toda paciência que teve, pela sinceridade e honestidade e, por ser exemplo de profissional.

Agradeço as minhas amigas e amigos pelo carinho de sempre, torcerem pelas minhas conquistas e por eu saber que posso contar com vocês! <3

Agradeço a minha família por torcerem pelas minhas conquistas, por todos os momentos juntos e saber que posso contar com vocês!

Enfim, são tantas pessoas que contribuem para a nossa formação como pós graduandos que ficaria difícil aqui citar todas, pois seja uma grande ajuda ou mesmo a mais simples é que faz um trabalho como este ser possível de ser realizado!

RESUMO

O clorotalonil é um fungicida presente em tintas anti-incrustantes e em outras formulações usadas na agricultura. É considerado tóxico para organismos não-alvo, mas apesar disso, apenas poucos países o regulamentam em seus critérios de qualidade de água (WQC). Para evidenciar os perigos da contaminação ambiental com clorotalonil e subsidiar critérios para regulamentação do composto, o presente trabalho avaliou efeitos tóxicos do biocida para a espécie de peixe estuarino *Poecilia vivipara*, através de teste de letalidade aguda (96 h) e por meio de biomarcadores bioquímicos, de qualidade espermática e hematológicos. A CL_{50} calculada para *P. vivipara* foi de 40,8 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil, indicando-a como uma espécie de peixe moderadamente sensível. Para análise dos biomarcadores, os peixes foram expostos (96 h) à 1 e 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Observamos que o clorotalonil altera os níveis de pró e antioxidantes em direção ao estresse oxidativo. Nas brânquias detectamos efeito negativo sobre capacidade antioxidante total (ACAP), enquanto no fígado houve uma redução na atividade da Glutathione S-transferase (GST). Mas em ambos os tecidos, nos níveis de Glutathione (GSH) e da atividade da sua precursora Glutathione-cisteína-ligase (GCL) aumentaram. No entanto, o dano oxidativo, representado pela lipoperoxidação (LPO), ocorreu significativamente apenas em nível celular, em eritrócitos e células espermáticas. As hemácias também apresentaram aumento na fluidez de suas membranas, dos níveis de espécies reativas de oxigênio e dano de DNA, sendo estes mais elevados nos peixes expostos à 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Nas células espermáticas, a LPO foi acompanhada por queda na funcionalidade de membrana e funcionalidade mitocondrial, além da redução na motilidade. Com base nestes resultados, podemos confirmar que o clorotalonil é um composto tóxico e que sua ação pode promover efeitos sistêmicos e afetar processos como a respiração, metabolização de xenobióticos, além da fertilidade de *P. vivipara*, recomendada aqui como um bom biomonitor.

Palavras-chave: anti-incrustante, tóxico, biomarcador, estresse oxidativo, eritrócitos, qualidade espermática.

ABSTRACT

Chlorothalonil is a fungicide existing in commercial antifouling paints and other formulations used in agriculture. It is considered toxic for non-target organisms, however only few countries have included it in their water quality criteria (WQC). To address the hazards of environmental contamination with chlorothalonil and to offer support for its regulation, the present work evaluated the toxic effects of chlorothalonil for the guppy *Poecilia vivipara*, through acute lethality test (96 h) and by analysis of biochemical, spermatogenic and hematological biomarkers. The LC_{50} calculated for *P. vivipara* was 40.8 $\mu\text{g/L}$ of chlorothalonil, indicating that it is a moderately sensitive fish species. For the analysis of biomarkers, fish were exposed (96 h) to 1 and 10 $\mu\text{g/L}$ of chlorothalonil. We observed that the biocide changes the levels of pro and antioxidants towards a situation of oxidative stress. In the gills we detected a negative effect on the total antioxidant capacity (ACAP), while in the liver there was a reduction in the activity of Glutathione S-transferase (GST). But in both tissues, the levels of Glutathione (GSH) and the activity of its precursor Glutathione-cysteine-ligase (GCL) increased. However, oxidative damage, represented by lipoperoxidation (LPO), occurs significantly only at the cellular level, in erythrocytes and sperm cells. In red blood cells we also saw increase of membrane fluidity, of reactive oxygen species levels, and DNA damage, which were higher in fish exposed to 10 $\mu\text{g/L}$ of chlorothalonil. In the sperm cells, LPO was detected with a drop in membrane functionality and mitochondrial functionality, which may be the cause of the reduction in sperm motility. Based on these results, we can confirm that chlorothalonil is a highly toxic compound and causes effects at systemic levels, being able to disturb respiration, metabolism of xenobiotics and the fertility of *P. vivipara*, which is recommended here as a good biomonitor.

Key-words: antifouling, toxic, biomarker, oxidative stress, erythrocytes, sperm quality.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada nos seguintes itens: sumário, lista de figuras, lista de tabelas, introdução geral, objetivos geral e específicos, referências da introdução geral, capítulo 1, considerações finais e perspectivas. A formatação da dissertação segue as normas regimentais do Programa de Pós Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC) da FURG. O Capítulo 1 refere-se ao único manuscrito desta dissertação que será encaminhado à revista *Aquatic Toxicology* (Qualis A2 na área de Biodiversidade). Neste aspecto, a formatação do manuscrito é aquela informada pela revista (www.journals.elsevier.com/aquatic-toxicology/) e os itens estão ordenados como resumo, introdução, material e métodos, resultados, discussão com conclusão, agradecimentos e referências, sendo que as tabelas e figuras encontram-se ao fim do capítulo. Por último, estão os itens de considerações finais e sobre as perspectivas que este trabalho gerou.

SUMÁRIO

1. LISTA DE FIGURAS	10
2. LISTA DE TABELAS	11
3. INTRODUÇÃO GERAL	12
4. OBJETIVOS	20
5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	21
6. CAPÍTULO 1	27
Resumo	29
1. Introdução	30
2. Material e Métodos	32
2.1. <i>Poecilia vivipara</i>	32
2.2. Clorotalonil	33
2.2.1. Teste de toxicidade	33
2.2.2. Ensaio subletais	33
2.3. Procedimentos analíticos	35
2.3.1. Análises hematológicas	35
2.3.2. Parâmetros de qualidade espermática	37
2.3.3. Análises bioquímicas	38
2.3.3. Quantificação de clorotalonil	39
2.4. Análise dos dados	40
3. Resultados	41
4. Discussão	42
Agradecimentos	47
Referências	48
Legendas para as figuras	60
Figuras	61
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	66

1. LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 1. Mapa de distribuição de *Poecilia vivipara* 20

CAPÍTULO 1

Figura 1. Gráfico Cromatografia Clorotalonil 61

Figura 2. Gráfico de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e da Capacidade Antioxidante Total (ACAP) 62

Figura 3. Gráfico concentração de Glutathiona reduzida (GSH) e atividade de Glutathiona Cisteína Ligase (GCL) 63

Figura 4. Gráfico atividade de Glutathiona S-Transferase (GST) 64

Figura 5. Gráfico de Peroxidação Lipídica (LPO) 65

2. LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análises em células sanguíneas	58
Tabela 2. Análises em células espermáticas	59

3. INTRODUÇÃO GERAL

A poluição é um dos principais problemas ambientais da atualidade e os estuários estão entre os ambientes que mais recebem carga de contaminação derivada de atividades antrópicas, como despejo de esgotos domésticos, lançamento de pesticidas e fertilizantes utilizados na agricultura, atividades de dragagem e atividades portuárias. As tintas anti-incrustantes usadas nas embarcações vêm sendo consideradas como uma importante fonte de introdução de substâncias químicas em águas estuarinas e marinhas. Estas tintas são aplicadas nos cascos de navios para evitar incrustação de algas, mexilhões e outros organismos. De acordo com Kotrikla (2009), a proposta das tintas anti-incrustantes vai além de evitar a incrustação para reduzir a resistência e fricção entre a água e o casco dos navios e, conseqüente, aumento no consumo de combustível; elas também servem para reduzir a frequência de docagem que resulta em perda de tempo e aumento de custos de manutenção, para reduzir a corrosão dos cascos, e para minimizar o transporte de espécies entre ambientes, incluindo a introdução de espécies exóticas.

Os primeiros biocidas regularizados e utilizados na composição das tintas anti-incrustantes, denominadas como tintas de primeira geração, foram os óxidos de cobre e os óxidos de zinco. No entanto, a durabilidade destas tintas era curta, girando em torno de um ano após sua aplicação. Em 1960 surgiram as tintas anti-incrustantes a base de organoestânico, que na sua maioria utilizavam como princípio ativo o composto tributilestanho (TBT). A durabilidade destas tintas, chamadas de segunda geração, era de 5 a 7 anos e, conseqüentemente, seu uso se expandiu fácil e rapidamente no setor portuário, chegando a atingir 70% de todo o transporte comercial marítimo em 1999 (Almeida et al., 2007; Castro et al., 2012). No entanto, vários problemas ambientais envolvendo organoestânicos e organismos não-alvos apareceram no início dos anos 80 (Castro et al., 2011; Castro et al., 2012). Os primeiros problemas envolvendo tintas anti-incrustante a base de TBT foram relatados no final da década de 70, em culturas de ostras *Crassostrea gigas* na Baía de Arcachon na França, uma área cercada por marinas e pequenos portos (Alzieu, 1991; Alzieu, 1998). Foram observados diversos efeitos deletérios para a espécie, como diminuição do número de jovens recém-fixados, anomalias no desenvolvimento das larvas e má formação das conchas, que apresentavam “câmaras porosas” e diminuição na quantidade de aminoácidos ativos no processo de fixação do cálcio (Alzieu, 1998). Entretanto, o mais conhecido dos efeitos

da exposição ao TBT é o fenômeno chamado *Imposex*, caracterizado pelo aparecimento de características sexuais de machos, tais como canal deferente e pênis, em fêmeas de gastrópodes (Castro et al., 2011; Castro et al., 2012). Vinte anos após o uso em grande escala das tintas a base de TBT, teve início o seu processo de banimento, pelos riscos comprovados à biota aquática. O governo francês foi o primeiro país a proibir o uso de tintas anti-incrustantes a base de TBT e, após, diversos outros países se propuseram a criar sanções contra a aplicação destas tintas.

Porém, o transporte de embarcações é uma atividade que atravessa fronteiras, o controle individual de cada nação sobre os “sistemas anti-incrustantes”, não é suficientemente eficaz para evitar a contaminação dos ambientes com uma tinta ou outra (Castro et al., 2012). Assim, a Organização Marítima Internacional (IMO) tomou medidas para regulamentar internacionalmente o uso de biocidas a base de TBT nas tintas anti-incrustantes, proibindo sua comercialização e uso em 2003, em qualquer ambiente aquático, com prazo limite definido para 2008 (IMO, 2008). Apesar disso, em um estudo de monitoramento ambiental englobando diversos portos e marinas da América Latina, Castro et al. (2012) constatou a presença de resíduos de tintas a base de TBT, indicando seu uso após o banimento. A presença do organoestânico TBT e seus metabólicos DBT e MBT (di e monobutilestanho, respectivamente) foi detectada inclusive em regiões estuarinas ao longo da costa Brasileira, por isso uma preocupação especial com os estuários.

Em razão dos problemas ambientais associados ao uso de tintas à base de TBT e pelo seu gradativo banimento, começaram a surgir, a partir de 1987, as chamadas tintas anti-incrustantes de terceira geração (Castro et al., 2011). Dessas tintas de terceira geração, a IMO, reconhece e aceita o uso de dezesseis biocidas anti-incrustantes, sendo que numa formulação de tinta podem estar presentes até quatro compostos (Castro et al., 2011). Dentre esses dezesseis compostos, está o fungicida clorotalonil, que também é amplamente usado como biocida agrícola (Lourençato et al., 2015, Prestes et al., 2009). Analisando-se a composição de diversas tintas anti-incrustantes disponíveis no mercado, o clorotalonil foi detectado em muitas delas (*Gilberto Fillmann, comunicação pessoal*).

O clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisofталонitrila) é um fungicida organoclorado pertencente ao grupo das isofталонitrilas. Este composto possui baixa solubilidade em água (0,6 a 1,2 mg/L à 25°C) e sua persistência no meio aquático também é baixa. Em água doce, apresenta meia-vida variando entre 4 à 150 h (Thomas & Brooks, 2010),

porém em águas salgadas e salobras sua meia-vida é ainda menor, sendo de aproximadamente 1,9 dias (Sakkas et al., 2002). Na presença de luz solar e microorganismos, a degradação do clorotalonil pode ser acelerada, exibindo meia-vida entre 1 e 48 h, dependendo do tipo de água (Sakkas et al., 2002; Voulvoulis, 2006; Thomas & Brooks, 2010).

No Brasil, o clorotalonil não está legislado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, na resolução que estabelece as condições e padrões para corpos d'água superficiais (resolução 357, CONAMA 2005). Apesar disso, o biocida é mencionado na resolução 396 do CONAMA (CONAMA, 2008) que dispõe sobre as diretrizes ambientais para o enquadramento de águas subterrâneas. Na resolução CONAMA 396, o limite praticável para o clorotalonil em águas subterrâneas é de 0,1 µg/L. Entretanto, esta resolução apresenta ainda valores máximos do biocida permitidos para alguns usos específicos de águas subterrâneas, sendo de 30 µg/L para consumo humano, 170 µg/L para dessedentação de animais e 5,8 µg/L para irrigação. No âmbito internacional, apenas poucos países o regulamentam em seus critérios de qualidade de água (WQCs). O Canadá é um deles, e estabelece regulamentação específica para o clorotalonil em corpos d'água doce (0,18 µg/L) e água salgada (0,36 µg/L) (CCME, 1999). Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (USEPA) está revisando os registros de alguns pesticidas, incluindo o clorotalonil desde 2012 e, portanto, não tem nada estabelecido para este composto no momento (FR 18810, 2012 US). Na Inglaterra o uso de clorotalonil foi revogado na composição de tintas anti-incrustantes (Thomas & Brooks, 2010), mas continua sendo permitido em lavouras agrícolas, sendo que em água doce está legislado em 0,035 e 1,2 µg/L para aplicação em longo e curto período, respectivamente (DEFRA, 2014). A China, por sua vez, aprova o uso do fungicida e não definir valores nem para água doce e nem para água salgada (CCPIA, 2013).

Com respeito aos dados ambientais de clorotalonil no Brasil, Filizola et al., encontrou o pesticida em águas de córregos no município de Guaira no estado de São Paulo na concentração de 0,27 µg/L (Filizola et al., 2002), sendo esta a única literatura brasileira que encontramos abordando concentrações ambientais do composto. No caso de água salgada, o clorotalonil foi encontrado em portos e marinas da Ásia e Europa (costa do Reino Unido, Grécia e Coreia) em concentrações variando de <0.001 a 1,38 µg/L (Voulvoulis et al., 2000; Sakkas et al., 2006; Lee et al., 2011). Apesar do seu uso permitido em muitos países como o Brasil e da sua presença no ambiente, informações

sobre a toxicidade do clorotalonil para organismos não-alvos, como peixes, ainda são em sua maioria, reduzidas à dados de mortalidade.

De fato, o clorotalonil é tóxico para peixes, sendo que a concentração letal mediana (CL₅₀) após exposição aguda (96 h) varia de 8,2 a 76 µg/L, dependendo da espécie e das condições de exposição (Guardiola et al, 2012). Por exemplo, a CL₅₀ (96 h) para as espécies de peixes de água doce *Onchorhynchus mykiss* (truta arco-íris) e *Gasterosteus aculeatus* (esgana-gato) é de 76 e 73 µg/L, respectivamente (Ernst et al., 1991). Estas espécies são mais tolerantes do que os peixes eurialinos *Galaxias maculatus* e *Galaxias auratus*, cujas CL₅₀ (96 h) são de 16 e 29 µg/L de clorotalonil, respectivamente (Davies e White, 1985). Dados da Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA, 1999) concluem que o clorotalonil é um composto cuja toxicidade é elevada e reportam que a exposição aguda (96 h) ao biocida afeta a eclosão de ovos e o sucesso larval do peixe *Pimephales promelas* em concentrações que variam de 3 a 6,5 µg/L. Também são encontrados valores de CL₅₀ (96 h) do clorotalonil para as espécies de peixes *P. promelas*, *Ictalurus punctatus* e *Lepomis macrochirus*, sendo estes de 23, 52 e 59,5 µg/L de clorotalonil, respectivamente (USEPA, 1999; Gallagher & Di Giulio, 1992). Para invertebrados aquáticos, os resultado de toxicidade do clorotalonil são bastante variáveis. Em *Daphnia magna* o valor calculado para CL₅₀ (24 h) é de 195 µg/L de clorotalonil (Montforts, 1999), enquanto que para o camarão de água doce *Parataya australiensis* a CL₅₀ (96 h) é de 16 µg/L do composto (Davies et al., 1994).

Com relação ao mecanismo de toxicidade do clorotalonil, ele age principalmente sobre o tripeptídeo glutationa (GSH), provocando sua oxidação (GSSG) e, posterior inativação ou “perda”, uma vez que não observa-se recuperação da GSSG (glutaciona oxidada) para GSH (glutaciona reduzida) (Gallagher et al., 1992). A GSH é umas das principais linha de defesa dos organismos contra a presença de agentes tóxicos como compostos oxidantes, metais e compostos orgânicos. No processo de detoxificação dos compostos orgânicos, estes são conjugados à GSH, o que os tornam mais solúveis para sua excreção (Van der Oost et al., 2003).

A contaminação dos ambientes aquáticos e seus efeitos podem ser avaliados através do uso de marcadores biológicos, também conhecidos como biomarcadores. Biomarcadores podem ser definidos como indicadores de curto prazo de efeitos biológicos a longo prazo (Cajaraville et al., 2000), ou seja, biomarcadores são respostas/alterações biológicas rápidas que indicam se o organismo vem sendo ou foi exposto à poluentes por certo período de tempo. Eles podem ser classificados como

biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito/estresse e biomarcadores de suscetibilidade (Nascimento et al., 2006; Monserrat et al., 2007). Biomarcador de exposição indica que o organismo foi exposto a um agente xenobiótico, antecipando situação de prejuízo à saúde. Os biomarcadores de efeito ou estresse são definidos pelas alterações resultantes da exposição a xenobióticos, com estabelecimento de dano ou de doença. Biomarcador de suscetibilidade é definido através da capacidade inerente ou adquirida de um organismo ou população frente à exposição ao xenobiótico. Segundo Nascimento et al. (2006) um organismo pode, em determinadas circunstâncias, ter limitada a sua habilidade de se adaptar ou sobreviver, o que pode ser determinado por mensuração de respostas fisiológicas que, analisadas em conjunto, expressam a diminuição da energia disponível para o crescimento.

Os biomarcadores são classificados também como específicos e não-específicos. Os específicos tratam-se de respostas mais direcionadas a um determinado poluente ou grupo de poluentes. Por exemplo, a inibição da enzima acetilcolinesterase em diversos grupos animais pela exposição a organofosforados, ou a síntese de metalotioneínas em resposta à exposição a um excesso de metais, ou mesmo o imposex como resultado da exposição ao TBT. Os biomarcadores não-específicos, por sua vez, são respostas comuns à diferentes tipos de poluentes, como o caso dos biomarcadores de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é causado por um desbalanço entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio e agentes antioxidantes que pode ocorrer em função de muitos fatores que vão desde variações de temperatura à presença de contaminantes. Eles são indicativos de uma situação geral de estresse e são representados principalmente por componentes da defesa antioxidante e por oxidação de biomoléculas. De qualquer forma, independente da sua classificação, os biomarcadores funcionam como sinais de “alerta precoce” da presença de contaminantes no ambiente.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são compostos altamente reativos oriundos da redução do oxigênio molecular. Os principais produtos da redução molecular de O_2 são o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot). Sendo que O_2^- apresenta uma baixa capacidade de oxidação, e o OH^\cdot é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O H_2O_2 não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações de oxidação (Anderson, 1996). As EROs são produzidas naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Em

concentrações adequadas, estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, em excesso apresentam efeitos deletérios, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e danos às moléculas proteicas dos tecidos e das membranas, enzimas, carboidratos e DNA (Barreiros & David, 2006; Monserrat et al, 2007). O excesso de EROs pode ser combatido por antioxidantes, que podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (Halliwell, 1994). Porém, o desbalanço entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de defesas antioxidantes, em favor das EROs induz o organismo a uma situação de estresse oxidativo, podendo levá-lo a ter dano oxidativo em lipídios, proteínas ou DNA (Monserrat et al., 2007).

Quanto aos antioxidantes, eles podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos. Como exemplo de antioxidantes enzimáticos existem os grupos de enzimas catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), dentre outros. Os antioxidantes não enzimáticos são compostos presentes no organismo ou oriundos da alimentação. Alguns exemplos de antioxidantes não enzimáticos são α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C) e Glutaciona (GSH).

Os sistemas antioxidantes enzimáticos são divididos em três linhas, a primeira linha são as enzimas superóxido dismutase (SOD), elas catalisam a destruição do radical O_2^- convertendo-o em O_2 e H_2O_2 . Logo após ocorre a ação das enzimas catalases, que fazem a remoção de H_2O_2 , convertendo-o em H_2O e O_2 . E um terceiro grupo que atua na remoção de ERO são as glutacionas. A glutaciona peroxidase (GPx) reduz H_2O_2 à H_2O através da oxidação da glutaciona reduzida (GSH) à glutaciona oxidada (GSSG) (Halliwell, 1994). Como sistema antioxidante não enzimático, encontra-se o tripeptídeo GSH que possui o grupo tiol, este serve como doador de prótons e é o que define a atividade biológica das glutacionas. Sendo assim, a GSH age em conjunto com as defesas enzimáticas no organismo. Depois que a GSH é utilizada, seus níveis são restaurados pela enzima glutaciona redutase (GR), que recicla a glutaciona oxidada (GSSG) a sua forma reduzida (GSH), através da utilização de NADPH como doador de elétron (Hermes-Lima, 2004; Halliwell, 1994). A síntese de GSH é regulada pelas ações enzimáticas de Glutamato Cisteína Ligase (GCL) e Glutaciona Sintase (GS). A GCL catalisa a reação de glutamato e cisteína formando o dipeptídeo γ -glutamil-cisteína (γ GluCis). Após, a GS faz a ligação do aminoácido glicina com γ GluCis, gerando GSH.

Outro mecanismo de resposta antioxidante é o aumento da síntese de enzimas antioxidantes como a Glutathione S-Transferase (GST). A GST catalisa a conjugação de glutathione reduzida (GSH) à metabólitos xenobióticos, fazendo com que fiquem mais solúveis em água e, assim, facilitando sua eliminação. Ela também reage diretamente com produtos da peroxidação lipídica (LPO), neutralizando-os. Assim, uma redução da síntese e/ou atividade da GST pode levar a uma situação de estresse oxidativo (Hermes-Lima, 2004; Monserrat et al., 2007). A LPO representa, de maneira geral, uma oxidação dos lipídeos de membranas celulares, podendo afetar sua permeabilidade seletiva e, portanto, todo o funcionamento celular. Ao contrário dos biomarcadores mencionados acima que são de exposição, a LPO é classificada como biomarcador de efeito e representa efetivamente um dano oxidativo.

Além dos biomarcadores de estresse oxidativo, existem os biomarcadores genéticos (genotoxicidade), de parâmetros hematológicos, parâmetros imunológicos, reprodutivos, entre outros. A escolha dos biomarcadores irá depender da resposta que se deseja contemplar. Através do rastreio de respostas de múltiplos biomarcadores, informações importantes podem ser obtidas sobre a exposição dos organismos a agentes tóxicos ou situações de estresse (Van der Oost et al, 2003). Dentre os biomarcadores de genotoxicidade está o teste de micronúcleos (MNs). Os MNs podem ser definidos como massas de cromatina que são originadas da extrusão de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros durante a anáfase na divisão celular (Schmid, 1975; Al-sabti & Metcalfe, 1995). O teste de MNs permite identificar eventuais aumentos na frequência de mutação de células de organismos expostos a uma gama variada de agentes genotóxicos (Flores & Yamaguchi, 2009). O teste apresenta vantagens de ser aplicado como baixo custo, rapidez de análise para triagem de um grande número de substâncias, e pode ser reproduzido em diferentes espécies e tecidos (Flores & Yamaguchi, 2009).

Outros biomarcadores com grande relevância ambiental são os que avaliam aspectos reprodutivos dos organismos. O impacto dos compostos xenobióticos em parâmetros reprodutivos tem grande relevância e merecem uma análise aprofundada, uma vez que a diminuição da capacidade reprodutiva dos animais pode, a longo prazo, ameaçar a sobrevivência de espécies suscetíveis (Van der Oost, 2003). A capacidade reprodutiva prejudicada pode ser representada por uma diminuição da aptidão ou da fecundidade, diminuindo o número de ciclos reprodutivos na vida de cada animal e/ou diminuindo a sobrevivência da prole nos seus estágios iniciais (Kime, 1995; Van der Oost, 2003). Como exemplo, temos os estudos realizados por Harayashiki et al. (2013),

Lopes et al. (2014) e Sánchez et al. (2017) que avaliaram efeitos do glifosato e suas formulações sobre a qualidade espermática em peixes. Os estudos observaram redução da funcionalidade mitocondrial o que interfere diretamente na motilidade espermática, uma vez que para haver motilidade intensa é necessário a alta produção de energia na células, processo esse realizado pelas mitocôndrias. Logo, uma alteração na funcionalidade mitocondrial das células espermáticas prejudica em maior instância o sucesso reprodutivo (Lopes et al., 2014). Esse parâmetro é um dentre diversos aspectos reprodutivos que podem ser analisados como biomarcadores.

Em resumo, pelo nível de informações que os biomarcadores podem transmitir, eles são importantes ferramentas para monitorar, prevenir ou remediar os efeitos prejudiciais de poluentes aos organismos, aos ecossistemas, servindo, inclusive, como subsídio para processos de avaliação de risco ambiental.

A escolha do modelo biológico no qual os biomarcadores são analisados/aplicados é de fundamental importância. De acordo com Beeby (2001) estes modelos biológicos são espécies sentinelas e podem ser classificados em: espécies monitoras, indicadoras e acumuladoras. As espécies monitoras tem como característica informar o impacto sofrido por uma diminuição ou aumento da sua função/desempenho. As espécies indicadoras fornecem dados de poluição pela sua presença ou ausência no ambiente; e as acumuladoras concentram o contaminante em seus tecidos, indicando a fração biodisponível do composto no ecossistema. Diversas espécies de peixes são consideradas como sentinelas. Neste contexto, a espécie de peixe *Poecilia vivipara* vem sendo proposta como modelo biológico para testes ecotoxicológicos com contaminantes orgânicos e metálicos (INCT-TA, 2015). Ela também tem sido sugerida como espécie biomonitora em programas de monitoramento de ambiente aquático, mostrando sensibilidade à diferentes tipos contaminantes e apresentando respostas claras frente à poluição ambiental (Paulo et al., 2012).

P. vivipara é uma espécie eurialina que pertence à família *Poeciliidae* e ordem Cyprinodontiformes e, é comumente encontrado em pequenos lagos, rios e ecossistemas lagunares do Brasil (Santos et al., 2011). Sua distribuição se dá ao longo da costa da América do Sul, da Argentina à Venezuela (Ferreira et al., 2012) (Figura 1). Os Poecilídeos estão presentes nos mais diversos habitats, desde zonas temperadas à tropicais, e apresentam uma alta adaptabilidade e tolerância à variações termais e de salinidade (Meffe & Snelson Jr, 1989; Nascimento & Gurgel, 2000). A reprodução em *P. vivipara* ocorre por viviparidade com gestação intrafolicular. A espécie é iterópara,

com capacidade de reter o esperma de uma cópula para futuras fecundações sucessivas e assim não necessita que as fêmeas tenham novos encontros seguidos com os machos para reprodução (Betito, 2006). Quanto à alimentação, são peixes considerados onívoros que alimentam-se, principalmente, de invertebrados de coluna d'água e sedimento, detritos, algas e plantas, mas apresentam uma tendência à ingestão de larvas de insetos (Nascimento & Gurgel, 2000).

Pelas características descritas acima, *P. vivipara* foi a espécie escolhida para este estudo. Resultados gerados pelo uso desta espécie regional aproximam os resultados laboratoriais da realidade local e possibilitam implicações diretas na preservação do ambiente (Barbieri, 2004).



Figura 1. Distribuição de *Poecilia vivipara* (●) na Costa da América do Sul (Ferreira et al., 2012).

4. OBJETIVOS

Com base no exposto, o objetivo geral do trabalho foi determinar efeitos tóxicos do biocida clorotalonil presente em tintas anti-incrustantes, para a espécie de peixe estuarino *Poecilia vivipara*, através de teste de letalidade e por meio de biomarcadores moleculares.

Neste contexto, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Determinar a toxicidade aguda do clorotalonil sobre o peixe *P. vivipara* a partir de testes de CL₅₀ (concentração letal mediana para 50% dos animais);
- Avaliar os efeitos do clorotalonil em *P. vivipara* expostas às concentrações subletais (1 e 10 µg/L), sobre parâmetros fisiológicos, bioquímicos, hematológicos e reprodutivos, este último com enfoque na qualidade espermática;
- Identificar os biomarcadores responsivos ao micropoluente clorotalonil e avaliar sua aplicação para efeitos de monitoramento ambiental.
- Confirmar o uso do peixe *P. vivipara* como modelo biológico para biomonitoramento de ambientes contaminados com clorotalonil ou com tintas que os contêm na sua formulação.
- Trazer informações úteis para os processos de regulamentação e avaliação de risco ecológico com relação ao clorotalonil.

(Todos os objetivos descritos acima foram alcançados e estão contemplados no Capítulo 1 dessa dissertação).

5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T. C.; DE SOUSA, O. Marine paints: the particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, v. 59, n. 1, p. 2-20, 2007.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 343, n. 2-3, p. 121-135, 1995.

ALZIEU, C. Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. *Marine Environmental Research*, v. 32, n. 1-4, p. 7-17, 1991.

ALZIEU, C. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean & Coastal Management*, v. 40, n. 1, p. 23-36, 1998.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

BARBIERI, E. Emprego de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes) e *Artemia salina* (Crustacea) para determinar a toxicidade aguda da água de produção de petróleo em Sergipe, Brasil. *Biologia Geral e Experimental*, v. 5, n. 1, p. 26-29, 2004.

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

BEEBY, Alan. What do sentinels stand for?. *Environmental Pollution*, v. 112, n. 2, p. 285-298, 2001.

BETITO, R. Comparação da complexidade das adaptações bioecológicas de dois peixes (*Jenynsia multidentata* e *Poecilia vivipara*) (Cyprinodontiformes) no estuário da lagoa dos patos (RS - Brasil). *Revista didática Sistêmica*, v. 3, p. 71-100, 2006.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, v. 247, n. 2, p. 295-311, 2000.

CASTRO, Í. B.; PERINA, F. C.; FILLMANN, G. Organotin contamination in South American coastal areas. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 184, n. 3, p. 1781-1799, 2012.

CASTRO, Í. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*, v. 34, n. 6, p. 1021-1031, 2011.

CCME (CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT). Appendix XVII - Canadian water quality guidelines: Updates (March 1994), chlorothalonil. In: Canadian water quality guidelines, Canadian Council of Resource and Environment Ministers. Disponível em: <<http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/163>>. Acesso em: 09/2015.

CONAMA. Resolução nº 357, de 18 de março de 2005, Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Publicada no Diário Oficial da União nº 053. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 08/2015.

CONAMA. Resolução nº 396, de 3 de abril de 2008, Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Publicada no Diário Oficial da União nº 66. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>>. Acesso em: 08/2015.

DAVIES, P. E.; COOK, L. S. J.; GOENARSO, D. Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 13, n. 8, p. 1341-1354, 1994.

DAVIES, P. E.; WHITE, R. W. G. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. I. Lethal levels for *Salmo gairdneri*, *Galaxias maculatus*, *G. truttaceus* and *G. auratus* and the fate of ¹⁴C-TCIN in *S. gairdneri*. *Aquatic toxicology*, v. 7, n. 1-2, p. 93-105, 1985.

DEFRA - Department for Environment Food and Rural Affairs Water. United Kingdom - UK. Framework directive implementation in England and wales: new and updated standards to protect the water environment, 41 p., 2014. Disponível em: <<https://www.gov.uk/government/organisations/department-for-environment-food-rural-affairs>>. Acesso em: 10/2015.

ERNST, W. et al. The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 21, p. 1-9, 1991.

FERREIRA, R. S. et al. Biomarkers of organic contamination in the South American fish *Poecilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 75, n. 16-17, p. 1023-1034, 2012.

FILIZOLA, H. F. et al. Monitoring and evaluation of the risk of contamination by pesticide in surface water and groundwater in the Guaíra region, São Paulo, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 5, p. 659-667, 2002.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. *Saúde e Pesquisa*, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2009.

GALLAGHER, E. P.; CANADA, A. T.; DI GIULIO, R. T. The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquatic toxicology*, v. 23, p. 155-168, 1992.

GALLAGHER, E. P.; DI GIULIO, R. T. Glutathione-mediated chlorothalonil detoxification in channel catfish gills. *Marine Environmental Research*, v. 34, p. 221-226, 1992.

GUARDIOLA, F. A. et al. Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *International journal of molecular sciences*, v. 13, n. 2, p. 1541-1560, 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HARAYASHIKI, C. A. Y. et al. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquatic toxicology*, v. 142, p. 176-184, 2013.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*, v. 1, p. 319-66, 2004.

IMO; *Antifouling Systems*, International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships, International Maritime Organization: London, 2008. Disponível em: <<http://www.imo.org/en/Publications/Pages/Home.aspx>>. Acesso em 06/2015.

INCT-TA. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática. Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq. Disponível em: <<http://www.inct-ta.furg.br>>. Acesso: 08/2015.

KIME, D. E. The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 5, n. 1, p. 52-95, 1995.

KOTRIKLA, A. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *Journal of Environmental Management*, v. 90, p. S77-S85, 2009.

- LOPES, F. M. et al. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic toxicology*, v. 155, p. 322-326, 2014.
- LOURENÇATO, L. F. et al. Effects on Water Quality of Pesticide use in Farmland Under Intensive Soil Management in Southern Brazil. *International Journal of Plant & Soil Science*, v. 5, n. 3, p. 155-166, 2015.
- MEFFE, G. K.; SNELSON JR, F. F. An ecological overview of poeciliid fishes. *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*, p. 13-31, 1989.
- MONSERRAT, J. M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 146, n. 1, p. 221-234, 2007.
- MONTFORTS, M. H. M. M. *Chlorothalonil*; CSR Advisory Report 06105A00: Bilthoven, *The Netherlands*, 1999.
- NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*, p. 413-432, 2006.
- NASCIMENTO, R. S. S.; GURGEL, H. C. B. Estrutura populacional de *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801 (Atheriniformes, Poeciliidae) do rio Ceará-Mirim-Rio Grande do Norte. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 22, p. 415-422, 2000.
- PAULO, D. V.; FONTES, F. M.; FLORES-LOPES, F. Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) as a tool for the environmental quality assessment of the Cachoeira River, BA. *Brazilian Journal of Biology*, v. 72, n. 1, p. 131-140, 2012.
- PRESTES, O. D. et al. QuEChERS—Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
- SAKKAS, V. A. et al. Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of Greece. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 9, p. 327-332, 2002.

SAKKAS, V. A.; KONSTANTINOY, I. K.; ALBANIS, T. A. Photochemical fate of organic booster biocides in the aquatic environment. *The Handbook of Environmental Chemistry*, v. 5, p. 171-200, 2006.

SÁNCHEZ, J. A. A. et al. Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere*, v. 177, p. 200-210, 2017.

SANTOS, E. G. N.; CUNHA, R. A.; SANTOS, C. P. Behavioral responses of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes: Cyprinodontiformes) to experimental infections of *Acanthocollarietremia umbilicatum* (Digenea: Cryptogonimidae). *Experimental parasitology*, v. 127, n. 2, p. 522-526, 2011.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research - Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

USEPA. Reregistration eligibility decision (red) chlorothalonil, 1999. Disponível em: <<http://www.epa.gov/>>. Acesso em: 06/2015.

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, n. 2, p. 57-149, 2003.

VOULVOULIS, N. Antifouling paint booster biocides: occurrence and partitioning in water and sediments. *The Handbook of Environmental Chemistry*, p. 155-170, 2006.

VOULVOULIS, N.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Occurrence of four biocides utilized in antifouling paints, as alternatives to organotin compounds, in waters and sediments of a commercial estuary in the UK. *Marine Pollution Bulletin*, v. 40, n. 11, p. 938-946, 2000.

6. CAPÍTULO 1

Toxicidade do biocida clorotalonil no peixe estuarino *Poecilia vivipara*

Toxicity of the biocide chlorothalonil on the estuarine guppy *Poecilia vivipara*

Fernanda Chaves Lopes, Jessica Andrea Albañil Sánchez, Fábio Tarouco, Diego Martins Pires, Jéssica Ribeiro Pereira, Antonio Sergio Varela Junior, Carine Dahl Corcini, Ednei Gilberto Primel, Gilberto Fillmann, Camila De Martinez Gaspar Martins

Manuscrito a ser submetido para a revista Aquatic Toxicology

Toxicidade do biocida clorotalonil no peixe estuarino *Poecilia vivipara*

Toxicity of the biocide chlorothalonil on the estuarine guppy *Poecilia vivipara*

Fernanda Chaves Lopes^a, Jessica Andrea Albañil Sánchez^b, Fábio Tarouco^b, Diego Martins Pires^d, Jéssica Ribeiro Pereira^d, Antonio Sergio Varela Junior^{a,c}, Carine Dahl Corcini^{b,d}, Ednei Gilberto Primel^e, Gilberto Fillmann^f, Camila De Martinez Gaspar Martins^{a,b,c*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

^cInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

^dDepartamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Caixa Postal 354, 96001-970, Pelotas, RS, Brazil

^eEscola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

^fInstituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

Corresponding author: Camila De Martinez Gaspar Martins

Universidade Federal do Rio Grande – FURG / Instituto de Ciências Biológicas
Av. Itália km 8 – Carreiros. 96.203-900 – Rio Grande/RS – Brazil

Phone: + 55 53 393-5162 / FAX: + 55 53 3233-6848 E-mail:camilaos@hotmail.com

Resumo

O clorotalonil é um fungicida presente em tintas anti-incrustantes e em outras formulações usadas na agricultura. É considerado tóxico para organismos não-alvo, mas apesar disso, apenas poucos países o regulamentam em seus critérios de qualidade de água (WQC). Para evidenciar os perigos da contaminação ambiental com clorotalonil e subsidiar critérios para regulamentação do composto, o presente trabalho avaliou efeitos tóxicos do biocida para a espécie de peixe estuarino *Poecilia vivipara*, através de teste de letalidade aguda (96 h) e por meio de biomarcadores bioquímicos, de qualidade espermática e hematológicos. A CL_{50} calculada para *P. vivipara* foi de 40,8 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil, indicando-a como uma espécie de peixe moderadamente sensível. Para análise dos biomarcadores, os peixes foram expostos (96 h) à 1 e 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Observamos que o clorotalonil altera os níveis de pró e antioxidantes em direção ao estresse oxidativo. Nas brânquias detectamos efeito negativo sobre capacidade antioxidante total (ACAP), enquanto no fígado houve uma redução na atividade da Glutathione S-transferase (GST). Mas em ambos os tecidos, nos níveis de Glutathione (GSH) e da atividade da sua precursora Glutathione-cisteína-ligase (GCL) aumentaram. No entanto, o dano oxidativo, representado pela lipoperoxidação (LPO), ocorreu significativamente apenas em nível celular, em eritrócitos e células espermáticas. As hemácias também apresentaram aumento na fluidez de suas membranas, dos níveis de espécies reativas de oxigênio e dano de DNA, sendo estes mais elevados nos peixes expostos à 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Nas células espermáticas, a LPO foi acompanhada por queda na funcionalidade de membrana e funcionalidade mitocondrial, além da redução na motilidade. Com base nestes resultados, podemos confirmar que o clorotalonil é um composto tóxico e que sua ação pode promover efeitos sistêmicos e afetar processos como a respiração, metabolização de xenobióticos, além da fertilidade de *P. vivipara*, recomendada aqui como um bom biomonitor.

Palavras-chave: anti-incrustante, tóxico, biomarcador, estresse oxidativo, eritrócitos, qualidade espermática.

1. Introdução

O clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisoflalonitrila) é um organoclorado pertencente ao grupo das isoflalonitrilas amplamente utilizado no controle de doenças fúngicas em cultivos agrícolas, campo e plantações ornamentais (DeLorenzo e Fulton, 2012; Lourençato et al., 2015). Além disso, esse biocida é empregado na formulação de tintas usadas para evitar a incrustação de organismos em cascos de embarcações, para reduzir os custos com óleo e as atividades de docagem (Almeida et al., 2007; Castro et al., 2011; Dafforn et al., 2011; Godoi et al., 2003; Kotrikla, 2009; Thomas & Brooks, 2010).

Os clorotalonil é considerado um composto tóxico, mas apesar disso, apenas poucos países o regulamentam em seus critérios de qualidade de água (WQCs). O Canadá é um deles, e estabelece regulamentação específica para o clorotalonil em corpos d'água doce (0,18 µg/L) e água salgada (0,36 µg/L) (CCME, 1999). Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (USEPA) está revisando os registros de alguns pesticidas, incluindo o clorotalonil desde 2012 e, portanto, não tem nada estabelecido para este composto no momento (FR 18810, 2012 US). Na Inglaterra o uso de clorotalonil foi revogado na composição de tintas anti-incrustantes (Thomas & Brooks, 2010), mas continua sendo permitido em lavouras agrícolas, sendo que em água doce está legislado em 0,035 e 1,2 µg/L para aplicação em longo e curto período, respectivamente (DEFRA, 2014). A China, por sua vez, aprova o uso do fungicida e não definir valores nem para água doce e nem para água salgada (CCPIA, 2013). No Brasil, não há regulamentação específica para o clorotalonil, assim como na maioria dos países “em desenvolvimento” (CONAMA 357, 2005).

Em relação às suas concentrações ambientais, o clorotalonil tem sido detectado em corpos de água doces e salgadas. No caso de água salgada, ele foi encontrado em portos e marinas da Ásia e Europa (costa do Reino Unido, Grécia e Coreia) em concentrações que variam de <0.001 a 1,38 µg/L (Voulvoulis et al., 2000; Sakkas et al., 2006; Lee et al., 2011). Para água doce, Filizola et al. (2002) reportou concentrações de 0,27 µg/L de clorotalonil em águas de córregos da cidade de Guaíra em São Paulo/Brasil; mas em 1987, foi registrado um dos casos mais preocupantes, quando detectaram-se valores de 272,2 µg/L de clorotalonil em águas subterrâneas no Canadá (Krawchuk & Webster, 1987). É importante levar em consideração que o clorotalonil

possui baixa solubilidade em água (0.6 a 1.2 mg/L à 25°C) e que sua persistência no meio aquático também é baixa. Em água doce, a meia-vida do clorotalonil varia entre 4h à 6 dias aproximadamente (Thomas & Brooks, 2010), porém em águas salgada e salobra o clorotalonil possui uma meia-vida inferior, sendo de aproximadamente 1, 9 dias (Sakkas et al., 2002). Esta baixa persistência pode ser abreviada por processos de biodegradação e fotodegradação na coluna d'água (Caux et al., 1996; Konstantinou e Albanis, 2004; Sakkas et al., 2006; Thomas & Brooks, 2010; Voulvoulis, 2006).

Quanto aos dados de toxicidade do clorotalonil para peixes, a USEPA reportou em um documento publicado em 1999 valores de CL_{50} (96 h) variando entre 23 a 84 $\mu\text{g/L}$ (USEPA, 1999) para as espécies de peixes *Pimephales promelas*, truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, bagre americano *Ictalurus punctatus* e *Lepomis macrochirus*. O relatório também reporta que a exposição aguda (96 h) ao biocida afeta o desenvolvimento embrio-larval de *P. promelas* em concentrações de 3 a 6,5 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Na mesma faixa de exposição (4,4 $\mu\text{g/L}$), Davies et al. (1994) observaram uma diminuição significativa no número de leucócitos da espécie de peixe de água doce *Pseudaphritis urvilli* após exposição por 10 dias ao biocida, sugerindo que as células sanguíneas seriam alvo potencial de toxicidade do clorotalonil.

Um dos mecanismos clássicos da toxicidade deste biocida é a depleção dos níveis de Glutathione (GSH) pela oxidação irreversível deste tripeptídeo (Gallagher et al., 1992). A GSH é uma das principais linhas de defesa do organismo, ela pode ser conjugada à xenobióticos, reação catalisada pela enzima Glutathione S-transferase (GST), afim de torná-los mais solúveis e facilitar sua eliminação do organismo; ou pode interagir diretamente com pró-oxidantes, neutralizando-os.

Diversos parâmetros biológicos como bioquímicos, hematológicos e reprodutivos são analisados em peixes para avaliar-se os efeitos de substâncias tóxicas e, portanto, eles apresentam potencial uso como biomarcadores. Um dos biomarcadores mais investigados são enzimas envolvidas na desintoxicação de xenobióticos e seus metabólitos como enzimas de biotransformação e antioxidantes (Van der Oost et al., 2003). A utilização de peixes como organismos-modelo incluem a facilidade com que teleósteos, especialmente pequenas espécies de aquário, podem ser mantidos em laboratório, e a sensibilidade com que respondem à presença de poluentes. Assim, eles são úteis para estimar a toxicidade de produtos químicos aos ecossistemas aquáticos (Van der Oost et al., 2003). Neste contexto, nós usamos o peixe *Poecilia vivipara* (Ferreira et al., 2012; Machado et al., 2013; INCT-TA, 2015). Trata-se de uma espécie eurialina,

que apresenta alta adaptabilidade e tolerância à variações de temperatura e salinidade (Meffe & Snelson Jr, 1989), sendo encontrada em diversos ecossistemas lagunares (Santos et al, 2011); além de apresentar ampla distribuição ao longo da costa da América do Sul (Ferreira et al., 2012).

Tendo em vista o exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar a toxicidade do clorotalonil através da análise de biomarcadores bioquímicos, hematológicos e qualidade espermática em *Poecilia vivipara* para estimar seus efeitos em organismos não-alvos, bem como, indicar potenciais biomarcadores para a presença do contaminante e, ainda trazer informações úteis para processos de regulamentação e avaliação de risco ecológico com relação ao clorotalonil.

2. Material e Métodos

2.1 *Poecilia vivipara*

O ensaio de toxicidade para determinação da CL50 (concentração letal mediada para 50% dos indivíduos) foram feitos com *P. vivipara* adultos (peso de $0,45 \pm 0,03$ g e comprimento longitudinal de $3,14 \pm 0,07$ cm), coletados num aqueduto que desemboca no estuário da Lagoa dos Patos, na cidade de Rio Grande/RS, Brasil. O aqueduto foi construído para recolher água pluvial da cidade e destiná-la ao estuário. Os animais capturados foram trazidos para o Biotério Aquático do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) em água do local de coleta. Esses peixes foram aclimatados por 15 dias em sistema com água recirculante, equipado com filtro biológico, na salinidade 15 ppt (mistura de água da torneira declorada com água salgada natural). O fotoperíodo foi de 12C:12E e a temperatura média de 20°C.

Para as análises de biomarcadores, foram usados animais adultos (peso de $0,23 \pm 0,01$ g e comprimento longitudinal de $2,25 \pm 0,03$ cm) nascidos e crescidos em cativeiro localizado no Biotério Aquático do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os animais foram cultivados em sistema de cultivo equipado com filtro biológico, sistema *skinner* para a retirada de gordura da água, filtro de esterilização com aplicação de raios ultravioletas, água em fluxo contínuo, temperatura de 20°C controlada com termostato, fotoperíodo de 12C:12E e salinidade de 15 ppt.

Nos tanques de aclimação ou sistema de cultivo, os animais eram alimentados duas vezes ao dia *ad libitum* com ração comercial para peixes (47,5% de proteína, 6,5%

de extrato etéreo, 2% de fibra e 1% de mineral, Tetra Colorbits Granules, TETRA®) até um dia antes dos experimentos, independente se capturados no ambiente ou nascidos em cativeiro. Em todas as condições manteve-se a proporção de 1 g de peixe / L de água. Os parâmetros de qualidade da água foram mensurados diariamente nos meios de aclimação e cultivo, bem como nos meios experimentais e os valores médio foram os seguintes: pH $7,89 \pm 0,02$, amônia $0,19 \pm 0,06$ ppm, nitrito $0,13 \pm 0,07$ ppm, oxigênio dissolvido $8 \pm 0,2$ mg/L, temperatura $19,95 \pm 0,75$ ° C e salinidade 15 ppt.

2.2 Clorotalonil

O clorotalonil (99,3% de pureza) testado neste trabalho foi o químico na sua forma pura (Sigma, Brasil), dissolvido em acetona (99,5% de pureza).

2.2.1 Teste de toxicidade

Os animais provenientes da captura no campo e aclimatados em laboratório foram expostos (96 h) às seguintes concentrações de clorotalonil: 20, 40, 80, 160 e 320 µg/L. Foi preparada uma solução trabalho para cada concentração de exposição a fim de manter a concentração final de acetona no meio em 0,01 %. As concentrações de exposição foram escolhidas com base em testes de toxicidade já realizados com outros organismos (Davies & White, 1985; Mayer, 1987; Ernst et al., 1991; Davies et al., 1994.). Os procedimentos do teste foram feitos de acordo com o guia da OECD 203 para testes de toxicidade aguda de produtos químicos em peixes. O teste contou com um controle negativo sem adição de clorotalonil ou de acetona e um controle veículo com apenas acetona adicionada na mesma proporção dos tratamentos (acetona 0,01%). O número amostral foi de 7 indivíduos/tratamento e manteve-se a proporção de 1g de peixe para 1L d'água. Os peixes foram mantidos em jejum durante o teste e o meio foi renovado a cada 24 h. O experimento foi realizado em triplicata. Ao longo do teste, os peixes que não apresentaram movimentos operculares e estiveram insensíveis à estímulos táteis foram considerados como mortos e retirados do aquário. Esta observação foi feita diariamente no período das 96 h de experimento. Ao final do teste foi registrado o número de indivíduos mortos em cada tratamento por triplicata e estes valores foram usados para o cálculo da CL₅₀ (ver item análise dos dados).

2.2.2. Ensaio subletais

Foram executados dois ensaios para avaliação dos efeitos subletais do clorotalonil. Ambos os ensaios foram executados da mesma forma e com *P. vivipara* adultos provenientes do plantel de cultivo. No primeiro teste analisou-se o consumo de oxigênio e a concentração do biocida nos peixes. No segundo, foram analisados biomarcadores de estresse oxidativo, condições hematológicas e qualidade espermática.

Os animais foram expostos por 96 h à duas concentrações subletais de clorotalonil: 1 e 10 µg/L. Um controle do veículo foi mantido ao longo do teste. Em todos os tratamentos a concentração de acetona foi mantida em 0,002% e, portanto, uma solução-trabalho foi feita para cada concentração de exposição. O meio foi renovado a cada 24 h e uma alíquota (50 mL) foi coletada 0 e 24 horas após o início do teste para determinação de clorotalonil. Os parâmetros físico-químicos mensurados no decorrer do teste estão descritos no item 2.1.

No primeiro experimento, ao final das 96 h de exposição, frascos de vidro foram preenchidos até a boca com água do meio experimental dos aquários onde os animais estavam, o oxigênio inicial foi medido, os organismos transferidos individualmente (n=12, 6 machos e 6 fêmeas) para os frascos, e estes foram fechados hermeticamente de modo a não ficar nenhuma bolha de ar. Após 30 min foi feita a medida da concentração final de oxigênio no frasco (consumo em 30 min). Ao fim do experimento os animais foram eutanasiados (benzocaína 500 µg/L, Sigma), seus pesos registrados e eles foram congelados (- 80° C) para posterior análise da concentração corporal de clorotalonil. As análises de oxigênio foram feitas com oxímetro ((Digimed, modelo DM-4P, São Paulo/Brasil). O consumo de oxigênio foi expresso em mg O₂/ml/g de peso do animal/hora. Ao final do teste, os animais foram eutanasiados e congelados à - 80° C para posterior análises de conteúdo corporal de clorotalonil.

No segundo experimento, 36 animais foram expostos em cada tratamento, na proporção de 2 fêmeas: 1 macho por tratamento. É necessário a manutenção de machos e fêmeas juntos para que haja o estímulo reprodutivo nos machos, pois para realização de análises reprodutivas com os espermatozoides é importante que eles estejam ativos. Ao fim do experimento os animais foram anestesiados em benzocaína (200 mg/L, Sigma) para coleta de sangue (24 animais) e retirada das gônadas (12 machos). O sangue foi coletado por punção da veia caudal com agulha de insulina e foi utilizado heparina como anticoagulante, com o sangue coletado foram preparados esfregaços sanguíneos para análise de micronúcleo e, após, a seringa foi lavada em soro fetal bovino. O soro contendo o sangue foi destinado para análise dos parâmetros

hematológicos expressos tais como: intensidade da fluidez de membrana, fluidez de membrana, fragmentação de DNA, peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio (ver Tabela 1). As gônadas coletadas foram utilizadas para as seguintes análises de qualidade espermática: integridade celular, funcionalidade de membrana, fluidez de membrana, espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, fragmentação de DNA, funcionalidade mitocondrial, e os aspectos de cinética espermática: motilidade total (%) e motilidade progressiva (%). Após a coleta de sangue e retirada das gônadas, os animais foram eutanasiados com dose letal do mesmo anestésico (500 mg/L) (Tabela 2). Dos animais eutanasiados, foram dissecados cérebro, fígado e brânquias que foram estocados à -80° C para posterior análises dos biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo. Como biomarcadores de exposição foram analisados a quantidade de espécie reativas de oxigênio (EROs), capacidade antioxidante total (ACAP), conteúdo de GSH, atividade das enzimas glutamato cisteína ligase (GCL) e glutathione s-transferase (GST). Além disso, foi medida a lipoperoxidação (LPO) considerada como um biomarcador de efeito. Apenas a LPO foi analisada nos 3 tecidos (6 pools de 2 animais para fígado e brânquias e 4 pools de 3 animais para cérebro, totalizando 12 animais por tratamento, sendo eles machos e fêmeas amostrados randomicamente); as demais medidas foram feitas em fígados e brânquias (6 pools de 4 animais por tratamento, totalizando 24 animais e sendo machos e fêmeas amostrados randomicamente). Todos os procedimentos descritos acima foram executados mediante prévia aprovação pela Comissão de Ética em uso Animal – CEUA /FURG (Pq035/2015).

2.3 Procedimentos analíticos

2.3.1. Análises hematológicas

Uma gota do sangue coletado foi utilizada para confecção de esfregaço sanguíneo para o teste de micronúcleo (MN), que expressa dano de DNA, e a seringa foi lavada em 500 µL de soro fetal bovino (FBS). O sangue lavado no soro foi submetido às análises hematológicas descritas acima pelo método de citometria de fluxo. Os esfregaços para MN sanguíneos foram feitos da seguinte forma: foram preparados dois esfregaços sanguíneos por animal em lâminas limpas, logo após, os esfregaços foram lavados com metanol (99,8% de pureza) durante 10 min para fixação e, em seguida, foram corados com Giemsa filtrado e diluído (10% v/v) que embebeu as lâminas durante 30 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas em

temperatura ambiente para secagem (descrito em Josende et al., 2014). A observação dos MNs foi feita em microscópio óptico com aumento de 1000 x e contou-se um total de 1000 eritrócitos por lâmina. A análise de micronúcleos foi feita de acordo os itens descritos por Lemos et al. (2007).

Os parâmetros hematológicos foram avaliados em citômetro de fluxo (Attune Acoustic Focusing[®] - Life Technologies) equipado com laser azul (Argônio 488 nm) e laser violeta (UV 405 nm). As análises foram realizadas pelo software versão 2.1 (Life Technologies). Para a detecção de todas as avaliações foi utilizado laser violeta de 405 nm (450/40, VL-1). As populações de células sanguíneas foram coradas com Hoechst 33342 na concentração de 16.2 mM, exceto na avaliação da fragmentação de DNA que não se utilizou (Martinez-Alborcia et al., 2012). Os detritos celulares foram descartados por gráficos de dispersão FSC x SSC e Hoechst 33342 negativo. Para a leitura de todos os parâmetros, as células coradas com fluoróforos foram adicionada em PBS livre de cálcio e Magnésio (80g de NaCl, 11,5g de KCl, 24g de Na₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄ em 1L água deionizada) usando um total de 20.000 células eritrocitárias por análise.

Para avaliação da fluidez de membrana foi utilizado 2,7 µM de corante merocianina hidrofóbico 540 (M540) e 0,1 µM de YO PRO-1 (Invitrogen - Eugene, OR, EUA) em 10 µL de amostra descongelada por 5 min. Foram avaliadas células de alta fluidez (alta concentração de M540) e baixa fluidez (baixa concentração de M540) apenas para as células íntegras (YO-PRO negativo) (Fernández-Gago et al., 2013). A taxa de fluidez de membrana foi calculada através do número de células com baixa fluidez/ (número de espermatozoides com baixa fluidez + espermatozoides com alta fluidez) *100. Para avaliação da integridade de DNA foi preparado 10 µl de amostra diluída em 5 µl de TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7,2) e 10 µl de triton 1X (Triton X-100, 1%) (v / v), por final foi adicionado corante laranja de acridina, com intervalos de 30 s entre a adição dos reagentes e não ultrapassando o tempo de 2 minutos para realização da leitura em temperatura ambiente (22 °C). As lâminas que apresentavam coloração verde, tinham DNA íntegro, as lâminas que apresentavam coloração vermelha ou laranja tinham o DNA desnaturado (Jenkins et al., 2015). A taxa da integridade do DNA foi determinada pela proporção de células que emitiram fluorescência verde em relação ao número total de células espermáticas analisadas (fluorescência verde, vermelha e laranja). A análise de peroxidação lipídica nas células foi avaliada utilizando a concentração final de 1 µM Bodipy C11 (Hagedorn et al., 2012) em 10 µL de amostra, e incubados por 2 horas a temperatura ambiente (20

°C). A taxa de lipídios peroxidados foi calculada através da intensidade da mediana de fluorescência verde (lipídio peroxidado)/ (intensidade mediana de fluorescência verde + intensidade mediana de fluorescência vermelha (lipídio não peroxidado)) *100. Para a quantificação de EROs nas células eritrocitárias foi utilizado 10 µL de amostra em 2 µM de H₂DCFDA e 5 µM de IP, as células foram encubadas por 30 min em temperatura ambiente (22 °C). As EROs foram estimadas pela mediana da intensidade de fluorescência emitida.

2.3.2 Parâmetros de qualidade espermática

As gônadas de machos foram dissecadas e imediatamente transferidas para tubos cônicos de 1,5 ml contendo 100 µl de solução salina de HBSS (Carneiro et al., 2012). Os tubos foram sacudidos para liberação dos spermatozeugmatas e o esperma foi liberado com a utilização de uma pipeta de 10 µl (Sun et al., 2010). A suspensão do esperma foi utilizada para as análises que se seguem. Para a cinética espermática os espermatozoides coletados foram ativados com 1 µl de amostra e 4 µl de solução NaHCO₃. A preparação foi colocada em lâmina de vidro para leitura em microscópio conectado ao dispositivo *Computer Assisted Sêmen Analysis* (CASA) (Dziewulska et al., 2011). Foram capturados 10 campos tendo ao final no mínimo 1000 células após 10 segundos de ativação. Os parâmetros avaliados foram motilidade total (%) e motilidade progressiva (%) (Sorensen, 1979).

Os diagnósticos de qualidade espermática foram realizadas por citometria de fluxo e os procedimentos metodológicos para as análises de fluidez de membrana, integridade de DNA e peroxidação lipídica seguiram os mesmo procedimentos da análise feitas nas células sanguíneas (item 2.3.2). As demais análises seguem abaixo.

Para a quantificação de EROs foi utilizado 1 µM de H₂DCFDA gerando fluorescência na presença de EROs e 7,5 µM de IP, para observar apenas espermatozoides vivos (IP negativo). As EROs foram estimadas pela mediana da intensidade de fluorescência emitida (Silva et al., 2017). A funcionalidade de membrana analisada foi verificada por meio de fluoróforos Sybr14 e iodeto de propídio (IP) (Minitube, Tiefenbach, Germany). A alíquota do sêmen descongelado foi incubada por 5 min numa sonda fluorescente contendo 0,25 µM de Sybr14 e 7,5 µM IP conforme instruções do fabricante - Minitube. Os espermatozoides foram classificados como não lesados e com membrana funcional (Sybr + / IP-) e lesados e/ou com membrana não funcional (Sybr + / IP +; Sybr- / IP +; Sybr- / IP-) (Figuerola et al., 2015). A

funcionalidade mitocondrial foi analisada com base na metodologia proposta por Liu et al. (2015). Foi adicionado 100 μL do corante Rodamina 123 (Rh 123) em 10 μL de amostra e foi incubada durante 10 minutos a 20 °C. A seguir foi adicionado 5 μL de iodeto de propídio (PI) e a amostra foi incubada novamente por 10 min antes da análise. Logo após, as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência num aumento de 400x. As células que apresentaram acúmulo de Rh 123 (fluorescência verde) foram classificadas com alta funcionalidade mitocondrial, células que não apresentaram acúmulo de Rh 123 (sem fluorescência) foram classificadas com baixa funcionalidade mitocondrial. O índice de funcionalidade mitocondrial foi calculado pela taxa de espermatozoides com alta funcionalidade mitocondrial em relação ao número total de espermatozoides viáveis analisados. A integridade celular foi avaliada através dos fluoróforos com Anexina V-FITC conjugado (fluoresceína) e iodeto de propídio (IP). Para este ensaio, 10 μL de amostras foram coradas com de Anexina-V com FITC (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e com 7,5 μM de Iodeto de propídeo durante 5 minutos (Beirão et al., 2009). Os espermatozoides foram classificados como apoptótico (Anexina + / IP-) verdes; íntegro (Anexina - / IP-) células não coradas; rompidos (Anexina + / IP +) verde e vermelho e (Anexina - / IP +) vermelho. A taxa de apoptose foi calculada como percentagem de apoptóticos (verdes) / (íntegros (não corados) + rompidos (verde e vermelho; vermelho) + apoptóticos (verdes)) *100.

2.3.3 Análises bioquímicas

As amostras de fígado e brânquias foram descongeladas a frio e homogeneizadas manualmente (9:1 peso/volume) no tampão de homogeneização para dosagem de GCL (Gallagher et al., 1992): Tris-HCl (100mM), EDTA (2mM) e Mg^{2+} (5 mM) com pH ajustado em 7,75. Após, as amostras foram centrifugadas (10.000 x g, 20 min à 4°C), o pellet descartado e com sobrenadante foram feitas as análises que se seguem. A quantificação de EROs foi realizada com base na metodologia proposta por Viarengo et al. (1999). Aos sobrenadantes das amostras homogeneizadas foi adicionado um tampão de reação (HEPES 30 mM, KCl 200 mM e MgCl_2 1 mM) e H_2DCFDA (Invitrogen) que fica fluorescente na presença de EROs. Os comprimentos de onda gerados pela fluorescência são de 485 nm excitação e 520 nm de emissão e foram analisados em Fluorímetro (VICTOR²™ Multilabel Counter model 1420-051. Turku, Finlândia). A ACAP foi medida com base na metodologia proposta por Amado et al. (2009), através da detecção fluorimétrica de EROs. Adicionou-se em microplacas, juntamente com as

amostras um gerador de radicais, o peroxil, 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dicloridrato (ABAP, 4 mM). Num fluorímetro, as amostras foram incubadas à 35° C, temperatura em que o ABAP é decomposto e a ACAP é estimada por fluorimetria (excitação: 485 nm; emissão: 520 nm) através da diferença entre a área gerada pelas EROs com e sem ABAP, relativa à fluorescência registrada sem ABAP. A concentração de glutathiona reduzida (GSH) e atividade da glutamato cisteína ligase (GCL) foram medidas seguindo metodologia proposta por White et al. (2003). As amostras foram incubadas num tampão de reação de GCL (Tris 400 mM, ATP 40 mM, ácido L-glutâmico 20 mM, EDTA 2,0 mM, borato de sódio 20 mM, serina 2 mM, MgCl₂ 40 mM) na presença e ausência de cisteína. Para a leitura das amostras foi adicionado as placas uma solução de NDA (2,3 naftalenedicarboxialdeído) que reage com GSH formando γ -Glu-Cys, sendo possível medir a atividade de GCL. A concentração de GSH é medida pelos seus níveis basais. A cor das amostras foi mensurada em Fluorímetro (VICTOR²™ Multilabel Counter model 1420-051. Turku, Finlândia). A atividade da GST foi determinada pela conjugação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), utilizado como substrato, e seguindo demais procedimentos descritos por Keen et al. (1976). As medidas de EROs, ACAP, GSH, GCL e GST foram relativizadas pela quantidade de proteína contida no sobrenadante, que foi determinada pelo método do biureto (kit comercial, Doles, Goiânia/Brasil).

A metodologia para determinação de lipoperoxidação (LPO) consistiu no teste de T-BARS, proposto por Oakes e Van der Kraak (2003), que quantifica o estresse oxidativo através do malondialdeído (MDA), composto resultante da degradação de lípidios causado por ERO. Este composto (MDA) reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e quando em temperatura alta gera um cromógeno que pode ser medido por espectrofluorimetria. Os resultados foram normalizados pelo peso úmido (mg) dos tecidos (cérebro, fígado e brânquias).

2.3.4 Quantificação de clorotalonil

O clorotalonil foi analisado nos peixes e nas águas experimentais. Nos peixes foi usado o método de VA-MSPD para extração do clorotalonil e em seguida sua quantificação por sistema GC-ECD (cromatografia de fase gasosa - detector de captura de elétrons). As condições fixadas para extração dos compostos foram 0,2 g de amostra, 2,0 g de C18, 0,2 g de Na₂SO₄, 5 mL de acetato de etila acidificado com 35 mmol/L de ácido acético, 5 minutos na etapa de homogeneização e 9 minutos de agitação em

vórtex. Posteriormente, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a $10179 \times g$ e uma alíquota foi retirada para análise. As condições cromatográficas (sistema GC-ECD) para a quantificação de clorotalonil, foram baseadas no estudo de Sakkas et al. (2002), sendo elas: $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ para temperatura do detector, corrente de 1,5 nA, temperatura de injeção $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, vazão da coluna Restek Rtx[®]-1 (100% dimetilpolissiloxano) 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μm (tamanho de partícula), 1,5 mL/min, gás de arraste H₂ e fonte de radiação ⁶³Ni. O programa de aquecimento do forno foi de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), seguido de um aumento para $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ (13 min) com uma taxa de $21\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, totalizando 16 minutos de tempo total de análise.

As amostras de clorotalonil nos meios experimentais foram analisadas pelo mesmo sistema GC-ECD (Perkin Elmer, modelo Clarus 500). Uma amostra de 40 mL de água foi extraída pelo método de Extração de Fase Sólida (EFS) utilizando cartuchos C18 previamente ativados com 4 mL de acetato de etila e 4 mL de água ultrapura. Durante a extração foi mantido o fluxo de 1 mL min^{-1} . Após a passagem de toda amostra pelos cartuchos, os mesmos foram secos com auxílio da bomba de vácuo por um 1 hora e congelados até o dia da análise. Para quantificar os analitos, os cartuchos foram eluídos com 2 alíquotas de 2 mL de acetato de etila. Os eluatos foram concentrados a 200 μL sob fluxo suave de nitrogênio, sendo aferidos a 1 mL com acetato de etila. No extrato final foi adicionado 10 ng.mL^{-1} de PCB30 como padrão interno na análise por GC-ECD. Na sequência, os extratos foram analisados no GC-ECD (Perkin Elmer modelo Clarus 500), equipado com um amostrador automático, injetor Split/Splitless. A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 2 minutos a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente elevada a $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ a taxa de $15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (por 5 minutos). A quantificação foi feita através de uma curva de calibração em solvente utilizando diluições sucessivas de uma solução estoque (100 ng/mL) preparada com clorotalonil (99,3 %) em acetato de etila. O limite de quantificação (10x o sinal ruído do equipamento) foi $0.1\text{ }\mu\text{g/L}$ (Harino et al., 2005; Martinez & Barceló, 2001).

2.4 Análise dos dados

A concentração letal mediana para 50 % dos animais (CL_{50}) foi calculada pelo Programa Trimmed-Speraman-Karber. Todos os outros resultados foram expressos como média \pm erro padrão e submetidos a uma análise de variância de um fator

(ANOVA) seguido do teste *a posteriori* de Tukey, com nível de significância estatística superior a 95% ($\alpha = 0,05$). Os pressupostos da ANOVA (normalidade e homocedasticidade) foram previamente checados. Para a análise da normalidade, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, a análise de variância foi realizada com subsequente comparação entre as médias através do teste Diferença Menos Significativa (LSD).

3. Resultados

O valor de CL_{50} calculado a partir do teste de letalidade foi de 40,8 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil (37,56 – 44,32 $\mu\text{g/L}$, limite superior e inferior para toxicidade, respectivamente). Não houve mortalidade nos controles. Com base nesse teste foram escolhidas duas concentrações subletais: 1 e 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil para análise de biomarcadores.

O método aplicado para as análises de clorotalonil na água foi eficiente e confirmou a presença do biocida no meio e nas concentrações desejadas. Os valores medidos foram: $1,12 \pm 0,15 \mu\text{g/L}$ em 0 h e $0,33 \pm 0,02 \mu\text{g/L}$ em 24 h de experimento para a concentração nominal de 1 $\mu\text{g/L}$; e $10,55 \pm 1,17$ em 0 h e $0,56 \pm 0,07 \mu\text{g/L}$ em 24 h para a concentração nominal de 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Os valores para o controle veículo (com apenas acetona 0.002%) ficaram abaixo do limite mínimo de detecção do método (<LOQ). Estes dados admitem a baixa meia-vida do clorotalonil em água salobra, a qual pode ter sido encurtada pela presença de luz (fotoperíodo 12C:12E) e talvez de bactérias presentes no meio, pois este foi feito misturando-se água da torneira declorada e água salgada natural.

Os cromatogramas apresentados na Figura 1, nos mostram que a metodologia escolhida para medir clorotalonil na matriz peixe foi eficaz (Figura 1A), no entanto, o procedimento ainda necessita de refino para ficar mais apurado; pois, apesar de conseguimos detectar a presença do clorotalonil em *P. vivipara*, sua concentração ficou abaixo do LOQ que é de 125 ng/g de tecido úmido (Figura 1B). De qualquer forma, indicamos aqui que os animais foram capazes de incorporar o composto ao longo do período de exposição.

Com relação à análise de biomarcadores, iniciamos falando do consumo de oxigênio total do animal. Não foi observado um efeito do clorotalonil nas concentrações testadas de 1 $\mu\text{g/L}$ ($0,0252 \pm 0,0124 \text{ mg O}_2 \text{ consumido/mL/g/h}$) e 10 $\mu\text{g/L}$ ($0,0250 \pm$

0,00745 mg O₂ consumido/mL/g/h), nem entre si e nem em relação aos animais do grupo controle (0,0222 ± 0,0064 mg O₂ consumido/mL/g/h). Por outro lado, os parâmetros oxidativos apresentados na Figura 2, mostram nitidamente um efeito do clorotalonil mais pronunciado nas brânquias do que no fígado. Para a quantificação de EROs, não há diferença significativa entre os tratamentos em ambos os tecidos (Figura 2A), mas a capacidade antioxidante total é significativamente afetada nas brânquias dos animais expostos ao biocida (Figura 2B).

A concentração de GSH, por sua vez, teve um aumento significativo no fígado e brânquias de peixes expostos ao tratamento com clorotalonil à 10 µg/L (Figura 3A). A atividade de GCL também aumentou com a presença de clorotalonil em perfil semelhante ao da GSH (Figura 3B). Por outro lado, a atividade da enzima GST reduziu significativamente no fígado em ambas as concentrações de exposição (Figura 4), enquanto que nas brânquias houve um aumento significativo na atividade da enzima na concentração 10 µg/L de clorotalonil (Figura 4). Para dano oxidativo, os órgãos analisados foram fígado, brânquias e cérebro e não foi observada LPO nas condições experimentais usadas (Figura 5).

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises hematológicas. A fluidez de membrana dos eritrócitos apresentou aumento significativo no tratamento de 10 µg/L de clorotalonil e o mesmo padrão ocorreu para a intensidade de fluidez das células. Nesta mesma concentração de exposição, houve um aumento significativo de EROs nas hemácias; enquanto que a LPO foi detectada em ambos os tratamentos com clorotalonil. Um aumento significativo de MN também foi observado para as 2 concentrações do biocida testadas aqui (1 e 10 µg/L).

Na Tabela 2 temos os resultados das análises feitas nas células espermáticas. A integridade celular e funcionalidade da membrana tiveram uma redução estatisticamente significante na maior concentração de exposição (10 µg/L de clorotalonil). Houve um aumento significativo de EROs nas células espermáticas expostas a 10 µg/L de clorotalonil. Ambas exposições ao clorotalonil (1 e 10 µg/L) causaram LPO e redução da funcionalidade mitocondrial. Em relação a cinética espermática, os parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva também tiveram uma redução significativa em ambos os tratamentos (1 µg/L e 10 µg/L de clorotalonil).

4. Discussão

No presente estudo a toxicidade do clorotalonil para o peixe *P. vivipara* foi determinada por meio de teste de toxicidade clássico (CL_{50}) e através da análise de marcadores biológicos. O uso de biomarcadores como ferramentas para detectar efeitos de agentes tóxicos tem tido um crescente uso nas últimas décadas, pelo fato de anteciparem respostas com maior relevância ecológica como, por exemplo, atraso no desenvolvimento, déficit reprodutivo e mortalidade, situações estas mais difíceis de reverter. Ainda, através dos biomarcadores podemos saber se concentrações “aparentemente” não tóxicas ou regulamentadas não estão realmente provocando toxicidade. De qualquer forma, os efeitos biológicos ocorrem após o contato e absorção dos xenobióticos pelos organismos. Neste sentido, apesar de não termos conseguido quantificar o clorotalonil nos peixes, nós conseguimos detectar o composto, indicando que ele foi absorvido e acumulado em algum grau pelos indivíduos, o que possivelmente provocou os efeitos tóxicos relatados aqui. Outra questão importante deste estudo é que pela primeira vez as metodologias empregadas nas análises sanguíneas e dosagem de clorotalonil no peixe e no meio são descritas para as condições experimentais e modelo biológico escolhidos.

No que diz respeito à CL_{50} , o valor de 40,8 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil calculado para *P. vivipara* pode ser considerado como semelhante àqueles disponíveis para outras espécies de peixes, os quais variam de 23 à 84 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil (Davies & White, 1985; Ernst et al., 1991; USEPA, 1999). Para invertebrados aquáticos, os resultados de toxicidade do clorotalonil são mais variados. A CL_{50} (96 h) para as espécies de crustáceos *Paratya australiensis* e *Astacopsis gouldi* (fase larval) é de 16 e 12 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil, respectivamente (Davies et al., 1994). Para *Daphnia magna*, foram reportados valores de CL_{50} (48 h) variando entre 130 e 200 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil, e para o mexilhão *Mytilus edulis* e o bivalve *Mya arenaria*, ambos adultos, as CL_{50} (96 h) apresentadas foram de 5,94 e 35 mg/L de clorotalonil, respectivamente (Ernst et al., 1991). Com base nestes dados, podemos inferir que a *P. vivipara* é moderadamente sensível ao biocida e que na fase adulta, os moluscos são mais tolerantes dos que os peixes, possivelmente, por terem alta capacidade de bioacumulação de compostos químicos em seus tecidos.

Com relação à exposição aguda dos peixes à níveis subletais de clorotalonil (1 e 10 $\mu\text{g/L}$), a Figura 2 confronta duas análises bem gerais, as quantificações de EROs e a capacidade antioxidante total. Ao mesmo tempo que o clorotalonil mostrou tendência de aumento em EROs nas brânquias (não significativo) ele reduz significativamente sua

capacidade antioxidante total, indicando, em última análise uma situação de estresse oxidativo decorrente de um desbalanço entre pró e antioxidantes. Já para o fígado, o clorotalonil não provoca alteração nestes parâmetros. Os processos de toxicidade no fígado e nas brânquias podem ocorrer de maneiras distintas dada suas morfologias e funções. Em peixes, as brânquias são responsáveis pelas trocas gasosas e processos iônico e osmorregulatórios, estão em contato direto com o meio externo e possuem uma alta superfície de absorção, logo, o contaminante dissolvido na água é absorvido pelo órgão. A chegada de um xenobiótico no fígado, geralmente, ocorre via dieta (ingestão de comida ou água), onde o contaminante absorvido no intestino chega ao fígado pela circulação sanguínea. O fígado é principal órgão de detoxificação de peixes, responsável por metabolizar xenobióticos para sua excreção.

Por serem órgãos-alvos das mais diversas substâncias dissolvidas no meio, as brânquias e o fígado contam com um sistema protetor altamente sensível. Neste sentido, analisamos as concentrações de GSH e atividades da GCL e GST, após exposição dos peixes ao biocida. A GSH e GCL estão intimamente relacionadas uma vez que a GCL catalisa reação precursora da síntese de GSH. O GSH, por sua vez, age como doador de prótons facilitando assim a remoção de EROs. Logo, o aumento na atividade de GCL implica numa maior concentração de GSH nos tecidos em busca do combate a pró-oxidantes. Além disso, o GSH atua como cofator para a GST na metabolização de xenobióticos, afim de torná-los mais solúveis. A GST não apenas catalisa as reações de conjugação com o GSH, mas também reage com produtos da peroxidação lipídica, neutralizando-os. Nossos resultados mostram um aumento nas concentrações de GCL e GSH em ambos os tecidos fígado e brânquias após exposição dos peixes à 10 µg/L de clorotalonil (Figura 3). Estes dados nos informam que o sistema antioxidante está ativado e que a GSH está atuando na detoxificação do xenobiótico. O mesmo padrão de resposta foi observado por Gallagher & Di Giulio (1992). Os autores reportam um aumento das concentrações de GSH no fígado, rim posterior e brânquias do bagre americano *Ictalurus punctatus* em 72 h de exposição à 13 µg/L de clorotalonil, e um aumento não concomitante nas concentrações de GSH, de cisteína e na atividade da GCL em fígado e brânquias do mesmo peixe exposto à 42 µg/L do biocida. No caso, a concentração de 42 µg/L de clorotalonil é subletal para a espécie *I. punctatus* (CL₅₀ 52 µg/L de clorotalonil) (Gallagher & Di Giulio, 1992).

Em um dos seus trabalhos, Gallagher et al. (1992) ainda reporta que a GSH é um peptídeo-alvo do clorotalonil, uma vez que ele provoca sua oxidação e posterior

inativação, já que não há recuperação da Glutathione Oxidada (GSSG) para Glutathione Reduzida (GSH), que é a forma capaz de interagir com EROs e outros xenobióticos. Sendo assim, podemos supor que a exposição ao clorotalonil (10 µg/L) induz um aumento na atividade de GCL e dos níveis de GSH com o intuito de detoxificação do composto e inativação das EROs, mas de fato o processo pode ser prejudicado, devido a oxidação irreversível da molécula de GSH. Em relação GST, o clorotalonil induz de alguma forma uma inibição da sua atividade no fígado e aumento nas brânquias (Figura 4). Estudos conduzidos por Davies (1985) mostraram um aumento na atividade de GST nos fígados dos peixes *Salmo gairdneri*, *Galaxias maculatus* e *Galaxias truttaceus* com simultâneo acúmulo na concentração de GSH na bile destes animais, após exposição aguda ao clorotalonil (3 a 10 µg/L). Em outro estudo Davies et al. (1994) observaram aumento na atividade de GST no fígado da truta arco-íris *O. mykiss* a partir da exposição à 0,8 µg/L de clorotalonil, enquanto o GSH teve aumento da sua concentração no fígado seguindo exposição (10 dias) à 1,4 µg/L do composto. Um efeito excitatório na atividade da GST pelo clorotalonil vai no sentido da sua detoxificação, mas se inibida a enzima, este processo pode ser prejudicado.

Os perfis de resposta à exposição ao clorotalonil apresentados pelo fígado e brânquias foram diferentes, o que possivelmente está associado às questões morfológicas e fisiológicas já comentadas. Outros estudos com peixes evidenciam esta resposta diferencial entre os tecidos. Por exemplo, Fernandes et al., (2008) mostraram que as enzimas antioxidantes podem ter ação tecido-específica. Em seu trabalho com a tainha *Liza saliens* observaram aumento da atividade da Catalase (CAT) no fígado para o combate de peróxido de hidrogênio e aumento da atividade da Superóxido-desmutase (SOD) nas brânquias para combater a presença de ânion superóxido, seguindo exposição dos peixes ao cobre. Ventura-Lima et al. (2009), por sua vez, apontam que o fígado e as brânquias da carpa comum *Cyprinus carpio* desenvolvem diferentes estratégias de proteção contra a toxicidade do Arsênio.

Os resultados mostrados e discutidos acima indicam que *P. vivipara* está sob situação de estresse o que poderia causar um aumento no seu gasto energético e possível perda de matéria, refletindo de forma mais ampla numa alteração no seu consumo de oxigênio. Nós não vimos esse efeito do clorotalonil em *P. vivipara*, mas Ponopal et al. (2009) reportaram um efeito negativo do clorotalonil no consumo de oxigênio do peixe *Carassius gibelio* exposto à 0,7 e à 12 µg/L do biocida. Recentemente, foi publicado um estudo mostrando que o clorotalonil suprime genes relacionados com a gliconeogênese

e com a produção de ATP no zebrafish *Danio rerio* (Garayzar et al., 2016), reforçando outras vias de toxicidade do biocida.

Por outro lado, o estresse decorrente da exposição do clorotalonil pode também se manifestar como dano oxidativo. Neste sentido, apesar de não termos observado LPO no fígado, cérebro e brânquias de *P. vivipara*, nós a observamos nos eritrócitos e nos espermatozoides, sugerindo que as células quando isoladas são mais sensíveis ao clorotalonil do que quando organizadas em tecidos. A LPO representa a oxidação dos lipídios de membrana e pode, portanto, afetar a fluidez das mesmas, interferindo no poder seletivo de uma célula ou organela. No caso das células sanguíneas e dos espermatozoides, a funcionalidade e a fluidez de membrana foram negativamente afetadas pela exposição ao clorotalonil (Tabelas 1 e 2, respectivamente), mas nas hemácias, nós também verificamos aumento de EROs e dano de DNA representado por um aumento na incidência de MNs (Tabela 1). Segundo Al-Sabti e Metcalfé (1995) os resultados genotóxicos de dano ao DNA não irão aparecer até que ocorra replicação do DNA e divisão celular após o dano ter ocorrido; além disso tem que se levar em consideração a existência de várias vias bioquímicas que reparam os danos ao DNA antes dos acontecimentos genotóxicos tomarem proporções maiores.

Em peixes é comum a existência de MNs espontâneos (Al-Sabti & Metcalfé, 1995), o que poderia explicar a incidência do dano nos peixes do tratamento controle, porém em menor frequência do que nos peixes expostos ao clorotalonil. Apesar de clorotalonil não ser agente genotóxico clássico, nós encontramos dano de DNA, bem como no estudo conduzido por Godard et al. (1999), em que observaram dano de DNA em roedores por ensaio cometa, em doses a partir de 132 µg/L. De fato, o clorotalonil pode não estar provocando o dano diretamente no DNA, mas por outros meios como o aumento de EROs livres. O estresse oxidativo foi comprovado nas análises sanguíneas, mostradas na Tabela 1, sendo, portanto, um indicativo da causa dos MNs observados. Ainda, podemos confirmar que a análise de micronúcleo é um bom biomarcador de genotoxicidade e o indicamos para ser utilizado por órgãos ou agências de monitoramento ambiental, por apresentar uma série de vantagens, tais como baixo custo, rapidez de análise, pode ser reproduzido em diferentes espécies e tecidos e resposta em amplo espectro frente a uma variada gama de agentes genotóxicos (Flores & Yamaguchi, 2009).

No caso dos espermatozoides, a integridade celular também foi prejudicada pelo clorotalonil (Tabela 2). As células espermáticas dependem das suas membranas íntegras

para que haja fertilização, pois trata-se de um processo que envolve a fusão das membranas das células espermáticas e dos oócitos (Aitken, 1995). Adicionalmente, em ambas as concentrações de clorotalonil, a funcionalidade mitocondrial e a motilidade espermática apresentaram-se reduzidas. De fato, a atividade mitocondrial interfere diretamente na motilidade espermática já que a mitocôndria é fundamental para produção de energia necessária para a batida flagelar (Lahnsteiner et al., 2004). Esses parâmetros se apresentaram mais sensíveis que os outros para *P. vivipara*, pois reduziram já na menor concentração de exposição (1 µg/L de clorotalonil). A funcionalidade mitocondrial e a motilidade dos espermatozoides tem se mostrado parâmetros bem sensíveis para *P. vivipara* e outras espécies de peixes como *D. rerio*, *Jenynsia multidentata*, *C. carpio* e *Clarias gariepinus* frente à exposição a diferentes poluentes ambientais (Acosta et al., 2016; Gerber et al., 2016; Lopes et al., 2014; Rurangwa et al., 2002; Sánchez et al., 2017).

Com base no exposto, concluímos que a exposição ao clorotalonil é tóxica para o peixe *P. vivipara*, sendo o nível celular o mais sensível, pelo menos para as concentrações de 1 e 10 µg/L do composto. Podemos também considerar o efeito do clorotalonil como sistêmico, por ter alcançado diferentes alvos nos organismos, desde brânquias e fígado, até células sanguíneas e espermáticas. Nossos resultados deixam claro que o estresse oxidativo é um dos mecanismos da toxicidade do clorotalonil. Os danos celulares observados aqui podem afetar a sobrevivência individual e da espécie, uma vez que comprometem estruturas fisiológicas vitais e células reprodutivas. Apesar de termos usado altas concentrações do biocida quando comparadas às suas medidas ambientais, nossos resultados de exposição aguda, ainda assim, são úteis para determinar ou prever o que aconteceria com os animais, em níveis de organização maiores, quando expostos cronicamente ao biocida no ambiente; e servem, ainda, como base para procedimentos de avaliações de risco ecológico. Por fim, este trabalho confirma o *P. vivipara* como um potencial biomonitor, corroborando com os dados gerados a partir dos estudos toxicológicos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Toxicologia Aquática (INCT-TA, 2017), e reforçando seu uso em testes toxicológicos de maneira geral.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao MSc. Augusto Vieira, a Dra. Liziane Cardoso (LACOM/FURG) e a MSc. Fiamma Abreu (CONECO/FURG) pelas análises químicas de clorotalonil. Agradecemos a FINEP (processo 0114014101/1111/13 pelo financiamento do projeto Micropoluentes Orgânicos Empregados em Sistemas Anti-incrustantes: Comportamento Ambiental, Toxicidade e Biorremediação (AIBRASIL II) no qual este trabalho se enquadra. FCL é bolsista CAPES-Brasil e GF é pesquisador produtividade CNPq (Pq 312341/2013-0).

6. Referência

Acosta, I. B., Varela Junior, A. S., Silva, E. F., Cardoso, T. F., Caldas, J. S., Jardim, R. D., Corcini, C. D., 2016. Effects of exposure to cadmium in sperm cells of zebrafish, *Danio rerio*. *Toxicology Reports*, 3, 696-700.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.08.002>

Aitken, R. J., 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7, 659-668. <https://doi.org/10.1071/RD9950659>

Almeida, E., Diamantino, T. C., Sousa, O., 2007. Marine paints: the particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, 59, 2-20.
<https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2007.01.017>

Al-Sabti, K., Metcalfe, C. D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343, 121-135. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0)

Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramosa, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., Yunes, J. S., Monserrat, J. M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the total environment*, 407, 2115-2123.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>

Beirão, J., Soares, F., Herráez, M. P., Dinis, M. T., Cabrita, E., 2009. Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. *Theriogenology*, 72, 1251-1261. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.021>

Castro, Í. B., Westphal, E., Fillmann, G., 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*, 34, 1021-1031.

Caux, P.-Y., Kent, R. A., Fan, G. T., Stephenson, G. L., 1996. Environmental fate and effects of chlorothalonil: A Canadian perspective. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 26, 45-93. <http://dx.doi.org/10.1080/10643389609388486>

CCME. Appendix XVII, Canadian water quality guidelines: Updates Chlorothalonil, 1994. In: Canadian water quality guidelines, Canadian Council of Resource and Environment Ministers.

CONAMA. Resolução nº 357, Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, 2005. *Diário Oficial da União*, Brasil.

Dafforn, K. A., Lewis, J. A., Johnston, E. L., 2011. Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 453-465. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.012>

Davies, P. E., 1985. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. III. Metabolism, enzymatics and detoxication in *Salmo* spp. and *Galaxias* spp. *Aquatic toxicology*, 7, 277-299. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(85\)90045-1](https://doi.org/10.1016/0166-445X(85)90045-1)

Davies, P. E., Cook, L. S. J., Goenarso, D., 1994. Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 1341-1354. <https://doi.org/10.1002/etc.5620130816>

Davies, P. E., White, R. W. G., 1985. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. I. Lethal levels for *Salmo gairdneri*, *Galaxias maculatus*, *G. truttaceus* and *G. auratus* and the fate of ¹⁴C-TCIN in *S. gairdneri*. *Aquatic toxicology*, 7, 93-105. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(85\)90038-4](https://doi.org/10.1016/0166-445X(85)90038-4)

DeLorenzo, M. E., Fulton, M. H., 2012. Comparative risk assessment of permethrin, chlorothalonil, and diuron to coastal aquatic species. *Marine pollution bulletin*, 64, 1291-1299. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.05.011>

DEFRA - DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT FOOD AND RURAL AFFAIRS WATER. UNITED KINGDOM - UK. Framework directive implementation in England and wales: new and updated standards to protect the water environment, 41 p., 2014.

Dziewulska, K., Rzemieniecki, A., Domagała, C. J., 2011. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. *Theriogenology*, 76, 300-311. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.007>

Ernst, W., Doe, k., Jonah, R., Young, J., Julien, G., Hennigar, R., 1991. The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 21, 1-9. <https://doi.org/10.1007/BF01055550>

Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Ferreira, M., Salgado, M. A., 2008. Oxidative Stress Response in Gill and Liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz-Paramos Coastal Lagoon, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 262-269. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9108-z>

Fernández-Gago, R., Domínguez, J. C., Martínez-Pastor, F., 2013. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology*, 80, 400-410. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.003>

Ferreira, R. S., Monserrat, J. M., Ferreira, J. L. R., Kalb, A. C., Stegeman, J., Bainy, A. C. D., Zanette, J., 2012. Biomarkers of organic contamination in the South American fish *Poecilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75, 1023-1034. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2012.697813>

Figuerola, E., Merino, O., Risopatrón, J., Isachenko, V., Sánchez, R., Effer, B., Isachenko, E., Farias, J. G., Valdebenito, I., 2015. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology*, 83, 238-245. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.015>

Filizola, H. F., Ferracini, V. L., Sans, L. M. A., Gomes, Ferreira, C. J. A., 2002. Monitoring and evaluation of the risk of contamination by pesticide in surface water and groundwater in the Guaíra region, São Paulo, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37, 659-667. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2002000500011>

Flores, M., Yamaguchi, M. U., 2009. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. *Saúde e Pesquisa*, 1, 337-340.

Gallagher, E. P., Canada, A. T., Di Giulio, R. T., 1992. The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquatic Toxicology*, 23, 155-168. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90049-S](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90049-S)

Gallagher, E. P., Di Giulio, R. T., 1992. Glutathione-mediated chlorothalonil detoxification in channel catfish gills. *Marine Environmental Research*, 34, 221-226. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(92\)90111-X](https://doi.org/10.1016/0141-1136(92)90111-X)

Garayzar, A. B. S., Bahamonde, P. A., Martyniuk, C. J., Betancourt, M., Munkittrick, K. R., 2016. Hepatic gene expression profiling in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the fungicide chlorothalonil. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, 19, 102-111. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.04.004>

Gerber, M. D., Varela Junior, A. S., Caldas, J. S., Corcini, C. D., Lucia Jr, T., Corrêa, L. B., Corrêa, É. K., 2016. Toxicity evaluation of parboiled rice effluent using sperm quality of zebrafish as bioindicator. *Ecological Indicators*, 61, 214-218. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.09.016>

Godard, T., Fessard, V., Huet, S., Mourot, A., Deslandes, E., Pottier, D., Ollivier Hyrien, O., Sichel, F., Gauduchon, P., Poul, J.-M., 1999. Comparative in vitro and in vivo assessment of genotoxic effects of etoposide and chlorothalonil by the comet assay. *Mutation Research*, 444, 103–116. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00100-X)

Godoi, A. F. L., Favoreto, R., Santiago-Silva, M., 2003. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. *Química nova*, 26, 708-716.

Hagedorn, M., McCarthy, M., Carter, V. L., Meyers, S. A., 2012. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *PloS one*, 7, e39397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039397>

Harayashiki, C. A. Y., Varela Junior, A. S., Machado, A. A. S., Cabrera, L. C., Primel, E. G., Bianchini, A., Corcini, C. D., 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquatic toxicology*, 142, 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.006>

Harino, H., Yoshiaki Mori, Y., Yamaguchi, Y., Shibata, k., Senda, T., 2005. Monitoring of Antifouling Booster Biocides in Water and Sediment from the Port of Osaka, Japan. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 48, 303-310. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0084-2>

INCT-TA. . Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática. <http://www.inct-ta.furg.br/>. 2017. Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq.

Jenkins, J. A., Draugelis-Dale, R. O., Pinkney, A. E., Iwanowicz, L. R., Blazer, V. S., 2015. Flow cytometric method for measuring chromatin fragmentation in fixed sperm from yellow perch (*Perca flavescens*). *Theriogenology*, 83, 920–931. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.028>

Josende, M. E., Tozetti, A. M., Alalan, M. T., Filho, V. M., Ximenez, S. S., Martins, S. E., 2014. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators*, 49, 83-87.

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.10.007>

Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B., 1976. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 251, 6183-6168.

Konstantinou, I. K., Albanis, T. A., 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International*, 30, 235-248. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00176-4)

Kotrikla, A., 2009. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *Journal of Environmental Management*, 90, 77-85.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.07.017>

Krawchuk, B. P., Webster, G. R. B., 1987. Movement of pesticides to ground water in an irrigated soil. *Water Pollution Research Journal of Canada. Res. J. Can*, 22, 129-146.

Lahnsteiner, F., Mansour, N., Berger, B., 2004. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 65, 1283-1297. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00528.x>

Lee, S., Chung, J., Won, H., Lee, D., Lee, Y.-W., 2011. Analysis of antifouling agents after regulation of tributyltin compounds in Korea. *Journal of Hazardous Materials*, 185, 1318-1325. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.10.048>

Lemos, C. T., Rodel, P. M., Terra, N. R., Oliveira, N. C. D., Erdtmann, B., 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 391-401.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.01.004>

Liu, Q., Wang, X., Wang, W., Zhang, X., Xu, S., Ma, D., Xiao, Z., Xiao, Y., Li, J., 2015. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiology Biochemistry*, 41, 413–422.
<https://doi.org/10.1007/s10695-014-9993-9>

Lopes, F. M., Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Silva, A. C., Guazzelli, V. G., Tavares, G., Rosa, C. E., 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic toxicology*, 155, 322-326.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.006>

Lourençato, L. F., Favaretto, N., Hansel, F. A., Scheer, A. P., Luz, L. F. L. Jr., Souza, L. C. P., Dieckow, J., Buch, A. C., 2015. Effects on Water Quality of Pesticide use in Farmland Under Intensive Soil Management in Southern Brazil. *International Journal of Plant & Soil Science*, 5, 155-166.

Martinez-Alborcia, M. J., Valverde, A., Parrilla, I., Vazquez, J. M., Martinez, E. A., Roca, J., 2012. Detrimental Effects of Non-Functional Spermatozoa on the Freezability of Functional Spermatozoa from Boar Ejaculate. *PloS One*, 7, e36550.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036550>

Martínez, K., Barceló, D., 2001. Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC–APCI–MS. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 370, 940-945.
<https://doi.org/10.1007/s00244-004-0084-2>

Meffe, G.K., Snelson Jr, F. F., 1989. An ecological overview of poeciliid fishes. *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*. Department of Biological Sciences University of Central Florida Orlando.

Oakes, K. D., Van Der Kraak, G. J., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63, 447-463. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)

Ponepal, M. C., Paunescu, A., Marinescu, A. G., Draghici, O., 2009. Effect of the fungicide chlorothalonil (Bravo) on some physiological parameters in prussian carp. Scientific papers, "Ion Ionescu de la Brad" University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi, Horticulture series, 52, 1157-1162.

Rurangwa, E., Biegniewska, A., Skorkowskib, E. F., Olleviera, F., 2002. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 131, 335-344. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00019-4)

Sakkas, V. A., Konstantinou, I. K., Lambropoulou, D. A., Albanis, T. A., 2002. Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of Greece. *Environmental Science and Pollution Research*, 9, 327-332.

Sakkas, V. A., Konstantinou, I. K., Albanis, T. A., 2006. Photochemical fate of organic booster biocides in the aquatic environment. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 5, 171-200. https://doi.org/10.1007/698_5_054

Sánchez, J. A. A., Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Silva, J. C., Primel, E. G., Caldas, S., Klein, R. D., Martins, C. M. G., 2017. Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere*, 177, 200-210. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.147>

Silva, A. C. G., Almeida, D. V., Nornberg, B. F., Pereira, J. R., Pires, D. M., Corcini, C. D., Varela Jr, A. S., Martins, L. F., 2017. Reproductive parameters of double transgenic zebrafish (*Danio rerio*) males overexpressing both the growth hormone (GH) and its receptor (GHR). *Transgenic Research*, 26, 123-134. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9990-0>

Sorensen Jr, A. M., 1979. *Repro Lab: A laboratory manual for animal reproduction*, 4^a ed. American Press, Massachusetts.

Thomas, K. V., Brooks, S., 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling*, 26, 73-88. <http://dx.doi.org/10.1080/08927010903216564>

USEPA, Reregistration eligibility decision (red), Chlorothalonil. <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0097red.pdf>. 1999, US Environmental Protection Agency.

Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13, 57-149.

Ventura-Lima, J., Fattorini, D., Regoli, F., Monserrat, J. M., 2009. Effects of different inorganic arsenic species in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) tissues after short-time exposure: Bioaccumulation, biotransformation and biological responses. *Environmental Pollution*, 157, 3479-3484. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.06.023>

Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E. Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277, R1612-R1619.

Voulvoulis, N., 2006. Antifouling Paint Booster Biocides: Occurrence and partitioning in water and sediments. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 5, 155-170. http://doi.org/10.1007/698_5_053

Voulvoulis, N., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N., 2000. Occurrence of four biocides utilized in antifouling paints, as alternatives to organotin compounds, in waters and sediments of a commercial estuary in the UK. *Marine Pollution Bulletin*, 40, 938-946.

White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., Kavanagh, T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Analytical Biochemistry*, 318, 175-180. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00143-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00143-X)

Tabela 1. Parâmetros analisados em eritrócitos de peixes *P. vivipara* mantidos em condições de controle ou expostos ao clorotalonil, nas concentrações de 1 µg/L e 10 µg/L por 96 h. Os dados estão expressos como média ± erro padrão Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para cada medida.

<i>Parâmetros analisados</i>	<i>Controle</i>	<i>Clorotalonil 1 µg/L</i>	<i>Clorotalonil 10 µg/L</i>
Fluidez (intensidade)	1819 ± 108 ^A	2072 ± 83 ^{AB}	2338 ± 130 ^B
Fluidez de Membrana	2,85 ± 0,48 ^A	3,89 ± 0,90 ^{AB}	6,63 ± 1,64 ^B
Índice de fragmentação do DNA	0,14 ± 0,01 ^A	0,18 ± 0,01 ^A	0,15 ± 0,01 ^A
Lipoperoxidação (LPO)	46,40 ± 1,96 ^A	57,22 ± 2,53 ^B	53,67 ± 1,82 ^B
Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	6927 ± 360 ^A	7285 ± 420 ^{AB}	8447 ± 715 ^B
Micronúcleo (MN)	2,00 ± 0,58 ^A	7,67 ± 1,65 ^B	9,75 ± 1,03 ^B

Tabela 2. Parâmetros analisados em células espermáticas de *P. vivipara* mantidas em condições de controle ou expostas ao clorotalonil, nas concentrações de 1 µg/L e 10 µg/L por 96 h. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para cada medida.

<i>Parâmetros analisados</i>	<i>Controle</i>	<i>Clorotalonil 1 µg/L</i>	<i>Clorotalonil 10 µg/L</i>
Índice de fragmentação do DNA	0,75 ± 0,11 ^A	0,87 ± 0,06 ^A	0,87 ± 0,53 ^A
Lipoperoxidação (LPO)	38,8 ± 5,9 ^A	60,5 ± 6,5 ^B	60,1 ± 9,1 ^B
Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	1759,3 ± 98,2 ^{AB}	1452,6 ± 105,7 ^A	3493,8 ± 1151,5 ^B
Fluidez de Membrana	26,8 ± 4,9 ^A	32,1 ± 6,3 ^A	33,1 ± 4,8 ^A
Funcionalidade Mitocondrial	56,8 ± 6,4 ^A	17,4 ± 6,0 ^B	39,1 ± 2,7 ^C
Funcionalidade da Membrana	85,5 ± 3,4 ^A	90,0 ± 3,1 ^A	75,7 ± 3,1 ^B
Integridade Celular	85,9 ± 2,9 ^A	88,2 ± 2,8 ^A	74,7 ± 5,4 ^B
Motilidade Total (%)	27,7 ± 2,2 ^A	19,2 ± 1,2 ^B	18,0 ± 1,6 ^B
Motilidade Progressiva (%)	16,8 ± 2,2 ^A	11,9 ± 1,0 ^B	10,9 ± 1,0 ^B

Legendas das Figuras

Figura 1. Cromatograma do clorotalonil em peixes *Poecilia vivipara* íntegros. (A) representa a concentração padrão de clorotalonil medido na matriz peixe, (B) representa a detecção de clorotalonil no animal inteiro exposto à 10 µg/L de clorotalonil por 96 h.

Figura 2. Espécies reativas de oxigênio (ROS) (A) e capacidade antioxidante total (ACAP) (B) mensuradas em fígado e brânquias de *P. vivipara* mantidos em condições de controle (acetona 0,002%) e expostos por 96 h ao clorotalonil nas concentrações de 1 e 10 µg/L. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras maiúsculas significam diferenças estatísticas entre os tratamentos para cada tecido ($p < 0,05$).

Figura 3. Concentração de GSH (A) e atividade da GCL (B) em fígado e brânquias de *Poecilia vivipara* mantidos em condições de controle (acetona 0,002%) e expostos ao clorotalonil nas concentrações de 1 e 10 µg/L. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras maiúsculas significam diferenças estatísticas entre os tratamentos para cada tecido ($p < 0,05$).

Figura 4. Atividade de enzima GST em fígado e brânquias de *Poecilia vivipara* mantidos em condições de controle (acetona 0,002%) e expostos por 96 h ao clorotalonil, nas concentrações de 1 e 10 µg/L. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras maiúsculas significam diferenças estatísticas entre os tratamentos para cada tecido ($p < 0,05$).

Figura 5. Lipoperoxidação (LPO) em cérebro, fígado e brânquias de *P. vivipara* mantidos em condições de controle e expostos por 96 h ao clorotalonil nas concentrações de 1 e 10 µg/L. O eixo y da esquerda representa valores medidas no cérebro e o da direita no fígado e brânquias. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras maiúsculas significam diferenças estatísticas entre os tratamentos para cada tecido ($p < 0,05$).

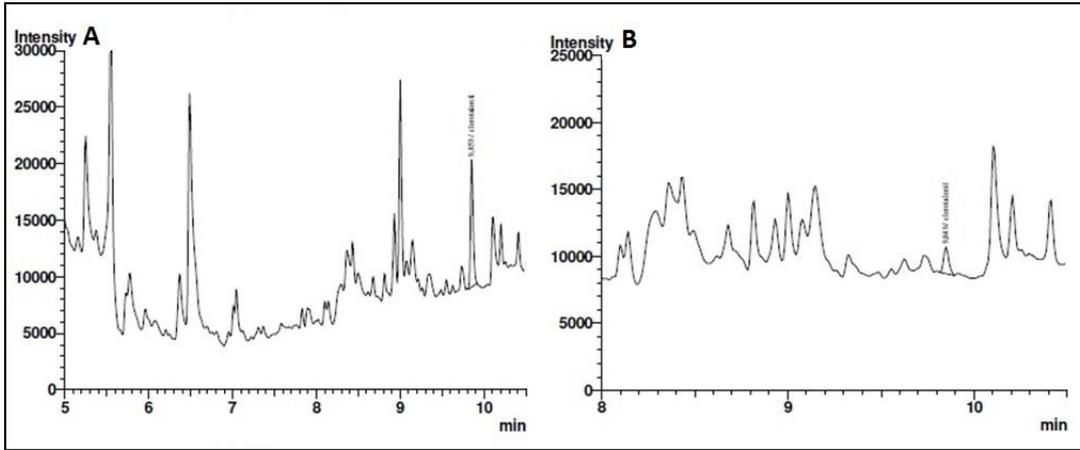


Figura 1

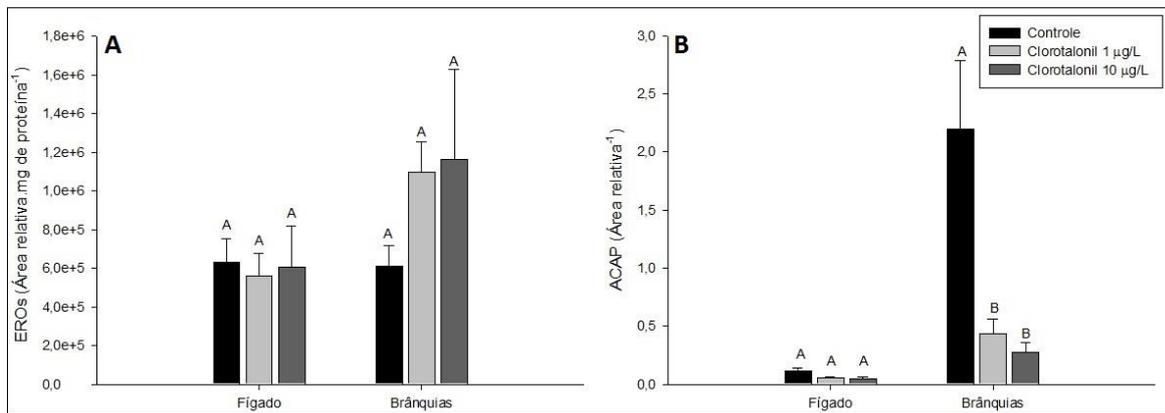


Figura 2

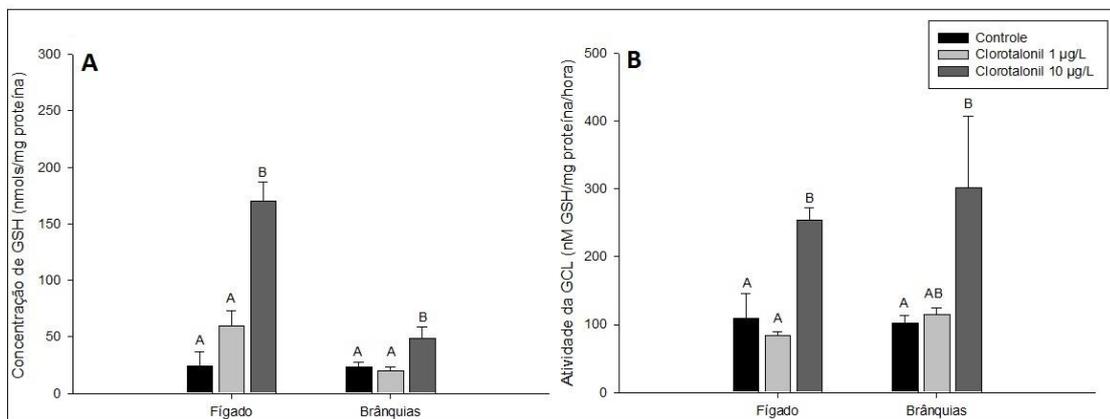


Figura 3

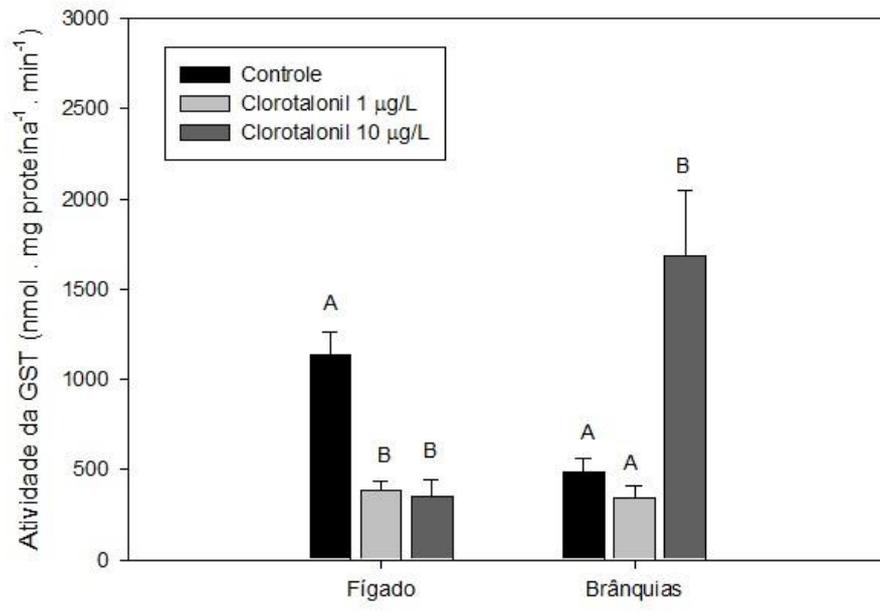


Figura 4

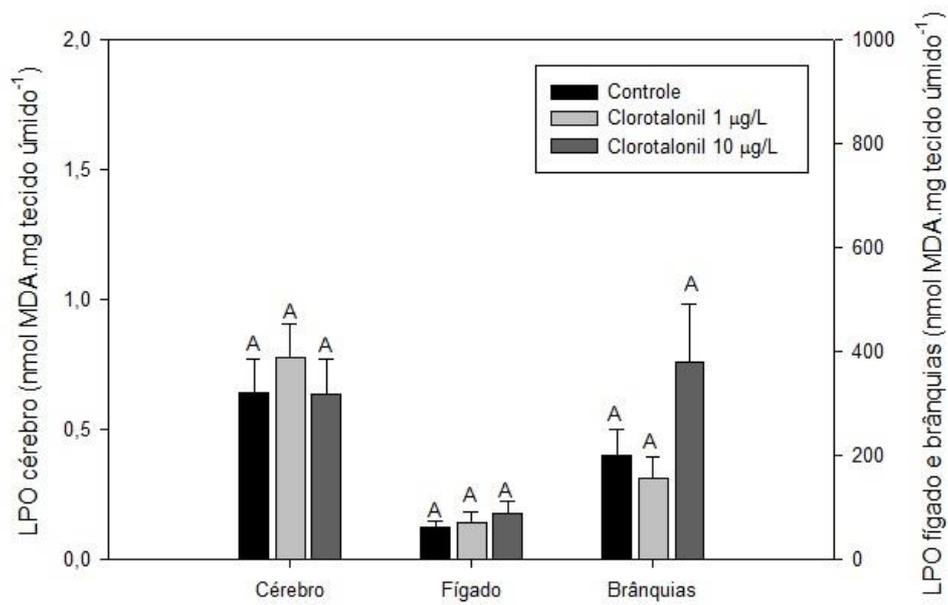


Figura 5

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A partir dos dados gerados neste trabalho, concluímos que o clorotalonil é tóxico para o peixe *P. vivipara*, sendo o nível celular o mais sensível. O clorotalonil tem efeito sistêmico e pode atacar diferentes alvos em um organismo. O estresse oxidativo é um dos mecanismos da sua toxicidade e a presença de clotalonil no meio pode afetar a sobrevivência de uma espécie desde o seu nível individual até populacional. Podemos considerar que os objetivos do trabalho foram alcançados: apresentamos um levantamento da literatura disponível sobre o clorotalonil contemplando aspectos ambientais e efeitos tóxicos do biocida; observamos a interação do clorotalonil com o peixe e seus efeitos em diferentes aspetos, incluindo alguns mecanismos que permeiam suas ações tóxicas para *Poecilia vivípara*; e reforçamos o uso da espécie como um modelo monitor sensível à contaminação ambiental. As análises feitas aqui trazem medidas/respostas sensíveis e úteis para a regulamentação do biocida e avaliação de risco ambiental envolvendo a presença de clorotalonil, que seriam perspectivas desta dissertação.