



USO DO TESTES DE MICRÓNÚCLEO PARA AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE CAUSADA POR EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS EM ORGANISMOS NÃO ALVO, USANDO ANFÍBIOS COMO ANIMAL TESTE

VRANDRIELI JUCIELI SKOVRONSKI^{1,2*}, NATANI MACAGNAN^{3,2}, CAMILA FATIMA RUTKOSKI^{3,2}, ALEXANDRE FOLADOR^{4,2}, MARILIA TERESINHA HARTMANN^{5,2}

1 Introdução/Justificativa

A utilização de diversos inseticidas na agricultura para o controle de insetos na produção e cultivo de alimentos pode afetar a vida de alguns organismos não alvo (ALBUQUERQUE, 2016), como o caso dos anfíbios. Os anfíbios são animais que tem alta sensibilidade a mudanças em seu meio, por possuírem estágios de ciclo de vida aquático e terrestre e terem alta permeabilidade na pele, por isso são considerados bons indicadores ambientais. Fipronil é um n-fenilpirazol de suspensão concentrada amplamente utilizado na agricultura para controle de insetos (MARGARIDO, 2013). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica o inseticida fipronil como classe toxicológica II (altamente tóxico), apresentando alta toxicidade para peixes, pássaros e invertebrados aquáticos. Neste estudo, investigamos a genotoxicidade do inseticida fipronil através do teste do micronúcleo, utilizando como modelo de vertebrado não-alvo o anfíbio *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae).

2 Objetivos

Avaliar o potencial genotóxico do inseticida fipronil, verificando a existência ou não de indução de micronúcleos no núcleo das células de sangue do anfíbio *Physalaemus gracilis*.

¹ Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Erechim*. **Bolsista**, contato: vrandryskovronski@gmail.com

² Grupo de Pesquisa Biodiversidade e Conservação da Fauna.

³ Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Erechim*.

⁴ Graduando em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Erechim*.

⁵ Doutora em Ciências Biológicas. Universidade Federal da Fronteira Sul, **Orientador**.



3 Material e Métodos/Metodologia

Foi utilizada a formulação comercial do inseticida fipronil (Suspensão Concentrada, contendo 250 g/L de ingrediente ativo fipronil e 890 g/L de ingredientes inertes). Para os ensaios de toxicidade crônica foram utilizados girinos de *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). Para obtenção dos girinos, foram coletadas desovas totais com menos de 24 horas de oviposição em um lago da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim (latitude: -27.728681°; longitude: -52.285852°). Após a coleta, as desovas foram levadas para o laboratório e colocadas em aquários de 15 litros contendo água desclorada, atendendo os padrões de potabilidade e criadas em condições controladas até atingirem o estágio 25 (GOSNER, 1960). Os ensaios de toxicidade crônica foram realizados por 168 horas, em triplicata, com 10 girinos por recipiente. Foram testadas 5 concentrações do fipronil: encontrada no ambiente: 26 µg/L (ALBUQUERQUE et al., 2016) e utilizada em outros estudos com anfíbios: 50; 100; 500 e 1500 µg/L (MARGARIDO et al., 2013). Para cada ensaio foi feito um controle negativo, somente com água (autorização CEUA 23205.003634/2017-70). No último dia de exposição, foram selecionados 15 girinos de cada concentração para serem submetidos ao teste de micronúcleo. Os girinos foram anestesiados com lidocaína (CONCEA, 2015), e foi retirada uma gota de sangue de cada girino para o esfregaço em lâmina de microscopia esterilizada. A fixação das lâminas foi realizada com metanol frio (4°C) durante 2 minutos e a coloração com Giemsa 10% durante 15 minutos, ao abrigo de luz. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada e postas para secar em temperatura ambiente. Foram analisadas 1000 células de cada girino, em microscópio, objetiva de 100x.

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o *software* STATISTICA 8.0. A diferença estatística entre a presença de micronúcleos no controle e nos girinos expostos a fipronil foi avaliada por análise de variância (ANOVA One-Way) seguida do teste de Dunnett, com 95% de confiança. A Concentração de Efeito Não Observado (CENO), a Concentração de Efeito Observado (CEO) e a Máxima Concentração Aceitável de Toxicante (MCAT) foram determinados através do teste de Dunnett.

Para a realização da avaliação de risco ecológico, foi utilizado o quociente de risco (QR), determinado pela divisão da Concentração Ambiental Estimada (CAE) pelo CENO. Para a USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) o valor de referência

para animais aquáticos é igual a 1. Se o valor obtido for maior que 1, este tem potencial de risco crônico para a espécie.

4 Resultados e Discussão

Foram analisadas 91201 células de *Physalaemus gracilis*. Ocorreu indução de micronúcleos em todas as concentrações testadas de fipronil, sendo significativo em relação ao controle ($F_{(5,84)}=7,38$, $p<0,05$) nas duas maiores concentrações de 500 e 1500 $\mu\text{g/L}$ (Dunnett, $p<0,05$). Dessa forma foi possível perceber um aumento do número de micronúcleos com o aumento da concentração de fipronil.

O inseticida fipronil induziu a formação de micronúcleo em girinos de *P. gracilis*, deste modo pode ser considerado como um agente tóxico que tem potencial de causar efeitos genotóxicos em *Physalaemus gracilis* em concentrações que podem ser encontradas na natureza. Ainda há poucos estudos sobre os efeitos genotóxicos do fipronil em organismos não-alvo, como anfíbios. O potencial genotóxico deste inseticida é preocupante, pois as concentrações testadas são concentrações registradas em águas superficiais, habitat natural de organismos não alvo.

O valor de CENO e CEO de fipronil encontrados para *P. gracilis* foi de 500 $\mu\text{g/L}$ e 1500 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. A MCAT de fipronil para genotoxicidade foi de 866,02 $\mu\text{g/L}$. Em relação a avaliação de risco, foi utilizada a CAE detectada na água a partir da literatura, dentro da área de distribuição da espécie estudada, que foi de 26 $\mu\text{g/L}$ e o CENO de 500 $\mu\text{g/L}$. O valor de quociente de risco (QR) obtido foi de 0,052, abaixo do valor de referência 1 indicando baixo risco crônico do fipronil para *P. gracilis*.

Esses dados mostram que fipronil tem potencial genotóxico em *P. gracilis*, mas somente em altas concentrações, acima do que já foi registrado em águas superficiais (26 $\mu\text{g/L}$) e permitido pela legislação do Rio Grande do Sul para água potável (1,2 $\mu\text{g/L}$; Portaria da Secretaria da Saúde n°320/2014). A máxima concentração aceitável de fipronil também foi alta para genotoxicidade (866,02 $\mu\text{g/L}$), e dificilmente seria encontrada no ambiente. Devido a esses dados, fipronil apresentou baixo risco crônico. Portanto, a formulação testada deste inseticida não apresenta efeitos de genotoxicidade considerados relevantes em termos de risco ecológico.

No entanto, é necessário ressaltar que fipronil é um de muitos inseticidas que ainda não possui limite de concentração na água na legislação a nível federal no Brasil. A União

Européia (Diretoria 98/83/CE de 3 de novembro de 1998) estabelece um valor de 0,10 µg/L para resíduos de agrotóxico em água potável (para cada agrotóxico isolado) e de 0,50 µg/L para Inseticidas Total (soma de todos agrotóxicos encontrados e quantificados na água). Entretanto, no estado do Rio Grande do Sul, que estabelece parâmetros adicionais de agrotóxicos ao padrão de potabilidade para substâncias químicas, no controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano no RS, estabelece um limite de fipronil na água de 1,2 µg/L.

5 Conclusão

A partir dos resultados obtidos na realização das análises das células no teste de micronúcleo dos girinos de *P. gracilis* foi possível perceber que concentrações acima de 500 µg/L da formulação comercial de fipronil pode causar efeitos genotóxicos e a indução de formação de micronúcleos neste anfíbio. Ressaltamos que são necessários mais estudos sobre os efeitos das fórmulas comerciais de fipronil em organismos não-alvo, para entender melhor a toxicidade destes inseticidas.

Referências

- ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; NOGUEIRA, A. J. A.; MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 18, p. 779-787, 2016.
- CONCEA. Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal. **Resolução Normativa Nº 29, de 13 de novembro de 2015**. Dispõem o Capítulo “Anfíbios e serpentes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Brasília, 2015. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-29-de-13.11.2015-D.O.U.-de-17.11.2015-Secao-I-Pag.-05.pdf. Acesso em: 15 jul. 2018.
- GOSNER K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n. 3, p. 183 – 189, 1960.
- MARGARIDO, T. C. S.; FELÍCIO, A. A.; ROSSA-FERES, D. C.; ALMEIDA, E. A. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide Fipronil. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 61-67, 2013.

Palavras-chave: fipronil; ecotoxicologia; inseticidas.

Financiamento: PROBITI- FAPERGS