



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**TATHYANA BENETIS PIAU**

**Avaliação dos efeitos embriotóxicos, genotóxicos e bioquímicos de larvicidas alternativos da classe das quinonas para o controle do *Aedes aegypti* usando o peixe-zebra (*Danio rerio*) como espécie modelo**

Brasília – DF

2021

**TATHYANA BENETIS PIAU**

**Avaliação dos efeitos embriotóxicos, genotóxicos e bioquímicos de larvicidas alternativos da classe das quinonas para o controle do *Aedes aegypti* usando o peixe-zebra (*Danio rerio*) como espécie modelo**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília – UnB como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Cesar Koppe  
Grisolia**

**Co-orientadora: Dra. Maria Luíza  
Fascineli**

Brasília – DF

2021

*“Dedico a minha amada mãe, que sempre me inspirou como mulher e me incentivou a dar o meu melhor, tendo muita paciência e amor! E a minha avó que sempre me apoiou e me amou acima de tudo!”*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por sempre abrir meus caminhos e me iluminar, e, a minha família, que sempre me incentivou e investiu na minha educação; à minha querida mãe que me apoiou, teve paciência com meus dias mal humorados e sempre me amou incondicionalmente, sendo minha base e minha grande inspiração; aos meus avós que sempre estiveram presentes, amando e me fortalecendo, sendo os pilares da minha família; ao meu pai, que mesmo com o seu jeito duro de ser, sempre me motivou a ser a melhor versão de mim, como pessoa e profissional; ao meu querido padrasto, que sempre me tratou como filha, tendo toda a paciência do mundo e incentivando sempre meus estudos, e, comemorando minhas vitórias; ao meu tio-avô, que sempre se mostrou empolgado e interessado na minha vida acadêmica, me incentivando e me dando moradia na Colina, com todo o seu amor e carinho; ao meu tio, que mesmo entre todas as palhadas e aborrecimentos, sempre teve muito carinho e orgulho de mim; ao meu namorado que, junto com a minha mãe, teve que lidar com todos os meus demônios, ataques emocionais, choros, mal humores, mas também, compartilhou de todos os momentos de conquistas e alegrias comigo, meu porto seguro.

Agradeço à Universidade de Brasília (UnB), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia, UnB, e, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Saúde (FS – UnB) e a FUNASA – Ministério da Saúde (MS) pela parceria. A professora Laila Espindola, coordenadora do projeto, e, a professora Lorena Albernaz, que me auxiliou durante todo esse período.

Aos meus companheiros de laboratório e a equipe do Laboratório de Genética Toxicológica (GTox) – UnB, que sempre me apoiaram e me trataram super bem, em especial à Ingrid Freire, que várias vezes me deu um “puxão na orelha”, mas sempre esteve ao meu lado, torcendo por mim; à Niedja Santos, que me ajudou com ideias maravilhosas, sempre tendo paciência e calma em me explicar; ao Alisson Dantas, que durante várias madrugadas escutou meus desabafos, deu força e me ajudou em várias etapas; ao Diego Sousa, que durante esse tempo se tornou um irmão para mim, incentivando-me a crescer e ajudando durante todo o processo, fazendo parte do meu amadurecimento profissional e pessoal.

À Maria Luíza Fascineli, que é uma inspiração para mim como pesquisadora, serei sua eterna discípula. Durante esses anos, em diversos momentos eu me desesperei, fiquei ansiosa, chorei na bancada e ela sempre me dizia “vira macho!”, palavras que jamais esquecerei. E hoje, vejo a Mulher que eu sou, a transformação que eu passei ao longo desse trajeto, o amadurecimento que eu tive... Por mais que eu chorasse, eu só tenho gratidão e carinho! Obrigada, Malu!

Agradeço ao meu orientador Cesar Koppe Grisolia que tenho como meu “pai da ciência”. Ele me recebeu em seu laboratório em 2015 de braços abertos, e até hoje me trata como sua “filhota” (a favorita, outras falaram que não, por pura intriga). Gratidão por ter possibilitado a realização de um sonho, ter tido paciência e me ensinado que como Mendel, eu tinha que ter calma e resiliência para alcançar meus resultados.

Aos meus amigos, que são pessoas maravilhosas, tenho muita sorte em ter todos vocês. Todos sabem o quanto são importantes para a minha vida e o quanto sou grata em poder compartilhar meus momentos com vocês, sejam derrotas ou sejam vitórias. Agradeço em especial a Nathália Viana, que me salvou com o dicionário no dia da prova do mestrado, dando a oportunidade de iniciar essa jornada, e, a amiga que ela é; a Lorena Py, uma das minhas melhores amigas, companheira de longa data, em todas as loucuras; a Michele Fernandes, que embarcou nessa aventura de mestrado, me dando força e ajuda; a Morgana Margoto e a Gisele Duarte que sempre me colocaram para cima nos momentos mais difíceis, com palavras amigas, dando forças para prosseguir. Gostaria de listar um por um dos meus queridos e amados amigos, mas seria inviável, peço desculpas por isso. Amo todos vocês!

A todos os outros da minha família, que mesmo distantes fisicamente, sempre me apoiaram e disseram que eu era o “orgulho da família!”, meu eterno amor e carinho por todos vocês.

Por fim, agradeço novamente a Deus por me prestigiar com a presença de todos vocês na minha vida, por ser uma pessoa tão amada, e, ter pessoas tão maravilhosas ao meu redor! GRATIDÃO.

## RESUMO

Com o crescimento da densidade populacional e a industrialização, houve uma elevação na utilização de produtos químicos sintéticos, como pesticidas, gerando poluição em diversos ecossistemas, principalmente no aquático. O uso desenfreado desses poluentes e a facilidade de adaptação dos insetos, gerou resistência nos vetores de doenças arbovirais, como o *Aedes aegypti*. Dessa forma, a busca por produtos naturais com potencial larvicida, ecoamigáveis e eficazes, tem aumentado bastante nos últimos anos. Sendo as quinonas larvicidas alternativas eficazes, o presente estudo buscou avaliar os efeitos ecotóxicos de sete moléculas dessa classe, através de testes embriotóxicológicos, bioquímicos e genotóxicológicos em adultos de zebrafish (*Danio rerio*). Os resultados obtidos no FET (*Fish Embryo Toxicity test*), mostraram que das sete quinonas, duas (ArboS17 e ArboS97) tinham toxicidade (mortalidade) bastante elevada em relação a  $CL_{50}$  obtida nos testes larvicidas, a Arbo4A064E apesar de não possuir toxicidade elevada em organismo não-alvo ( $CL_{50 (96h)} = 11,68 \text{ mg/L}$ ), ela estava abaixo da  $CL_{50 (48h)}$  (15,6 mg/L) encontrada para *A. aegypti*. Restaram quatro moléculas que se encaixaram nos requisitos, contudo, apenas a ArboS31, foi selecionada para teste agudos em adultos. Os resultados sugerem que a ArboS31 não seja genotóxica, mutagênica, e nem, neurotóxica; contudo, em concentrações como 100 mg/L, causa alteração na atividade enzimática da LDH. Em relação as vias de desintoxicação, a GST obteve aumento em sua atividade, correspondendo, possivelmente, a uma resposta de desintoxicação do organismo. Por fim, com base em todos os dados da ArboS31, supõe-se, que ela seja uma molécula que em concentrações acima de 4,78 mg/L (em larvas), ocasione efeitos hepatotóxicos. Ademais, como larvicida eficaz e bioamigável, ela mostrou-se ser uma forte candidata para futuros testes e formulações, devido a sua baixa toxicidade em organismo não-alvo.

**Palavras-chave:** toxicidade, biomarcadores, FET, larvicida natural, genotoxicidade.

## ABSTRACT

With the growth of population density and industrialization, there is an increase in the use of synthetic chemicals, such as pesticides, generating pollution and waste in several ecosystems, especially in the aquatic. The rampant use of these pollutants and the ease of adaptation of insects, generated resistance in vectors of arboviral diseases, such as *Aedes aegypti*. Therefore, the search for natural products with larvicidal potential, which are eco-friendly and effective, has increased considerably in recent years. As alternative larvicidal quinones are effective, the present study sought to evaluate the ecotoxic effects of seven molecules of this class, through embryotoxicological, biochemical and genotoxicological tests on zebrafish (*Danio rerio*). The results obtained in the FET (Fish Embryo Toxicity test), showed that two out of the seven quinones (ArboS17 and ArboS97) had quite high toxicity in relation to CL<sub>50</sub> obtained in the larvicide tests, the Arbo4A064E despite not having high toxicity in the organism non-target (LC<sub>50</sub> (96h) = 11.68 mg / L), it was below the LC<sub>50</sub> (48h) (15.6 mg / L) found for *A. aegypti*. Four remaining molecules fitted the requirements, nevertheless, only ArboS31 was selected for testing in adults. The results suggest that ArboS31 is not genotoxic, mutagenic, nor neurotoxic, however, in concentrations such as 100 mg / L, it causes changes in the enzymatic activity of LDH. Regarding the detoxification pathways, the GST obtained an increase in its activity, possibly corresponding to a detoxification response of the organism. Finally, based on all data from ArboS31, its supposed that it is a molecule that when in concentrations above 4.78 mg / L (in larvae), causes hepatotoxic effects. In addition, as an effective and bio-friendly larvicide, it proved to be a strong candidate for future tests and formulations, due to its low toxicity in non-target organisms.

**Keywords:** toxicity, biomarkers, FET, natural larvicide, genotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) .....	21
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo das etapas de contaminação .....	23
<b>Figura 3.</b> Desenvolvimento embrionário do zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) adaptado de Kimmel <i>et al.</i> (1995) .....	30
<b>Figura 4.</b> Classificação dos cometas .....	33
<b>Figura 5.</b> Esquema das principais etapas do teste do cometa .....	34
<b>Figura 6.</b> Foto de um nucleóide com fragmentação do DNA na cauda .....	34
<b>Figura 7.</b> Esquema sintetizando da produção e seleção dos ovos .....	41
<b>Figura 8.</b> Desenho experimental das réplicas do FET .....	42
<b>Figura 9.</b> Foto dos aquários com zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) durante a exposição à quinona ArboS31, em duplicata, por 96 h .....	43
<b>Figura 10.</b> Foto dos aquários com zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) durante a pós-exposição em duplicata .....	44
<b>Figura 11.</b> Panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish ( <i>D. rerio</i> ) durante 96 h de exposição a ArboS22.....	50
<b>Figura 12.</b> Curva de concentração resposta (mortalidade) dos organismos expostos por 96 h a ArboS22.....	51
<b>Figura 13.</b> Frequência (%) das alterações embrionárias no zebrafish ( <i>D. rerio</i> ) exposto a ArboS22, em 96 h (valores médios $\pm$ erro padrão).....	52
<b>Figura 14.</b> Embriões e larvas do zebrafish após exposição a ArboS22 por 96 h.....	52
<b>Figura 15.</b> Evidência que a molécula ArboS18 atravessou o cório do embrião após 24 h de exposição.....	53
<b>Figura 16.</b> Panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish ( <i>D. rerio</i> ) durante 96 h de exposição a ArboS18.....	54
<b>Figura 17.</b> Embriões de zebrafish expostos a ArboS18 por 48 h.....	55
<b>Figura 18.</b> Larvas de zebrafish expostas a ArboS18 por 48 h.....	55

<b>Figura 19.</b> Larvas do zebrafish expostas a ArboS1 8por 96 h.....	56
<b>Figura 20.</b> Frequência (%) das principais alterações embrionárias dos organismos expostos a ArboS18, em 96 h.....	57
<b>Figura 21.</b> Evidência da adesão da quinona ArboS1 no cório do embrião do zebrafish após 24 h de exposição.....	57
<b>Figura 22.</b> Gráfico do panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish ( <i>D. rerio</i> ) durante 96 h de exposição a ArboS1.....	58
<b>Figura 23.</b> Embriões de zebrafish expostos a ArboS1 por 24 h.....	59
<b>Figura 24.</b> Embriões e larvas do zebrafish expostos a ArboS1 por 48 h.....	59
<b>Figura 25.</b> Larvas do zebrafish expostas a ArboS1 por 72 h.....	60
<b>Figura 26.</b> Larvas do zebrafish expostas a ArboS1 por 96 h.....	60
<b>Figura 27.</b> Frequência (%) das principais alterações embrionárias no zebrafish exposto a ArboS1, em 96 h (valores médios $\pm$ erro padrão).....	61
<b>Figura 28.</b> Gráfico do panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish ( <i>D. rerio</i> ) durante 96 h de exposição a Arbo4A064E.....	62
<b>Figura 29.</b> Curva de concentração resposta (mortalidade) dos organismos expostos por 96 h a Arbo4A064E.....	63
<b>Figura 30.</b> Estrutura molecular da ArboS17.....	63
<b>Figura 31.</b> Gráfico do panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish ( <i>D. rerio</i> ) durante 96 h de exposição a ArboS17.....	64
<b>Figura 32.</b> Curva de concentração resposta (mortalidade) dos organismos expostos por 96 h a ArboS17.....	64
<b>Figura 33.</b> Gráfico do panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish ( <i>D. rerio</i> ) durante 96 h de exposição a ArboS31.....	65
<b>Figura 34.</b> Embriões de zebrafish expostos a ArboS31 por 24 h.....	66
<b>Figura 35.</b> Embriões de zebrafish expostos a ArboS31 por 48 h.....	67
<b>Figura 36.</b> Larvas de zebrafish expostas a ArboS31 por 48 h.....	68

<b>Figura 37.</b> Embriões e larvas de zebrafish expostos a ArboS31 por 72 h.....	69
<b>Figura 38.</b> Alterações comportamentais das larvas de zebrafish expostas a ArboS31 por 96 h.....	70
<b>Figura 39.</b> Curva de concentração resposta (edema cardíaco) dos organismos expostos por 96 h a ArboS31 .....	71
<b>Figura 40.</b> Curva de concentração resposta (saco vitelínico) dos organismos expostos por 96 h a ArboS31.....	71
<b>Figura 41.</b> Larvas de zebrafish expostas a ArboS31 por 96 h.....	72
<b>Figura 42.</b> Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) na cabeça do adulto de <i>Danio rerio</i> depois de 96 h de exposição à ArboS31 .....	74
<b>Figura 43.</b> Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) na cauda do adulto de <i>Danio rerio</i> depois de 96 h de exposição à ArboS31 .....	76
<b>Figura 44.</b> Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na cauda do adulto de <i>Danio rerio</i> depois de 96 h de exposição à ArboS31 .....	78
<b>Figura 45.</b> Esquema de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e desintoxicação através da glutathiona-S-transferase (GST) .....	80
<b>Figura 46.</b> Atividade da glutathiona-S-transferase (GST) na brânquia do adulto de <i>Danio rerio</i> depois de 96 h de exposição à ArboS31.....	81
<b>Figura 47.</b> Atividade da glutathiona-S-transferase (GST) no tronco do adulto de <i>Danio rerio</i> depois de 96 h de exposição à ArboS31.....	82
<b>Figura 48.</b> Ensaio cometa - fragmentação no DNA (%) em eritrócitos de peixes ( <i>Danio rerio</i> ) expostos a ArboS31 por 96 h.....	85
<b>Figura 49.</b> Organismos expostos por 96 h à ArboS31 .....	88
<b>Figura 50.</b> Atividade da glutathiona-S-transferase (GST) no tronco e na brânquia do adulto de <i>Danio rerio</i> depois de 96 h de exposição à ArboS31 .....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das fontes de poluição.....	20
<b>Tabela 2.</b> Classificação das quinonas e estrutura básica.....	26
<b>Tabela 3.</b> Tabela com a CL <sub>50</sub> das quinonas selecionadas para estudos ecotoxicológicos (Laboratório de Farmacognosia – FS, UnB).....	39
<b>Tabela 4.</b> Tabela com a média dos parâmetros da água das réplicas durante a exposição de 96 h a ArboS31.....	44
<b>Tabela 5.</b> Tabela com a média dos parâmetros da água das réplicas durante a pós-exposição de 96 h a ArboS31.....	45
<b>Tabela 6.</b> Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares observadas em eritrócitos de sangue de peixes ( <i>Danio rerio</i> ) expostos a ArboS31.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>ANVISA</b>	Agência de Vigilância Sanitária
<b>AN</b>	Anomalias nucleares
<b>BB</b>	<i>Blebbid</i>
<b>BER</b>	Reparo por excisão de bases
<b>BN</b>	Binucleadas
<b>BR</b>	Broto
<b>BTI</b>	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
<b>C</b>	Concentração
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CB</b>	Carbamatos
<b>CDNB</b>	1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno
<b>CE</b>	Contaminantes Emergentes
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso Animal
<b>CHIKV</b>	Vírus da Chikungunya
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração Letal para 50% dos indivíduos
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional de Meio Ambiente
<b>CYP</b>	Enzimas do citocromo
<b>DDT</b>	Diclorodifeniltricloroetano
<b>DENV</b>	Vírus da Dengue
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FET</b>	<i>Fish Embryo Toxicity Test</i>

<b>FS</b>	Faculdade de Saúde
<b>FUNASA</b>	Fundação Nacional de Saúde
<b>GO</b>	Goiânia
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>GST</b>	Glutathione-S-transferase
<b>GTox</b>	Laboratório de Genética Toxicológica
<b>HCH</b>	Do hexaclorociclohexano
<b>hpf</b>	Horas pós-fertilização
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
<b>LB</b>	<i>Lobed</i>
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>LMP</b>	<i>Low Melting Point</i>
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MMA</b>	Ministério do Meio Ambiente
<b>MN</b>	Micronúcleo
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NADH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NER</b>	Reparo por excisão de nucleotídeos
<b>NT</b>	<i>Notched</i>
<b>OECD</b>	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
<b>OC</b>	Organoclorados
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OP</b>	Organofosforados
<b>PBS</b>	Tampão de Fosfato-salino
<b>PI</b>	Piretróides
<b>PIB</b>	Produto Interno Bruto
<b>RNAs</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-PCR</b>	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>

<b>SCGE</b>	<i>Single Cell Gel Eletrophoresis Assay</i>
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SP</b>	São Paulo
<b>UnB</b>	Universidade de Brasília
<b>VC</b>	Vacuolated
<b>VFA</b>	Vírus da Febre Amarela
<b>ZIKV</b>	Vírus da Zika

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Ecotoxicologia</b> .....	<b>18</b>
2.1.1	<i>Ecotoxicologia aquática e poluição</i> .....	19
<b>2.2</b>	<b>O uso do zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como organismo modelo</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Pesticidas</b> .....	<b>22</b>
2.3.1	<i>Inseticidas</i> .....	23
2.3.1.1	Inseticidas químicos .....	24
2.3.1.2	Bioinseticidas .....	25
2.3.1.3	Inseticidas naturais .....	25
2.3.1.3.1	Quinonas .....	26
<b>2.4</b>	<b><i>Aedes aegypti</i></b> .....	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>Mecanismos de aquisição de resistência genética do <i>A. aegypti</i> aos inseticidas químicos sintéticos tradicionais</b> .....	<b>28</b>
<b>2.6</b>	<b>Fish Embryo Toxicity (FET – Test)</b> .....	<b>30</b>
<b>2.7</b>	<b>Biomarcadores enzimáticos</b> .....	<b>31</b>
<b>2.8</b>	<b>Testes genotóxicos</b> .....	<b>33</b>
2.8.1	<i>Teste do cometa</i> .....	33
2.8.2	<i>Teste do micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN)</i> .....	36
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	Objetivo geral .....	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
5.1	Moléculas .....	40
5.2	Manejo do modelo animal – Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) .....	41
5.3	Testes embriotóxicos .....	42
5.3.1	<i>Produção e seleção de ovos</i> .....	42
5.3.2	<i>Fish embryo toxicity test (FET)</i> .....	42
5.4	Testes de toxicidade em organismos adultos .....	43
5.4.1	<i>Teste com biomarcadores moleculares</i> .....	46
5.4.1.1	Determinação de proteínas totais .....	47
5.4.1.2	Atividade da acetilcolinesterase (AChE) .....	47
5.4.1.3	Atividade da lactato desidrogenase (LDH) .....	47

5.4.1.4	Atividade da glutaciona-S-transferase (GST) .....	47
5.4.2	<i>Testes de genotoxicidade</i> .....	48
5.4.2.1	Teste do cometa .....	48
5.4.2.2	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares .....	49
<b>5.5</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>6.1</b>	<b>Fish Embryo Toxicity test (FET)</b> .....	<b>51</b>
6.1.1	<i>ArboS22</i> .....	51
6.1.2	<i>ArboS18</i> .....	55
6.1.3	<i>ArboS1</i> .....	60
6.1.4	<i>Arbo4A064E</i> .....	65
6.1.5	<i>ArboS17</i> .....	67
6.1.6	<i>ArboS31</i> .....	69
<b>6.2</b>	<b>Testes de toxicidade em zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto</b> .....	<b>78</b>
6.2.1	<i>Marcadores bioquímicos</i> .....	78
6.2.1.1	Acetilcolinesterase (AChE) .....	78
6.2.1.2	Lactato Desidrogenase (LDH) .....	82
6.2.1.3	Glutaciona-S-transferase (GST) .....	84
6.2.2	<i>Testes de genotoxicidade</i> .....	89
<b>6.3</b>	<b>Possíveis efeitos hepatotóxicos</b> .....	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>97</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>98</b>
	<b>ANEXOS</b> 124	

## 1 INTRODUÇÃO

Os complexos hidrográficos possuem papel essencial para a existência da vida, oferecendo suporte tanto para comunidades terrestres, quanto aquáticas (HÄDER *et al.*, 2020). E desde o início do século XX, os corpos hídricos tem sofrido grande acúmulo de poluente, oriundos das atividades humanas, alterando a qualidade da água e de vida dos seres vivos ali presentes (DA SILVA; POMPÊO; DE PAIVA, 2015; HÄDER *et al.*, 2020). Com o desenvolvimento da civilização, o aumento na poluição tem elevado proporcionalmente, causando grandes impactos nos ecossistemas aquáticos, principalmente nos que estão adjacentes as áreas antropizadas (DO AMARAL *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2020).

Deste modo, diversas substâncias tóxicas são lançadas no meio ambiente, como pesticidas, plásticos, fármacos, contaminantes orgânicos persistentes, entre outros, causando um desequilíbrio não somente na biota aquática, mas também na biota terrestre, que depende da água para sua sobrevivência (DUDGEON, 2019; QUEIROZ; SILVA, 2020). Assim, a ecotoxicologia, subdisciplina da toxicologia ambiental, estuda os impactos toxicológicos causados por contaminantes (xenobióticos) no meio ambiente, concentrando na proteção ambiental, e, estando integrada aos processos e procedimentos regulatórios (BELDEN, 2020).

Na ecotoxicologia, diversas espécies são utilizadas como organismos modelos para testes, como *Daphnia magna* (microcrustáceo) e *Pseudokirchneriella subcapitata* (alga) (QUEIROZ; SILVA, 2020). Contudo, um dos bioindicadores mais usados, é o zebrafish (*Danio rerio*), um teleosteo de água doce, que possui características que abrangem os critérios dos 3R's (*Replacement, Reduction and Refinement*) (TRIGUEIRO *et al.*, 2020).

O aumento populacional, a industrialização e o desenvolvimento tecnológico têm desencadeado o uso de grande quantidade de produtos químicos sintéticos, como pesticidas, gerando poluição em diversos ecossistemas, principalmente o aquático (HUSSAIN *et al.*, 2012; WITESKA *et al.*, 2014). Além do impacto ambiental causado, diversas infecções arbovirais tem surgido durante os últimos anos, como febre amarela, dengue, Chikungunya e, mais recentemente, vírus Zika (FALKOWSKI *et al.*, 2020). O uso desenfreado desses produtos sintéticos e a facilidade de adaptação de diversos insetos, ocasionou a resistência do *A. aegypti* aos larvicidas já existentes (HSU *et al.*, 2008;

ZHANG *et al.*, 2011; KIM; AHN, 2017). Então, com à necessidade de produtos eficazes e ecoamigáveis para controlar mosquitos vetores houve um aumento nas pesquisas em produtos naturais com potencial larvicida, principalmente para o *A. aegypti*, vetor das doenças já citadas (BENELLI, 2015; BENELLI; MEHLHORN, 2016).

Como resultado das pesquisas de larvicidas naturais, as quinonas, metabólitos secundários orgânicos encontrados em plantas (NAIN PÉREZ, 2014), mostraram-se com grande potencial larvicida (YANG; LIM; LEE, 2003; CHENG *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2020). Contudo, os testes ecotoxicológicos para saber quais efeitos secundários os larvicidas podem causar em organismos não-alvo são essenciais, como também, mais estudos para entender melhor sobre o mecanismo de ação das quinonas em *A. aegypti* (SILVA *et al.*, 2020).

Dessa forma, o presente estudo realizou testes embriotxicológicos (FET – *Fish Embryo Toxicity test*) com sete quinonas, pré-selecionadas de acordo com os resultados previamente obtidos como larvicidas (SILVA *et al.*, 2020). Portanto, com base nos dados do FET e com o teste de potencial atividade larvicida, uma molécula foi selecionada para a realização de testes com adultos de *Danio rerio*, os quais investigaram os efeitos genotóxicos (ensaio cometa e teste do micronúcleo) e os biomarcadores bioquímicos (glutathione-S-transferase, acetilcolinesterase e lactato desidrogenase).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Ecotoxicologia

Com o lançamento do livro *Primavera Silenciosa*, em 1962, de Rachel Carson, a qual apresentou ao mundo os efeitos deletérios dos pesticidas no ambiente, diversos questionamentos surgiram, principalmente quanto à toxicidade de certos compostos químicos no ambiente. Assim, em 1969, o termo ecotoxicologia surgiu, separando-se da Toxicologia Clássica, definido como “o ramo da Toxicologia que estuda os efeitos tóxicos das substâncias, naturais e artificiais, *in vivo*, animais ou vegetais, aquáticos ou terrestres, que constituem a biosfera” (TRUHAUT, 1977), sendo uma área inserida na Toxicologia Ambiental (STENERSEN, 2004).

A ecotoxicologia é a convergência entre dois grandes ramos da Biologia, a Ecologia e a Toxicologia. Dessa forma, estuda-se a integração entre os efeitos ecológicos e toxicológicos de poluentes químicos em distintos níveis biológicos, desde molecular e celular até ecossistemas, e, em diferentes níveis tróficos, além do homem (FORBES; FORBES, 1994; WALKER, 2006; BELDEN, 2020). Por essa razão, possui grande importância para estimar o efeito tóxico de substâncias, amostras ambientais e resíduos industriais (COSTA et al., 2008). A ecotoxicologia possui grande relevância para o controle e regulamentação de substâncias quanto ao risco ambiental (DOS SANTOS SILVA et al., 2015).

Os testes ecotoxicológicos são realizados com organismos-testes, chamados de bioensaios, que são feitos sob condições específicas e controladas. As espécies são selecionadas com base nos seguintes critérios: disponibilidade e abundância no ambiente, facilidade de cultivo em laboratório e conhecimento da sua biologia (BOHRER, 1995). Os testes podem ser divididos em agudos ou crônicos dependendo da variação do tempo de exposição. Os testes agudos acontecem em menor tempo, normalmente entre 24, 72 e 96 h, e são utilizados para observar uma resposta pontual, como mortalidade (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990). Já os testes crônicos são mais duradouros, podendo ocorrer durante todo ou parte do ciclo de vida do organismo, dessa forma, são observados efeitos em suas funções biológicas, por exemplo reprodução, crescimento e maturação (COSTA et al., 2008).

Apesar desses parâmetros, os testes de toxicidade têm limitações, assim, não substituem as análises químicas, uma vez que elas identificam e quantificam as

substâncias e os bioensaios avaliam o efeito dela no organismo biológico (COSTA *et al.*, 2008; BELDEN, 2020). Ademais, esses testes não proporcionam uma resposta linear sobre a toxicidade de determinado elemento para o ser humano, já que são indivíduos de espécies distintas (GRANEY, 1994) e em locais controlados (RIBO, 1997). E nem é possível aferir que uma única substância é encarregada de gerar específico efeito tóxico em determinado ecossistema, pois pode haver interações com outros componentes, desencadeando modificações físico-químicas, e, modificando sua atividade biológica (RONCO *et al.*, 2004; QUEIROZ; SILVA, 2020).

### 2.1.1 Ecotoxicologia aquática e poluição

A ecotoxicologia aquática tem se destacado bastantes nas últimas décadas (MAGALHÃES *et al.*, 2008; TRIGUEIRO *et al.*, 2020), uma vez que o ecossistema aquático é um dos principais depósitos de substâncias tóxicas, sendo essas substâncias depositadas diretamente no curso da água, emitidas pelo ar ou oriundas do solo (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990; KENDALL *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2008; QUEIROZ; SILVA, 2020), e, sejam eles naturais ou derivados de contaminações antropogênicas (ALTINDANG *et al.*, 2008; DA SILVA, D.; POMPÊO; DE PAIVA, 2015; HÄDER *et al.*, 2020). Dessa forma, a ecotoxicologia aquática avalia o efeito de contaminantes em indivíduos inseridos nesse ecossistema (RAND *et al.*, 1995; BELDEN, 2020), tanto durante o transporte, quanto na distribuição, na transformação e no destino final desse poluente (COSTA *et al.*, 2008).

A poluição de origem natural pode ser ocasionada devido a alguns processos geodinâmicos que promovem alterações nas características físico-químicas da água (MENDES; SANTOS, 2004). Já a contaminação proveniente de atividades humanas, definida pela Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 420 (2009), pode ser chamada de contaminantes emergentes (CE), ou seja, substâncias não controladas com efeitos tóxicos (GEISSEN, 2015). Sendo estes classificados em: fármacos (ex. antibióticos, anti-inflamatórios, psiquiátricos, analgésicos, reguladores lipídicos); produtos de beleza e higiene pessoal (ex. bronzadores, antissépticos, repelentes de insetos, fragrâncias); produtos químicos industriais (ex. plastificantes, anticorrosivos, aditivos de gasolina); hormônios, esteroides; e pesticidas (SILVA, 2015; SOARES; SOUZA, 2020).

Tais contaminantes podem ser advindos de fontes pontuais ou não pontuais (HOLT, 2000), sendo as primeiras descartadas diretamente na água, enquanto o segundo caso é proveniente de degradações atmosféricas e fluxos advindas do solo (COSTA *et al.*, 2008; SILVA, 2015) (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Classificação das fontes de poluição. Fonte: Adaptado de Holt (2000).

<b>Classificação</b>	<b>Características</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Pontual</b>	Facilmente detectados e controlados Despejados diretamente na água	Esgoto doméstico, rejeitos de mineração, efluentes industriais, enchentes
<b>Não pontual</b>	Difícilmente detectados e com difícil controle Originária de forma secundária	Práticas agrícolas (agrotóxicos e pesticidas), deposição atmosférica, obras de construções

Mesmo havendo tratamentos convencionais nos esgotos domésticos e efluentes industriais, a quantidade de poluentes despejada nos corpos hídricos ainda é elevada, ocasionando impactos ambientais (SOARES; SOUZA, 2020). Apesar de ser baixa a fração bruta dessas substâncias tóxicas, por conta da capacidade de diluição, o efeito crônico causado aos organismos aquáticos afeta seu desenvolvimento, reprodução e comportamento (GILLIS, 2012; PLAHUTA *et al.*, 2017; DE SOUZA *et al.*, 2020). Ademais, esses impactos não se restringem apenas ao ecossistema aquático, atinge a biota terrestre também, uma vez que a existência depende da água (DUDGEON, 2019; QUEIROZ; SILVA, 2020). Portanto, devido ao desequilíbrio que esses xenobióticos causam, a necessidade de monitoramento dessas substâncias e a busca por alternativas ecoamigáveis são essenciais.

## 2.2 O uso do zebrafish (*Danio rerio*) como sistema-modelo

Alguns organismos aquáticos são preferencialmente utilizados para bioensaios por serem melhores bioindicadores de qualidade ambiental, além de preencherem os critérios já citados anteriormente, tais como: disponibilidade e abundância no ambiente, facilidade de cultivo em laboratório e conhecimento da sua biologia (BOHRER, 1995). Por exemplo, destacam-se como sistema-modelo *Vibrio fischeri* (bactéria), *Daphnia magna* (microcrustáceo), *Thamnocephalus platyurus* (microcrustáceo), *Pseudokirchneriella subcapitata* (alga), *Pimephales promelas* (peixe) e *Danio rerio* (peixe).

O zebrafish (*Danio rerio*) conhecido popularmente como peixe paulistinha ou peixe-zebra (**Figura 1**) é um teleóstéo de água doce, com cerca de 4 cm quando adulto, pertencente à família Cyprinidae. São onívoros, ou seja, se alimentam tanto de material vegetal quanto animal, contudo, normalmente sua alimentação é a base de microinvertebrados e fitoplânctons. São animais ovíparos com reprodução e fecundação externa, e seu ciclo de vida dura cerca de 2 a 5 anos (RICO, 2007; OECD, 2013).



**Figura 1.** Zebrafish (*Danio rerio*). Biotério do laboratório de Genética Toxicológica (GTox) da Universidade de Brasília (UnB). Fonte: Autoria própria.

O zebrafish é usado como uma espécie alternativa de modelo experimental em várias vertentes da ciência, por exemplo: embriologia, genética, toxicologia, estresse (LAMMER *et al.*, 2009; STEENBERGEN; RICHARDSON; CHAMPAGNE; 2011), neurociência, biologia comportamental (VASCOTTO *et al.*, 1997; RICO, 2007; HE *et al.*, 2014), câncer e outras doenças humanas (DOOLEY; ZON, 2000; MIONE; TREDE, 2010), nanotoxicologia (PEREIRA *et al.*, 2019), entre outras. O uso dessa espécie têm sido crescente (SPRAGUE *et al.*, 2001) em diversos laboratório, pois esse animal possui

distintas características que o destacam, tais como: i) baixo custo; ii) facilidade de manutenção; iii) embriões translúcidos, permitindo avaliações teratogênicas e embrionárias; iv) possuem boa desenvoltura sexual, cada casal gera em torno de 50 ovos; v) simples cultivo em cativeiro, não necessitam de grandes espaços; vi) possuem todo o seu genoma sequenciado (KIMMEL *et al.*, 1995; BROUGHTON *et al.* 2001; RICO, 2007; OECD n° 236, 2013; MEYERS, 2018) e partilham homologia de aproximadamente 70% com os genes humanos, estando disponíveis bancos de dados online (Ensembl e Zfin) com informações genéticas (HOWE *et al.*, 2013; RUZICKA *et al.*, 2019). Ademais, tem sido muito utilizado em estudos genotóxicos por possuírem genes ortólogos nas vias de reparos com outros eucariotos, como humanos (PEI; STRAUSS, 2013).

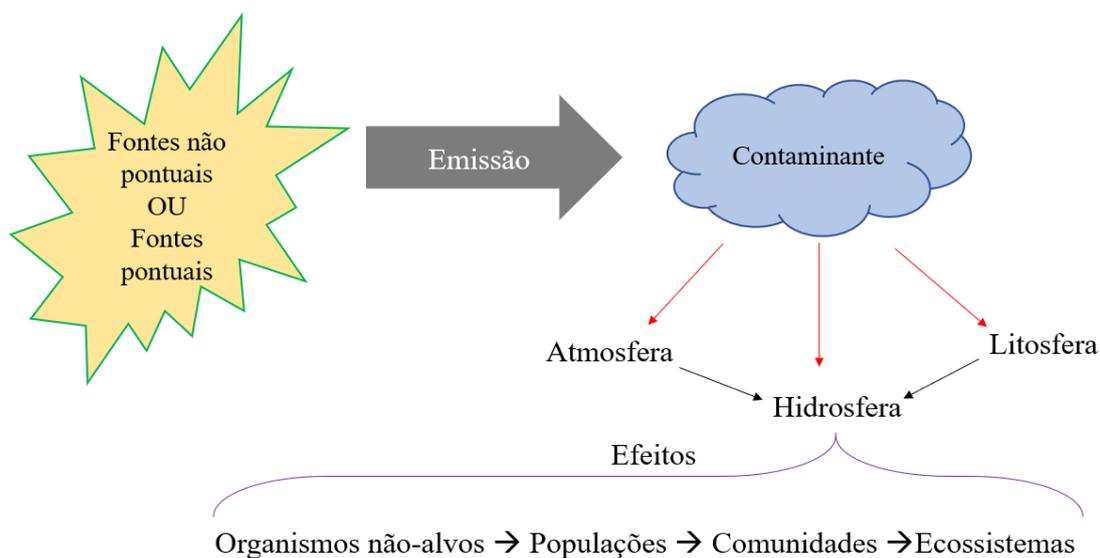
### 2.3 Pesticidas

A Legislação Brasileira (Lei n° 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto n° 4.074, de 04 de janeiro de 2002) intitulou os pesticidas como “agrotóxicos”. Sendo definidos como qualquer composto que seja utilizado para prevenção ou destruição de quaisquer formas de vida, seja ela animal ou vegetal, prejudiciais à agricultura (SANTISTEBAN, 1999). Estes são classificados em: (i) inseticidas; (ii) herbicidas; (iii) fungicidas; (iv) bactericidas; (v) entre outros (FERREIRA *et al.*, 2014; CARVALHO, 2017).

Tem sido identificado um crescente aumento de pesticidas na hidrosfera, sendo um grande obstáculo ambiental, principalmente, por conta dos efeitos tóxicos causados em organismos não-alvos (PALMA *et al.*, 2009; RASMUSSEN *et al.*, 2015; DO AMARAL *et al.*, 2018). Efeitos como alterações comportamentais, fisiológicas, bioquímicas, e, morte são algumas consequências da toxicidade por agrotóxicos (NORDBORG *et al.*, 2017; PÉREZ-PARADA *et al.*, 2018). Contudo, a busca por uma produtividade cada vez maior, com gastos reduzidos e aumento dos lucros faz com que a agricultura manipule cada vez mais pesticidas (MARTINS, 2010), por serem mais eficientes, mais baratos e de fácil manipulação (BERNARDINO, 2019).

No Brasil, há 450 substâncias registradas, com 2123 formulações comerciais voltadas para a agricultura (AGROFIT, 2019). Os dados apresentados pelo IBAMA, indicam uma utilização de cerca de 540 mil toneladas de substâncias no ano de 2017: 58% herbicidas; 12% fungicidas; e, 10% inseticidas (IBAMA, 2019). A maior parte

desses pesticidas são destinados, diretamente ou indiretamente, para o solo (BERNARDINO, 2019). E como destino final, esse contaminantes, derivados de fontes não pontuais, acabam em ambientes aquáticos afetando organismos não-alvos (COSTA *et al.*, 2008; YADAV *et al.*, 2015; DO AMARAL *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2020) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema representativo das etapas de contaminação. Fonte: Adaptado de Costa *et al.* (2008).

O Brasil por ser uma grande potência agrícola, tendo grande parte do Produto Interno Bruto (PIB) derivado dessa atividade, é primordial o uso de pesticidas (BARBOZA *et al.*, 2018). Contudo, estes usados de forma errônea podem fomentar nocividades à natureza e ao ser humano (COUTINHO *et al.*, 2005). Por essa razão, foi estabelecido, pelo Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que três órgãos seriam responsáveis por controlar e registrar o uso dessas toxinas: (i) o Ministério da Saúde (MS), por meio da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA); (ii) o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); e (iii) Ministério do Meio Ambiente (MMA), por meio do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (BASTOS *et al.*, 2016; HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2016).

### 2.3.1 Inseticidas

Os inseticidas são definidos como compostos químicos sintéticos, ou naturais, ou de fontes biológicas, que atuam de forma letal ou preventiva em insetos (WARE;

WHITACRE, 2012). Ademais, eles agem em diferentes fases do desenvolvimento dos insetos, enquanto ovo (ovocida), larva (larvicida) e adulto (adulticida). Por essa razão possuem grande importância para a agricultura mundial (BARBOZA *et al.*, 2018). Contudo, é importante a monitoração dessas substâncias pois é possível que elas sejam bioacumuladoras, ou seja, possuem a capacidade de se acumular no corpo do organismo. Ou talvez sejam substâncias biopersistentes, que não são biodegradadas e continuam nos indivíduos, e, seguindo pela cadeia trófica, podendo ainda sofrer biomagnificação (BASTOS *et al.*, 2016; HÄDER *et al.*, 2020).

Devido a esse desequilíbrio ambiental e sanitário que os inseticidas sintéticos desencadeiam, observa-se um desenvolvimento na conscientização ambiental e um aumento com os impactos à saúde (DING *et al.* 2015), e, um impulso no crescimento de novas alternativas menos danosas para humanos e para a natureza (JANKOWSKA *et al.*, 2019), como bioinseticidas e inseticidas naturais.

#### 2.3.1.1 Inseticidas químicos

Antes do século XX, o uso de pesticidas inorgânicos, que utilizassem elementos como arsênio e cobre, era comum. Contudo, após a II Guerra Mundial, os inseticidas de origem orgânica começaram a ser extensivamente utilizados. Principalmente, com a difusão do diclorodifeniltricloroetano (DDT) e do hexaclorociclohexano (HCH), produtos da classe dos organoclorados (OC), com baixo custo e grande eficiência. Contudo, após serem realizadas pesquisas para entender um pouco mais a forma de atuação desses químicos, evidenciou-se que tais compostos possuíam alta lipofilicidade e baixa degradação, favorecendo a biomagnificação ao longo da cadeia alimentar. Por gerar danos ao meio ambiente e a saúde humana, tais substâncias foram proibidas (SAOUDI *et al.*, 2014; BARBOZA *et al.*, 2018).

Desde a proibição dos organoclorados (OC), vários outros inseticidas foram desenvolvidos, tais como: (i) organofosforados (OP); (ii) carbamatos (CB); (iii) piretróides (PI); (iv) aminas; (v) anilinas; (vi) compostos heterocíclicos azotos (BARBOZA *et al.*, 2018). Os organofosforados, exemplo Temefós, e carbamatos, exemplo Carbaril e Bendiocarbe, que inibem irreversivelmente a enzima colinesterase. Enquanto, os piretróides, exemplo Deltrametrina e Cipermetrina, são a classe mais usada mundialmente, eles agem na membrana do neurônio, modificando o impulso nervoso. Já

as outras classes atuam na inibição de quitina (BASTOS *et al.*, 2016; CAVALCANTI, 2017).

No Brasil, os inseticidas mais utilizados são os organofosforados e os piretróides (BRASIL, 2009; GOMES *et al.*, 2016; BELLINATO *et al.*, 2016; ZHANG, 2018). Sendo o Temefós o larvicida mais usado, principalmente para o controle do mosquito *A. aegypti* (BASTOS *et al.*, 2016). Contudo, o uso excessivo desses inseticidas tem selecionado populações resistentes desses mosquitos, e, conseqüentemente, diminuído a efetividade do controle químico (DAVID *et al.*, 2018).

### 2.3.1.2 Bioinseticidas

Os inseticidas de origem biológica podem advir de fungos, bactérias, plantas ou vírus (FREIRE, 2012; ZHANG, 2018). Um dos larvicidas mais indicados para a saúde pública é o *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI) (BASTOS *et al.*, 2016). Uma bactéria gram-positiva, endopatógena, e, naturalmente encontrada em solos (LERECLUS, 1988). Sua toxina é liberada na forma de um cristal, que após ingerido pela larva, induz destruição do tecido epitelial, e, conseqüentemente a paralisia do intestino, levando-a à óbito (BASTOS *et al.*, 2016). Essa seletividade não atinge seres humanos ou peixes, ou outros organismos. Contudo, afetam outras espécies de dípteros (HOFTE; WHITELEY, 1989). Além disso, outro ponto negativo de seu uso é que sob luz forte e calor intenso, características marcantes do Brasil, há a inativação do produto, sendo ineficaz para o mosquito da dengue em regiões tropicais (VALLE; BELINATO; MARTINS, 2015).

### 2.3.1.3 Inseticidas naturais

Produtos naturais sempre demonstraram ser uma fonte infinita de compostos bioativos (FALKOWSKI *et al.*, 2020). Com o aumento de doenças virais transmitidas por artrópodes, como febre amarela, dengue, Chikungunya e, mais recentemente, vírus Zika (ZIKV) (BENELLI, 2015; BENELLI; MEHLHORN, 2016); com o uso desenfreado de inseticidas químicos, que causam poluição ambiental, intoxicação humana e de seres não-alvos; e, a resistência da população do *A. aegypti*, pesquisas sobre inseticidas naturais se tornaram mais frequentes (NEVES *et al.*, 2017; JANKOWSKA *et al.*, 2019). A

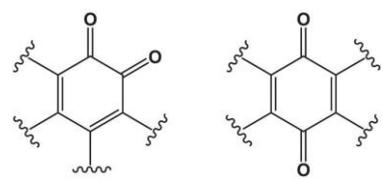
necessidade de produtos eficazes e ecoamigáveis tem sido imprescindível para controle de mosquitos vetores desses patógenos.

Os inseticidas naturais podem ser derivados de metabólitos secundários, que podem ser de diferentes classes: (i) alcalóides; (ii) flavonóides; (iii) cumarinas; (iv) taninos; (v) quinonas; (vi) terpenóides; e (vii) óleos essenciais (DIETRICH, *et al.*, 2011; SILVÉRIO *et al.*, 2020). E possuem diversas propriedades vantajosas como: (i) baixa toxicidade ou nenhuma para o ecossistema e seres não- alvos; (ii) são substâncias bioativas e biodegradáveis; e (iii) possuem alta seletividade (DE ALMEIDA VIANA; DE GOES SAMPAIO; MARTINS, 2018). Contudo, apesar de promissor, pesquisas de inseticidas naturais maior parte das vezes se limita à escala laboratorial, faltando estudos relatando sua aplicação em um ambiente de campo (SILVÉRIO *et al.*, 2020).

#### 2.3.1.3.1 Quinonas

As quinonas são metabólitos secundários orgânicos encontrados em plantas, e também em alguns fungos, bactérias e em alguns animais, como equinodermos e artrópodes (NAIN PÉREZ, 2014). Sua estrutura molecular é composta por dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, sendo classificadas em: (i) benzoquinonas; (ii) naftoquinonas; (iii) antraquinonas; e (iv) fenantraquinonas (MONKS *et al.*, 1992; SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016; EL-MAGHRABEY *et al.*, 2021) (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Classificação das quinonas e estrutura básica. Fonte: Adaptado Sousa; Lopes; Andrade (2016).

Classificação	Estrutura Básica
Benzoquinona	
Naftoquinona	

Antraquinona	
Fenantraquinona	

As quinonas são bastante estudadas devido à sua ampla existência na natureza, mais de 1.200 tipos já foram estudados (EL-NAJJAR *et al.*, 2011). Além disso, elas fazem parte de diversos processos químicos e biológicos que fomentam sua importância (BRETON *et al.*, 1996). Sua participação em etapas biológicas se dá principalmente por conta do seu caráter oxidativo (DIAS *et al.*, 2018). Além disso, elas também possuem a característica de serem eletrofílicas (MONKS *et al.*, 1992), característica que dão grande dinamismo às moléculas.

Apesar de a sua atividade inseticida ser estudada há muitos anos, existem poucos trabalhos sobre o assunto (TAHER *et al.*, 1983; CHENG, *et al.*, 2008). Apenas recentemente, Silva *et al.* (2020) publicou um estudo sobre a atividade larvicida e pupicida de 31 quinonas, no qual 8 mostraram melhores resultados, como atividade residual contra *A. aegypti*. Ademais, no mesmo estudo, relacionaram o posicionamento do grupo metil com a potencialidade da molécula. Contudo, o estudo não soube informar a atuação metabólica das moléculas. Dessa forma, sendo necessária mais investigações sobre tais estruturas, principalmente sobre sua relação entre estrutura e atividade biológica.

#### 2.4 *Aedes aegypti*

O *A. aegypti* (Diptera: Culicidae) é um mosquito de porte pequeno (~ 4 mm), cor escura, com linhas brancas no tórax em formato de lira (OLIVEIRA, 2015) e com o seu desenvolvimento holometabólico (SOARES DA SILVA *et al.*, 2015). São originários da África, mas agora são comumente encontrados em regiões tropicais e subtropicais (BRAGA, 2015; FALKOWSKI *et al.*, 2020). Possuem preferência por ambientes urbanos, raramente são encontrados em locais silvestre ou semissilvestres, o que beneficia sua reprodução e alimentação (ZARA *et al.*, 2016; SANTA CATARINA, 2018). O sucesso ecológico da espécie é favorecido pelo comportamento oportunista, alta capacidade de adaptação e características fisiológicas, em conjunto com a globalização e urbanização acelerada (CARVALHO; MOREIRA, 2017; ABÍLIO *et al.*, 2018).

O mosquito *Ae. aegypti* é o principal vetor de arboviroses como: vírus da dengue (DENV), vírus da Chikungunya (CHIKV), vírus da Zika (ZIKV) e vírus da febre amarela (VFA) (FONSECA *et al.*, 2019). No Brasil, essas doenças têm causado grande preocupação na Saúde Pública. Os casos dessas doenças têm aumentado bastante nos últimos anos, principalmente a dengue, que comparado à 2018 houve um incremento de 597,3% no número de ocorrências prováveis (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019). O crescimento de ocorrências dessa doença não ocorre apenas por conta do descaso da população brasileira com a água parada e o lixo (LUTINSKI *et al.*, 2013), mas também por conta da característica da fêmea conseguir realizar múltiplas ingestões de sangue durante um único ciclo gonadotrófico, aumentando a sua capacidade de contaminação (ZARA *et al.*, 2016; TERRA *et al.*, 2017).

Por fim, o controle de vetores como o *A. aegypti* é uma ferramenta importante, se não a única, para o combate dessas arboviroses. Com a expansão dos casos junto com o aumento da resistência a inseticidas químicos exige o desenvolvimento de novas moléculas para controle das populações invasoras de mosquitos (HIGGS; VANLANDINGHAM, 2015; CARVALHO; MOREIRA, 2017; MOYES *et al.*, 2017).

## **2.5 Mecanismos de aquisição de resistência genética do *A. aegypti* aos inseticidas químicos sintéticos tradicionais**

A maioria dos casos de resistência aos inseticidas está associada ao aumento da capacidade metabólica de desintoxicação. As principais enzimas envolvidas nesses processos de resistência são as esterases, oxidases e glutatona transferases. Os inseticidas

organofosforados e carbamatos são metabolizados pelas acetilcolinesterases (AChE). Os inseticidas organoclorados e piretróides são alvo de resistência através da redução da sensibilidade do inseto mediada por alterações nos canais iônicos das membranas das células nervosas. Isto é, alteração no sítio alvo do inseticida (CHEN *et al.*, 2001; MONTELLA *et al.*, 2007; HSU *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2011; KIM; AHN, 2017).

Há na literatura inúmeros casos relatando a aquisição de resistência genética de insetos aos inseticidas. Esse mecanismo é considerado uma adaptação evolutiva às alterações no ambiente. Os mecanismos genéticos de aquisição de resistência aos inseticidas estão associados ao aumento da atividade enzimática que ocorre devido aos mecanismos de amplificação gênica ou ao aumento na expressão dos genes relacionados metabolismo de xenobióticos, e em ambas as situações ocorre um aumento nos níveis de RNAs mensageiros codificadores das enzimas metabolizadoras. Em outros casos, ocorrem mutações gênicas que aumentam a capacidade catalítica do centro ativo das enzimas. Assim, baseado no fato que a resistência está diretamente relacionada a grupos de genes específicos, e que estes genes existem numa mesma população, porém em frequências baixas, o uso de inseticidas seleciona e eleva as frequências desses genes que então difundem-se para toda a descendência dessa população.

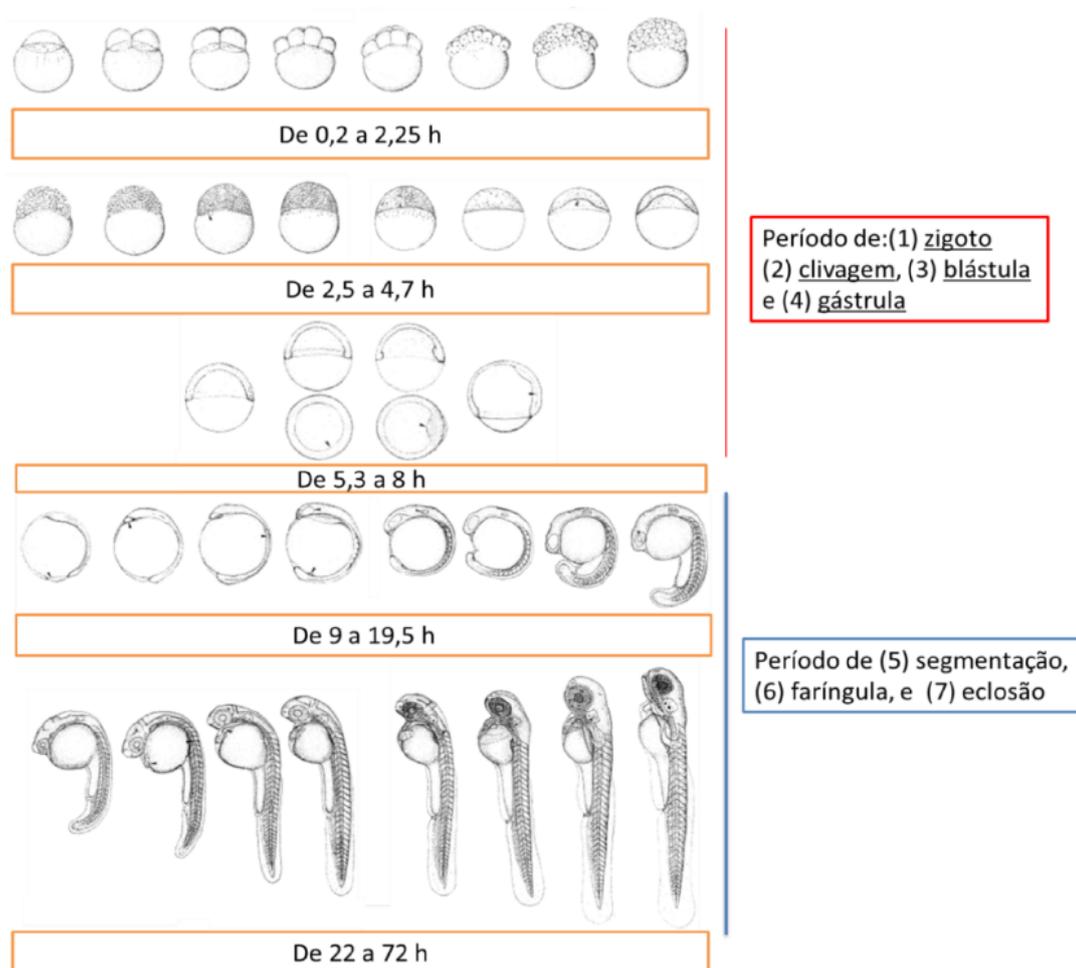
Ainda, Grant e Hammock (1992) mostraram que linhagens de *A. aegypti* resistentes a inseticidas tinham uma superprodução da enzima glutationa-S-transferase (GST) devido a uma mutação que levou a perda de função de um fator de repressão da transcrição do gene codifica essa enzima (DELIBERTO; WERNER, 2016). Há no Brasil vários relatos de casos de resistência adquirida do *A. aegypti* nas mais diferentes regiões. Os primeiros casos de resistência ao Temefós (organofosforado) foram relatados em populações investigadas nos municípios de Goiânia (GO) e de Marília (SP). Posteriormente, outras pesquisas mostraram a presença de *A. aegypti* resistentes em outras localidades, como Jacarezinho, Presidente Prudente e Santos (SP), e no Ceará. Casos de resistência também já foram reportados em populações de Sergipe e Alagoas em 2001. As análises moleculares demonstraram que a resistência ocorre devido às alterações nos canais de sódio que são sítio-alvo dos inseticidas piretróides. Mutações causando a substituição de um único aminoácido na proteína de sustentação do canal de sódio causa a redução da interação com o inseticida e conseqüentemente levando a resistência do inseto ao piretróide (BRAGA; VALLE, 2007).

Aquisição genética da resistência através da superexpressão de genes metabolizadores: exposições do *A. aegypti* ao Temefós aumentaram os padrões de expressão dos genes que codificam as famílias gênicas GSTs e CYPs. Estudos com *microarrays* e RT-PCR conseguiram mapear os genes que tem as suas expressões aumentadas: da família GSTs – GSTi1, GSTo1 e GSTx2, da família P450 o gene CYP6N12. Em relação à exposição aos piretróides permetrina e deltametrina, os genes da família P450 – CYP9j32, CYP9j24 e CYP9j10 tiveram uma superexpressão (STRODE *et al.*, 2012).

Amostras de *A. aegypti* coletados na região urbana de Foz do Iguaçu, resistentes aos inseticidas piretróides passaram por análises moleculares, onde se descobriu uma mutação por substituição de par de base no DNA. A troca de uma adenina por uma guanina provoca uma substituição de um aminoácido valina por isoleucina na proteína do canal de sódio (Val1016Ile), que é suficiente para alterar a sua estrutura primária, por onde o piretróide atuaria provocando os seus efeitos neurotóxicos. O defeito no canal de sódio torna o inseto insensível aos efeitos tóxicos do inseticida (BONA *et al.*, 2012).

## 2.6 Fish Embryo Toxicity (FET – Test)

*Fish Embryo Toxicity* (FET) *test* surgiu em 2013, como protocolo para testes embriotóxicológicos agudos (OECD n° 236, 2013). O teste é fundamentado na utilização de ovos fertilizados expostos a uma substância química e no desenvolvimento embrionário, com controle positivo, negativo e solvente, se necessário, e, pelo menos cinco concentrações da substância teste. Kimmel *et al.* (1995) detalha a embriogênese do *D. rerio* (**Figura 3**) que é utilizado como referências para testes embriotóxicos até hoje.



**Figura 3.** Desenvolvimento embrionário do zebrafish (*Danio rerio*) adaptado de Kimmel *et al.* (1995). Embriogênese em 72 horas pós-fertilização (hpf): (1) o zigoto, (2) clivagem, (3) blástula, (4) gástrula, (5) segmentação, (6) farínghula, (7) e os períodos de incubação (eclosão).

Devido a transparência dos embriões de zebrafish é possível avaliar alterações em parâmetros de desenvolvimento embrionário como: pigmentação do corpo e olhos, formação do otólito, formação dos somitos, presença de batimento cardíaco, separação da cauda do saco vitelino, edemas, estase sanguínea, formação do telencéfalo, absorção e escurecimento do saco vitelino e eclosão. Ademais, a mortalidade antes e após a eclosão também é verificada. Após a eclosão novos parâmetros podem ser observados, como: inflação da bexiga natatória, malformações da cauda, alteração comportamental (equilíbrio).

## 2.7 Biomarcadores enzimáticos

Um dos efeitos causados por xenobióticos é a alteração na produção e estocagem de espécies reativas de oxigênio (EROs), que desencadeia um desequilíbrio na capacidade do organismo em se desintoxicar, que por fim, causam o estresse oxidativo (PIZZINO *et al.*, 2017). Em consequência desse estresse oxidativo, enzimas podem ser inibidas ou induzidas, sendo chamadas de enzimas antioxidantes (GONCA; ARZU, 2017). Juntos, o estresse oxidativo e as enzimas antioxidantes são utilizados como biomarcadores bioquímicos para estudos toxicológicos de contaminantes por diversas áreas (GAO *et al.*, 2018; MUTHULAKSHMI *et al.*, 2018).

Em organismos aquáticos, o estresse oxidativo é a primeira resposta a exposição de contaminantes, gerando uma resposta de reparo ou neutralização por enzimas, como glutathione-S-transferase (GST), uma das principais enzimas que participam da fase II de desintoxicação celular (GLISIC *et al.*, 2015). A GST age por meio da catalisação da conjugação de glutathione (GSH) com contaminantes, deixando-os menos tóxico, facilitando a excreção (COGO *et al.*, 2009). Ademais, a GST age também na inibição de peroxidação lipídica e indiretamente na indução do reparo do DNA (YAN *et al.*, 2015), assim, se houver inibição da atividade da GST pode haver uma desestabilização na membrana lisossômica (COGO *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo pode alterar outras enzimas como a acetilcolinesterase (AChE), na qual alterações podem mostrar efeitos neurotóxicos em um organismo (RAMESH *et al.*, 2020), e, a lactato desidrogenase (LDH), com grande importância para a via anaeróbica de produção de energia, indicando perdas na integridade do tecido ou baixa disponibilidade de oxigênio (DA SILVA SANTOS *et al.*, 2018; DAR *et al.*, 2020).

A AChE é popularmente utilizada como biomarcador de poluição ambiental, uma vez que normalmente é inibida por compostos neurotóxicos (PFEIFER; SCHIEDEK; DIPPNER, 2005; YEN *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Ademais, esse biomarcador é bastante utilizado em estudos sobre pesticidas, como organofosforados e carbamatos, os quais inibem sua atividade (PRETTO *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Contudo, muitos estudos tem demonstrado uma relação entre a AChE com a resistência de alguns insetos aos pesticidas orgânicos, incluindo larvicidas para *A. aegypti* (CHEN *et al.*, 2001; MONTELLA *et al.*, 2007; HSU *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2011; KIM; AHN, 2017). Assim, há a necessidade de pesticidas que atuem em diferentes vias metabólicas nos insetos, sem prejudicar organismos não-alvo.

A LDH possui relação direta com o metabolismo energético do organismo, uma vez que tem papel essencial na interconversão do piruvato em lactato na via glicolítica (anaeróbica) (OSMAN *et al.*, 2007; SARAVANAN *et al.*, 2011; JIA *et al.*, 2020). Assim, caso haja um aumento na atividade enzimática pode estar relacionada com danos na membrana celular ou com apoptose (RAI *et al.*, 2015; KREUZ; FISCHLE, 2016; ZHANG *et al.*, 2021). A morte celular programada é um mecanismo essencial para o organismo, e, acontece através de mecanismos bioquímicos, os quais dependem de energia (ELMORE, 2007), podendo essa ocorrer como mecanismo de defesa do organismo a doenças e contaminantes (SULUKAN *et al.*, 2017). Portanto, a indução da atividade dessa enzima está relacionada a exposições a xenobióticos.

## 2.8 Testes genotóxicos

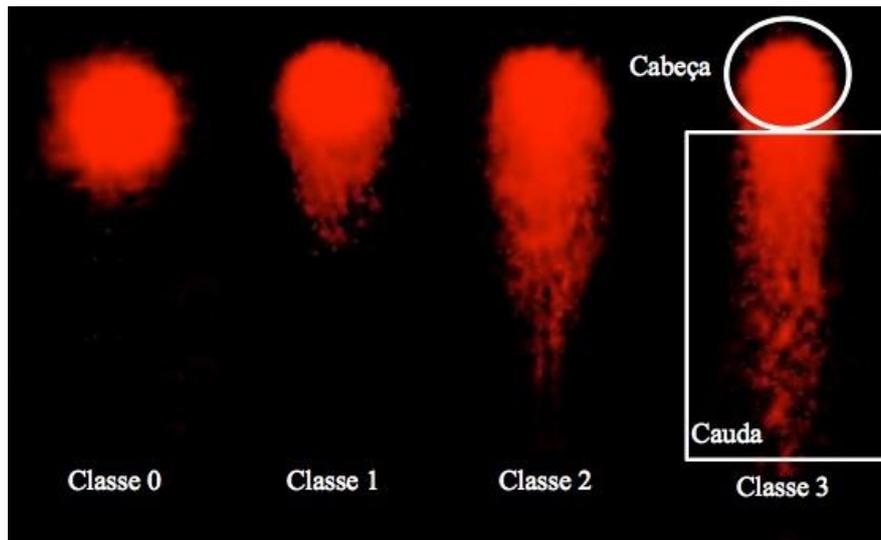
Genotoxicidade é um termo que abrange de forma geral danos no DNA e alterações mutagênicas. Segundo o protocolo n° 487 (OECD, 2016), os efeitos genotóxicos estão inclusos “todos os tipos de danos ao DNA ou cromossomos, como quebras, deleções, modificações e ligações de nucleotídeos, rearranjos, mutações gênicas, aberrações cromossômicas e aneuploidias”. Dessa forma, possibilita identificar substâncias que causam danos genéticos nas células.

Para a identificação desses efeitos genotóxicos dois testes são bastante utilizados: (I) ensaio cometa, para danos no DNA; (II) teste do micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN), para alterações mutagênicas.

### 2.8.1 Ensaio cometa

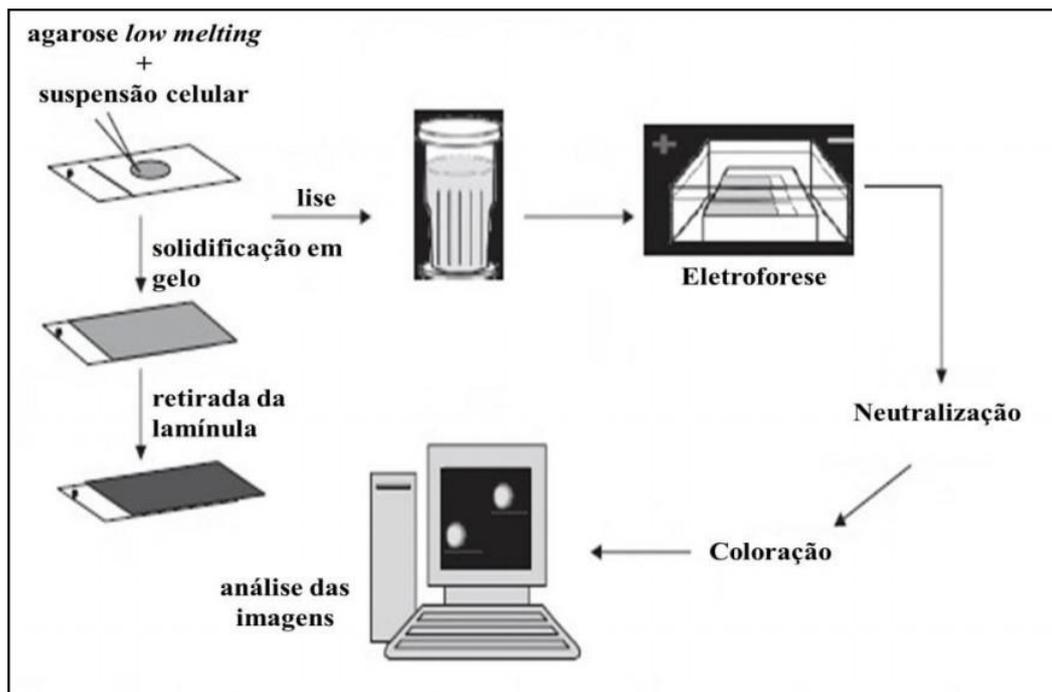
O ensaio cometa ou eletroforese em gel de célula única (*single cell gel electrophoresis assay* – SCGE) avalia danos no DNA, ou seja, efeitos genotóxicos gerados por xenobióticos. Técnica simples, rápida, de baixo custo e bem estabelecida, possibilita avaliar além de danos ao DNA, os mecanismos de reparo (COLLINS, 2004; CHANG *et al.*, 2017). Essa técnica é embasada na migração do DNA em uma matriz de agarose sob eletroforese (HARTMANN *et al.*, 2003). Os fragmentos de DNA são carregados negativamente nas extremidades por essa razão são atraídos em direção ao ânodo. Dessa forma, quanto maior for o número de danos nessas extremidades, maior será a quantidade

de fragmentos de DNA, que interferirá na distância da cabeça do cometa ao final da cauda (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995) (**Figura 4**).



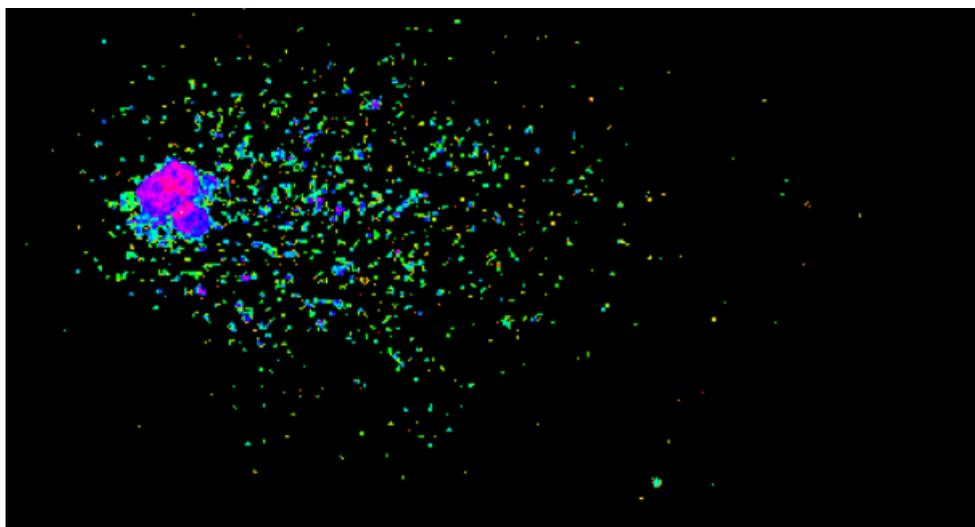
**Figura 4.** Classificação dos cometas. Sem danos, núcleo normal (classe 0), com pequenos danos ao redor do núcleo (classe 1), crescimento gradual do comprimento da cauda desde a classe 1 à classe 3 com uma diminuição do material genético paralelamente (classe 2 e 3). Fonte: Adaptado Cortés-Gutiérrez *et al.* (2012).

A metodologia pode ser dividida nos seguintes passos (HARTMANN *et al.*, 2003): (i) preparação das lâminas de microscopia recobertas com uma camada de células em meio a agarose; (ii) solução de lise detergente e saturada de sais para romper a membrana das células e liberar o DNA; (iii) descompactamento do DNA e formação de quebras de fita simples em sítios alcali-lábeis através de uma solução com pH elevado; (iv) eletroforese; (v) neutralização do pH alcalino; (vi) fixação com álcool etílico; (vii) coloração com um composto intercalante de DNA (**Figura 5**).



**Figura 5.** Esquema das principais etapas do teste do cometa. Fonte: Adaptado de Dhawan *et al.* (2009).

O ensaio cometa é bastante utilizado na área de toxicologia genética, para verificar a genotoxicidade de compostos químicos e biomonitoramento ambiental (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009; DE LAPUENTE *et al.*, 2015; ŽEGURA; FILIPIČ, 2019). Uma vez que a exposição a compostos genotóxicos podem causar danos diretos ou indiretos ao DNA (CANEDO; ROCHA, 2020) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Foto de um nucleóide com fragmentação do DNA na cauda. A foto foi tirada usando o programa CometScore versão 2.0.0.38. Fonte: Autoria própria.

O mecanismo de dano direto não necessita de vias metabólicas ou outro tipo de modificação molecular para haver o dano ao DNA. Enquanto o mecanismo indireto necessita de bioativação, para que o xenobiótico seja ativo e capaz de gerar efeitos genotóxicos ou gere reativos intermediários (COHEN; ARNOLD, 2011; BARNES *et al.*, 2018). Um exemplo de reativo intermediário é o estresse oxidativo, causado pela formação de EROs (KRYSTON *et al.*, 2011), que por sua vez são geradas por fatores exógenos ou endógenos (BARNES *et al.*, 2018). A superprodução de EROs pode alterar a integridade da membrana nuclear, e, conseqüentemente, causar danos ao DNA (XU *et al.*, 2013).

Esses danos, causados diretamente ou indiretamente, podem ser reparados por diversos mecanismos, como por excisão de bases (BER) e por excisão de nucleotídeos (NER), contudo, a falha no reparo pode ocasionar mutações, câncer e lesões no DNA que serão herdadas por células-filhas (COHEN; ARNOLD, 2011; HERRÁEZ *et al.*, 2017; CUNHA, 2019).

### 2.8.2 Teste do micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN)

De acordo com o protocolo nº 487 (OECD, 2016) “os micronúcleos podem se originar de fragmentos cromossômicos acêntricos (ou seja, sem um centrômero) ou cromossomos inteiros que são incapazes de migrar para os polos durante o estágio de anáfase da divisão celular”. Dessa forma, o teste possibilita identificar substâncias clastogênicas (que quebram cromossomos) e aneugênicas (que induzem aneuploidias ou segregação cromossômica anormal) (FENECH, 2000; FENECH *et al.* 2003; RAO *et al.*, 2008; VRAL *et al.*, 2011; UDROIU *et al.*, 2015). Ademais, os MNs possuem atividade transcricional reduzida, ocasionada pela malformação do complexo de poro nuclear e falhas na importação nuclear (HOFFELDER *et al.*, 2004) gerando um dano grave e irreversível para célula (DEPLEDGE; FOSSI, 1994; SADIQUL *et al.*, 2016).

Durante a avaliação de MNs é possível analisar também a ocorrência de outras anormalidades nucleares (AN), que possuem relação com erros ocasionados ao longo da mitose, como morte celular (apoptose e necrose), além de genotoxicidade (FENECH, 2000). De acordo com Kirsch-Volders *et al.* (2002), os brotos nucleares derivam do processo de exclusão de MNs do núcleo principal. Já anomalias conhecidas como “blebbed”, “lobed” e “notched”, segundo Carrasco *et al.* (1990) também são causadas

pela ação mutagênica. Os núcleos “blebbed” possuem uma pequena invaginação da membrana e da cromatina, enquanto que os “lobed” a invaginação da membrana e da cromatina é maior, formando lobos, por fim, o núcleo “notched” possuem profundas invaginações ou ainda lacunas que não contêm cromatina (CARRASCO *et al.*, 1990; VILCHES, 2009). Ademais, outras ANs também podem ser identificadas como núcleo binucleado, no qual a célula apresenta dois núcleos, que possuem aproximadamente o mesmo tamanho, e, vacúolos, ou “vacuolated”, uma cavidade dentro do limite nuclear (CARRASCO *et al.*, 1990; SADIQUL *et al.*, 2016).

Portanto, as ANs e MNs são considerados indicadores de mutagênese, ocasionando um dano genotóxico grave e irreversível nas células (DEPLEDGE; FOSSI, 1994; SADIQUL *et al.*, 2016). Sendo um indicador adequado para detectar o estado de saúde de peixes e meio ambiente (ERGENE *et al.*, 2007; SADIQUL *et al.*, 2016).

### 3 JUSTIFICATIVA

Em inúmeras localidades no Brasil e em diferentes países já foi detectado um aumento na resistência genética do *A. aegypti* ao Temefós, um dos larvicidas organofosforados recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Por essa razão, há uma forte necessidade de busca por produtos alternativos eficientes (BUSATO *et al.*, 2015). Assim, no rastreamento de novas moléculas com potencial larvicida, as quinonas tem-se apresentado como candidatas, pois apresentaram certa toxicidade às larvas do *Aedes*. Como tais moléculas seriam usadas no ambiente aquático, há a necessidade de se conhecer os possíveis riscos à biota aquática, isto é aos organismos não-alvo.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa avaliar a ecotoxicidade do emprego de quinonas como larvicidas alternativos no controle do mosquito *Aedes aegypti* em organismos modelo, o zebrafish (*Danio rerio*).

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar por meio do *Fish Embryotoxicity Test* (FET) o potencial embriotóxico das quinonas;
- Avaliar se a exposição aguda à ArboS31 possui potencial genotóxico, através da avaliação da fragmentação do DNA e mutagenicidade em adultos de zebrafish;
- Averiguar se a exposição aguda à ArboS31 causa alteração bioquímica em adultos de zebrafish.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnBDoC n° 113/2019, ANEXO A). Ademais, todos os procedimentos seguiram os princípios éticos de experimentação animal, visando evitar ou minimizar o estresse, a angústia, a dor e o desconforto.

O presente projeto é extensão do projeto “*ArboControl* Brasil – Arbovírus dengue, Zika e Chikungunya compartilham o mesmo inseto vetor: o mosquito *Aedes aegypti* – moléculas do Brasil e do mundo para o controle, novas tecnologias em saúde e gestão da informação, educação e comunicação”, componente 1 “Pesquisa para o controle do vetor *Aedes aegypti*”, da Faculdade de Saúde (FS – UnB) em parceria com a FUNASA – Ministério da Saúde (MS).

### 5.1 Moléculas

Com base no estudo anterior com larvas de *A. aegypti* (SILVA *et al.*, 2020) foram selecionadas sete moléculas da classe quinonas, obtidas através da extração de uma planta do cerrado (*Conarus suberosus*) e comercialmente pela Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Todas as moléculas foram fornecidas pelo Laboratório de Farmacognosia (FS – UnB), onde são realizados os testes com *A. aegypti* e a extração, sob a coordenação da professora Dra. Laila Espindola.

Para auxiliar na determinação das concentrações-teste, foram fornecidas as CL<sub>50</sub> em 24 h, 48 h e 72 h de exposição em *A. aegypti*, das sete quinonas selecionadas (**Tabela 3**). As quinonas utilizadas não eram solúveis em água, necessitando o uso de solventes. Dessa forma, durante todo o projeto o solvente selecionado para diluição de todas as quinonas foi o dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO), que não ultrapassou a concentração de 1% (MAES *et al.*, 2012).

A descrição e a caracterização físico-química, com o respectivo nome químico de cada molécula não foi divulgada, devido a confidencialidade das informações do projeto. As moléculas do projeto *ArboControl* Brasil são potenciais alvos de patentes como larvicidas contra o *A. aegypti*, por isso estão codificadas para manter o sigilo.

**Tabela 3.** Tabela com a CL<sub>50</sub> das quinonas selecionadas para estudos ecotoxicológicos (Laboratório de Farmacognosia – FS, UnB).

Quinona	CL <sub>50</sub> (mg/L)		Classificação****
	24*	48**, 72h ***	
Arbo4A064E	23,5*		Benzoquinona
		15,6**	
ArboS31	1,1*		Antraquinona
	0,75**		
		0,5****	
ArboS17	5,1*		Antraquinona
		4,8**	
ArboS97	5,8*		Naftoquinona
		3,8**	
ArboS22	> 10,0*		Antraquinona
	2,3**		
		1,3****	
ArboS18	> 10,0*		Antraquinona
	5,9**		
		2,8****	
ArboS1	12,9*		Antraquinona
	5,4**		
		1,8****	

\*\*\*\*As quinonas apresentadas na tabela são derivadas dos grupos (antraquinonas, benzoquinonas e naftoquinonas).

## 5.2 Manejo do modelo animal – Zebrafish (*Danio rerio*)

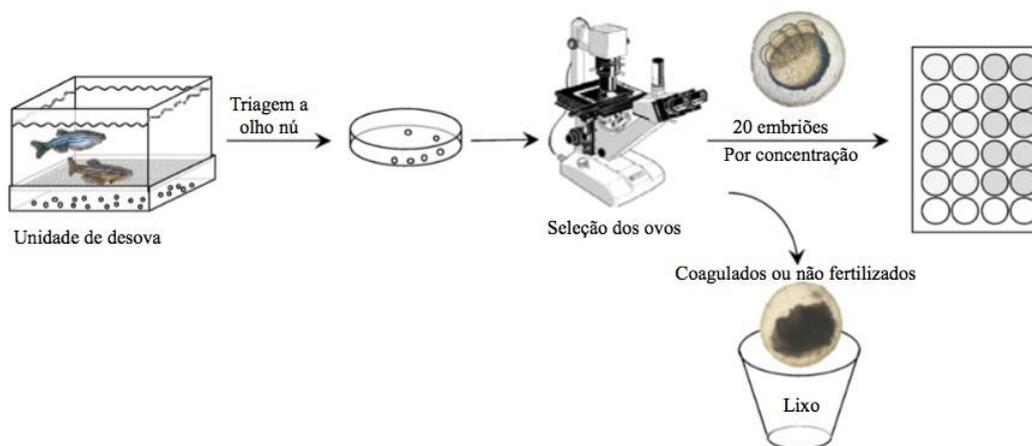
Os peixes (linhagem selvagem) usados foram fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Genética Toxicológica (GTox) da Universidade de Brasília (UnB), os quais foram mantidos em condições físicas e químicas regulares: pH 7,2 - 7,6; dureza 6.7 ppm; temperatura de  $26 \pm 1$  °C; condutividade 468  $\mu$ S, e, com um fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro (OECD n° 236, 2013). Com relação a alimentação, eles são

alimentados de duas a três vezes ao dia com rações comerciais e alimentação viva (nauplii de *Artemia salina*).

### 5.3 Testes embriotóxicos

#### 5.3.1 Produção e seleção de ovos

Um dia antes do teste, foram colocados peixes adultos machos e fêmeas, numa proporção de 1:2, em caixas de acasalamento, que possuem barreiras físicas, as quais foram retiradas no dia seguinte, um pouco antes das luzes se acenderem, possibilitando a desova. Normalmente, a desova ocorre entre 30 a 120 min após o acendimento da luz. Devido ao desenvolvimento acelerado do zebrafish, há uma necessidade de retirada e tratamento dos ovos de forma rápida. Os ovos são lavados pelo menos três vezes com água do meio de cultivo (água do sistema). Posteriormente, é realizada uma triagem a olho nu, retirando os ovos coagulados (inviáveis), seguida de uma criteriosa seleção no estereomicroscópio (Sterioscopic STEMI 2000 - Zeiss), a qual são escolhidos ovos em estágios similares e sem anomalias. Por fim, os embriões viáveis são distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais (**Figura 7**).



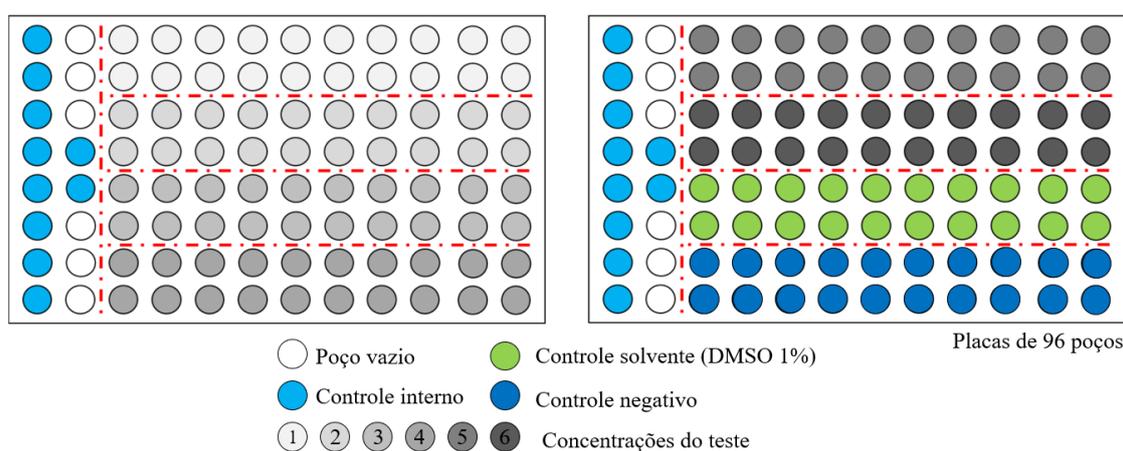
**Figura 7.** Esquema sintetizando da produção e seleção dos ovos. Fonte: Adaptado do protocolo OCDE nº 236.

#### 5.3.2 Fish embryo toxicity test (FET)

Os ensaios foram adaptados do protocolo OECD nº 236 (Guideline on Fish Embryo Toxicity Test – FET). Após a seleção dos ovos viáveis, os embriões foram pré-expostos em microplacas para que fosse garantida a exposição logo nos estágios iniciais.

Enquanto ocorria essa etapa, paralelamente, as triplicatas experimentais para a exposição aguda eram preparadas.

A exposição foi realizada em placas de 96 poços, com 200 $\mu$ L por poço. Cada concentração tinha 20 indivíduos por réplica, totalizando 60 indivíduos por grupo (n=60). As concentrações de cada quinona foram definidas previamente baseadas na CL<sub>50</sub> dos testes larvicidas com *A. aegypti* (**Tabela 3**). O controle negativo, com apenas a água do sistema (características físico-químicas previamente descritas), e, o controle solvente, com DMSO a 1 % (MAES *et al.*, 2012), também tinham 60 indivíduos. Ademais, cada placa tinha um controle interno, com água do sistema, com 10 indivíduos, totalizando 20 organismos por réplica (**Figura 8**).



**Figura 8.** Desenho experimental das réplicas do FET. Placas de 96 poços com 200 $\mu$ L em cada (n = 20 por réplica). Todos os experimentos foram realizados em triplicata experimental, com 96 h de exposição. Azul claro: controle interno, com água do sistema; azul escuro: controle negativo, com água do sistema; degrade de cinza: concentrações testadas das quinonas; verde: controle solvente (DMSO 1%).

Os testes realizados eram agudos, com duração de 96 h, sendo as placas condicionadas em uma câmara climática a 27°C e com fotoperíodo de 12:12 (claro:escuro). Por fim, em 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf e 96 hpf os embriões eram avaliados, com o estereomicroscópio (Stemi2000-C, Zeiss, Germany), em lente com 70x de aumento para os embriões e 40x para as larvas, diversos parâmetros de desenvolvimento embrionário foram avaliados, além da mortalidade.

#### 5.4 Testes de toxicidade em organismos adultos

Com base nos resultados obtidos no FET das sete quinonas, os resultados da CL<sub>50</sub> e a literatura (CHENG *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2020), a molécula ArboS31 foi selecionada para a realização do teste agudo em adultos do zebrafish que inclui análise da genotoxicidade (ensaio cometa e micronúcleo) e bioquímica.

O ensaio de toxicidade aguda foi baseado no protocolo da OECD n° 203 – *Fish, Acute Toxicity Testing* (2019), com a intenção de detectar a CL<sub>50</sub> da ArboS31 em organismos adultos, e, posteriormente usar os peixes para testes bioquímicos e genotóxicos.

Durante todo o experimento, utilizou-se a água deionizada reconstituída, com a aeração mantida constante e pH de 7,4; temperatura 26°C; 0 ppm de amônia; e 11 ppm de oxigênio. Os peixes utilizados tinham entre 6 a 12 meses e pesavam em média 0,701 ± 0,253 g.

Antes do ensaio definitivo, os peixes foram aclimatados em um aquário de vidro (80L) com água reconstituída, na relação de massa do organismo/volume de água 1 g/L. Tstes preliminares foram realizados para estimar a concentração de mortalidade, contudo, não se notou mortalidade com 100 mg/L, concentração máxima (OECD, 2019). Assim, com base nesses resultados as concentrações foram determinadas.

O teste foi realizado em duplicata (100 peixes) e dividido em duas etapas: (I) exposição, e, (II) pós-exposição, ambas tiveram duração de 96 h. As concentrações testadas da quinona, na exposição, foram: 6,25 mg/L; 12,5 mg/L; 25 mg/L; 50 mg/L; e 100 mg/L. Além dessas concentrações, havia o controle negativo, com água reconstituída, e, o controle solvente com DMSO a 0,005% (**Figura 9**). Já a pós-exposição, foram selecionados, aleatoriamente, peixes das duas réplicas das concentrações: controle negativo; controle solvente; 6,25 mg/L; 25 mg/L; e 100 mg/L, que foram colocados em novos aquários apenas com água reconstituída (**Figura 10**).



**Figura 9.** Foto dos aquários com zebrafish (*Danio rerio*) durante a exposição à quinona ArboS31, em duplicata, por 96 h. Controle negativo, com água reconstituída; controle solvente com DMSO (0,005%); 6,25 mg/L; 12,5 mg/L; 25 mg/L; 50 mg/L; e 100 mg/L.



**Figura 10.** Foto dos aquários com zebrafish (*Danio rerio*) durante a pós-exposição em duplicata. Todos os peixes foram colocados em novos aquários com água reconstituída, sem a molécula ArboS31, por 96 h. As identificações das concentrações de exposição foram mantidas.

Após 96 h (período de exposição), foram selecionados peixes aleatórios de cada réplica por concentração, os quais foram eutanasiados ( $n=60$ ), e, medidos e pesados (média  $2,288 \pm 0,099$  mm e  $0,480 \pm 0,174$  g, respectivamente). O sangue foi coletado para a realização dos testes de genotoxicidade. E as demais partes, como cabeça, cauda, brânquias e tronco foram coletados e armazenados em PBS (0,1 M e pH 7,4) a  $-80^{\circ}\text{C}$ ,

para avaliação de marcadores bioquímicos. Ademais, foram avaliados os parâmetros da água (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Tabela com a média dos parâmetros da água das réplicas durante a exposição de 96 h a ArboS31.

Parâmetros	Tratamentos		
	C0 (H <sub>2</sub> O)	Cso (DMSO)	C5 (100 mg/L)
<b>pH</b>	7,6	7,65	7,57
<b>Oxigênio (ppm)</b>	8	8	8
<b>Amônia (ppm)</b>	2	2	3,5
<b>Temperatura (°C)</b>	25	25	25

Ao finalizar a pós-exposição (96 h), os peixes foram eutanasiados (n = 40), e, medidos e pesados (média  $2,09 \pm 0,176$  mm e  $0,620 \pm 0,179$  g, respectivamente). A coleta de sangue foi realizada para os testes de genotoxicidade. E as demais partes, como cabeça, cauda, brânquias e tronco foram coletados e armazenados em PBS (0,1 M e pH 7,4) a -80°C, para avaliação de marcadores bioquímicos, como na exposição. Por fim, os parâmetros da água foram verificados (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Tabela com a média dos parâmetros da água das réplicas durante a pós-exposição de 96 h a ArboS31.

Parâmetros	Tratamentos		
	C0 (H <sub>2</sub> O)	Cso (DMSO)	C5 (100 mg/L)
<b>pH</b>	7,7	7,65	7,72
<b>Oxigênio (ppm)</b>	10	10	10
<b>Amônia (ppm)</b>	0,75	1,5	1,5
<b>Temperatura (°C)</b>	25	25	25

#### 5.4.1 Teste com biomarcadores bioquímicos

As amostras da exposição e da pós-exposição (7 a 9 organismos por tratamento) foram descongeladas em gelo, picotadas com tesoura, e posteriormente, com o auxílio de um disruptor de células – Unique group (modelo: DES500) as amostras foram homogeneizadas (2x por 20 segundos, a frequência de 90) e centrifugadas (4° C, 20 min

a 10.000 rpm). Então, o sobrenadante foi isolado e colocado em um novo eppendorf e congelado novamente, em temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para a realização da quantificação da proteína e os testes enzimáticos por espectrofotometria.

#### 5.4.1.1 Determinação de proteínas totais

As proteínas totais foram usadas como fator de correção das análises de biomarcadores, sendo necessárias para controle de normalização. Dessa forma, utilizou-se a metodologia de Bradford (1976), adaptado à microplaca, sendo a quantificação realizada em quadruplicada, com leitura de 595nm e utilizando a  $\gamma$ -globulina como padrão.

#### 5.4.1.2 Atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi avaliada com o substrato acetilcolina. O aumento da absorbância, resultante do produto da conjugação entre tiocolina (um produto da degradação da acetilcolina) e ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) em PBS foi medido no comprimento de onda de 405nm em intervalos de 40s durante 5 min (ELLMAN *et al.*, 1961, adaptado à microplaca por GUILHERMINO *et al.*, 1996). As determinações da atividade enzimática foram realizadas utilizando 40  $\mu\text{l}$  da amostra e 250  $\mu\text{l}$  da solução de reação - acetilcolina (0,075M) e DTNB (10 mM) - em PBS (0,1 M, pH 7,2), em quadruplicado.

#### 5.4.1.3 Atividade da lactato desidrogenase (LDH)

A atividade da LDH foi determinada seguindo a metodologia descrita por Vassault (1983) com adaptações introduzidas por Diamantino *et al.* (2001). O aumento da absorbância, resultante da oxidação do NADH foi monitorado com 340 nm em intervalos de 20 s por 5 min. As determinações da atividade foram realizadas utilizando 40  $\mu\text{l}$  da amostra, 250  $\mu\text{l}$  de Tris/NaCl/NADH e 40  $\mu\text{l}$  de Tris/NaCl/piruvato, em quadruplicado.

#### 5.4.1.4 Atividade da glutathione-S-transferase (GST)

A Atividade de GST foi medida de acordo com metodologia de Habig e Jakoby (1981), adaptada à microplaca por Frasco e Guilhermino (2002). A enzima GST auxilia na conjugação do substrato CDNB com a glutationa (GSH) formando um tioéter, que é monitorado durante o teste. Dessa forma, o aumento desse composto foi medido a 340 nm por 5 min em intervalos de 20s. As determinações da atividade foram realizadas utilizando 100 µl da amostra e 200µl da solução de reação (PBS 0,1M pH 7,2 + solução GST + solução CDNB), em quadruplicado.

#### 5.4.2 Testes de genotoxicidade

Após a eutanásia dos peixes, tanto da exposição quanto da pós-exposição, o sangue coletado foi armazenado em eppendorf com 500 µL de soro fetal bovino (SFB), dos quais, 40 µL da mistura (SBF-sangue) foram destinados para o ensaio cometa (SINGH *et al.*, 1988) e 50 µL foram utilizados para realizar os esfregaços das lâminas de MN e ANs (CARRASCO *et al.*, 1990; FENECH, 2000).

##### 5.4.2.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa ou eletroforese em gel de célula única (single cell gel electrophoresis assay – SCGE) foi baseado na metodologia proposta por Singh et al. (1988), com algumas modificações. 40 µL da solução SBF-sangue foram adicionados a 120 µL de agarose “low melting point agarose” (LMP 7%), que estava mantida em banho-maria a 37 °C. Após, essa mistura foi colocada em lâminas (2 por indivíduo), que foram previamente cobertas com agarose normal (1,5%). Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução lise (Triton X de Merck, DMSO de Macron™, e lise estoque, pH 10), por duas horas. A solução de eletroforese (EDTA 0,2M de Vetec, NaOH 10M de Vetec, pH 13) foi colocada até a cobertura total de todas as lâminas e deixada em temperatura de 4°C por 20 minutos, com a fonte de eletroforese regulada para 0,7 - 1 Volts/ cm. Posteriormente, as lâminas foram imersas na solução tampão de neutralização (Tris de Vetec-Sigma, pH 7,5) por 5 minutos, alternando por 3 vezes com 5 minutos de descanso fora da solução. Por fim, as lâminas foram deixadas secando à temperatura ambiente, para que fossem fixadas com etanol PA, e, armazenadas na geladeira (4°C) até a análise.

A lâmina do controle positivo foi feita com material dos organismos do controle negativo (0 mg/L), mergulhada em água oxigenada 0,01% diluída em PBS gelado, por 1 minuto, e, posteriormente lavada com PBS gelado.

Para a análise, um teste cego foi executado, sendo escritos códigos nas lâminas de modo que não houvesse subjetividade durante o processo. E as lâminas, no dia da análise, foram coradas com brometo de etídio (20 µg/mL) e observadas no microscópio de fluorescência (ZEISS Axioskop 2-HAL 100; UnB – Brasília, Brasil). Foram fotografadas, em média, 60 nucleóides, por lâmina do indivíduo que foram analisadas no programa CometScore versão 2.0.0.38, e, o parâmetro avaliado foi a fragmentação do DNA na cauda (%).

#### 5.4.2.2 Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares

O teste de frequência de MNs e outras ANs foi realizado com base no protocolo proposto por Carrasco *et al.* (1990) e Fenech *et al.* (2003), com adaptações. 50 µL da solução SBF-sangue foram utilizados para a realização dos esfregaços das duas lâminas (por indivíduo), as quais secaram em temperatura ambiente. Posteriormente, foram fixadas com metanol absoluto (10 minutos), coradas com Giemsa (5% v/v) e analisadas no microscópio de luz (ZEISS Axioskop 2-HAL 100) em lente objetiva de 100x. Para a análise, foi realizado o teste cego, e, contadas 3.000 células por indivíduos, as quais foram avaliadas MNs e ANs de acordo com Carrasco *et al.* (1990) e Fenech (2000).

### 5.5 Análises estatísticas

Para a realização da estatística dos testes foi utilizado o pacote de estatística SigmaPlot versão 12.5. A ANOVA One Way foi usada para detectar as diferenças entre os grupos para os conjuntos de dados normalmente distribuídos. Aos dados que não passaram no teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste de homogeneidade de variância de Brown-Forsythe, foi usado o teste de Kruskal-Wallis. O teste de Dunnett ou Dunn (para testes paramétricos ou não paramétricos, respectivamente) foram utilizados para detectar diferenças significativas entre as concentrações testadas e o controle ( $p < 0,05$ ). As concentrações letais (CL50) foram calculadas utilizando função logística,

Weibull ou sigmóide. Todas as análises estatísticas tiveram como base o nível de significância de 0,05.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Fish Embryo Toxicity test (FET)

Foram identificadas sete quinonas com potencial larvicida para *A. aegypti*, sendo necessário a realização de testes em organismo não-alvos para verificar a toxicidade dessas moléculas. Dessa forma, o *Fish Embryo Toxicity* (FET test) (OECD n° 236, 2013) em zebrafish (*D. rerio*) foi selecionado como teste primário. Ademais, os resultados obtidos serviram para rastrear quais moléculas teriam mais potencial ecoamigável para futuros testes em organismos não-alvos.

Antes da realização dos testes definitivos em triplicata, todas as quinonas passaram por testes pilotos para saber um pouco mais sobre seus comportamentos e efeitos. A única molécula a qual não foram realizados os testes definitivos foi a ArboS97, uma vez que no teste piloto foi identificada uma toxicidade muito elevada e volatilidade, descartando-a automaticamente para testes definitivos.

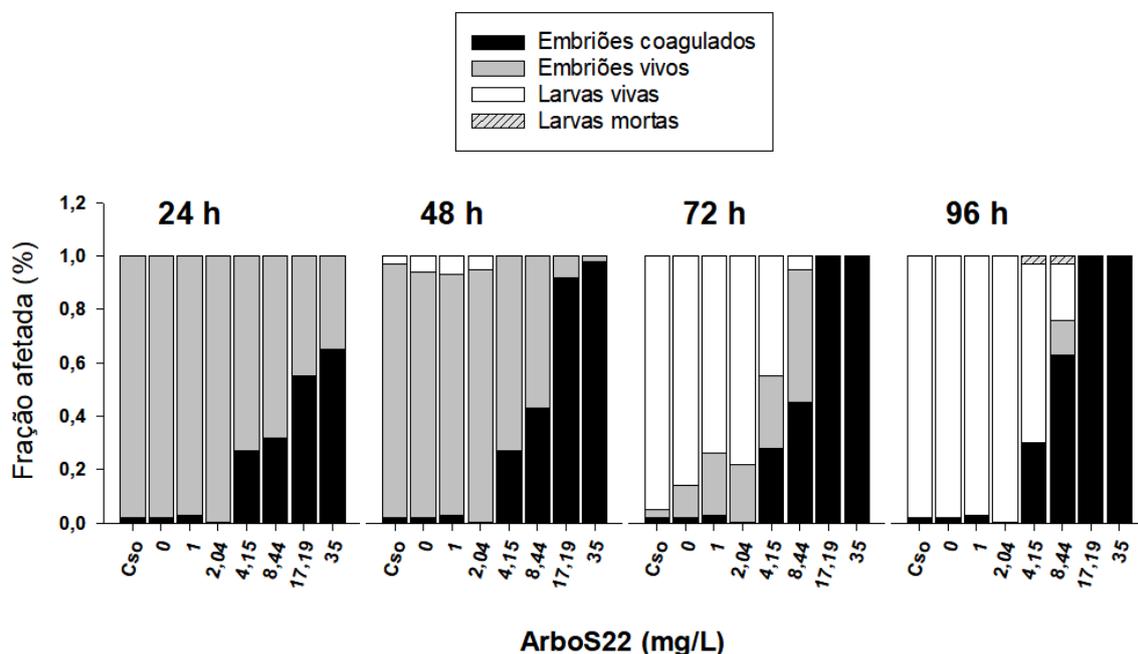
No teste piloto da ArboS97 foram testadas as seguintes concentrações: 0,01; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 mg/L, e, mais os controles, DMSO 1% (controle solvente - Cso); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo). Nas primeiras 24 h de exposição, todos os organismos das concentrações testadas estavam mortos. Ademais, o controle solvente que estava próximo aos poços da C6 (2 mg/L), 70% morreram e o restante estava com alterações. Outra observação feita, foi quanto ao controle interno da placa, no qual estava disposto de forma vertical às concentrações, sendo possível observar alterações e mortalidades proporcionalmente ao aumento das concentrações.

Portanto, com base nos fatos citados, supõe-se que a ArboS97 seja uma molécula volátil com alta toxicidade, além de possuir uma  $CL_{50}$  (48h) (3,8 mg/L) para larvicida, em comparação a outras candidatas, muito elevada. Então, por essas razões ela foi descartada para testes futuros.

#### 6.1.1 ArboS22

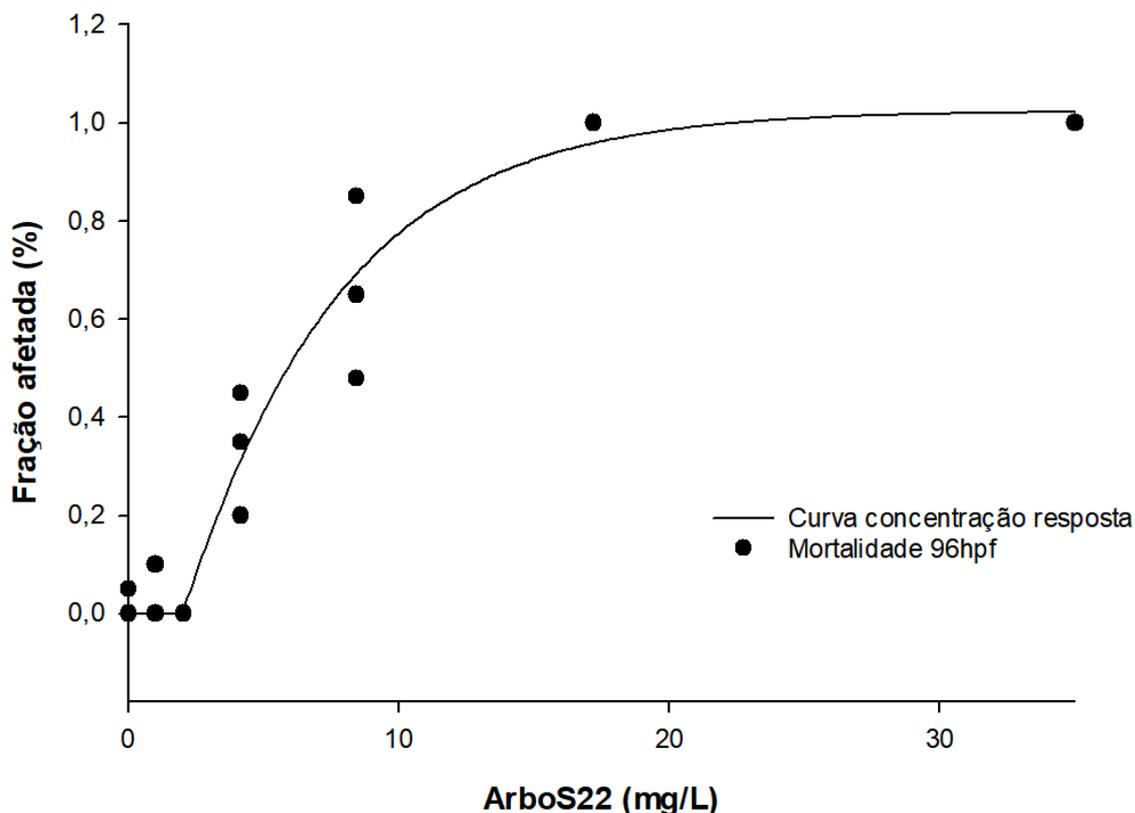
Segundo Silva *et al.* (2020), a ArboS22 é uma quinona que possui efeitos residuais mais longos contra o *A. aegypti*, sendo um destaque entre as outras moléculas. Ademais, os resultados do FET, comparados a  $CL_{50}$  como larvicida, também foram promissores, mostrando que seria interessante a realização de novos experimentos em organismos não-alvos.

O FET foi realizado nas seguintes concentrações: DMSO 1% (Cso); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 1 (C1); 2,04 (C2); 4,15 (C3); 8,44 (C4); 17,19 (C5); e 35 mg/L (C6) e o tempo total de exposição foi de 96 h, possível observar o panorama geral na **Figura 11**.



**Figura 11.** Panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish (*D. rerio*) durante 96 h de exposição a ArboS22, utilizando as seguintes concentrações: Cso (controle solvente – DMSO 1%); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 1; 2,04; 4,15; 8,44; 17,19; e 35 mg/L.

Nas primeiras 24 h já foi possível observar uma elevada taxa de mortalidade desde a C3 (4,15 mg/L) com cerca de 27% dos organismos mortos, chegando à 55% e 65% na C5 (17,19 mg/L) e C6 (35 mg/L), respectivamente. Nos dias posteriores, a taxa de mortalidade aumentou proporcionalmente as concentrações, atingindo 100% em 72 h, na C5 (17,19 mg/L) e C6 (35 mg/L). Em 96 h, apenas a C3 (4,15 mg/L) e C4 (8,44 mg/L) houveram um acréscimo nessas taxas, sendo exclusivamente a C4 acima de 50%. Dessa forma, foi possível a identificação da  $CL_{50}$  (**Figura 12**) para a ArboS22 ( $CL_{50(96h)} = 6,01$  mg/L - Weibul 4 parâmetros –  $R^2: 0,97$  –  $p < 0,01$ ).

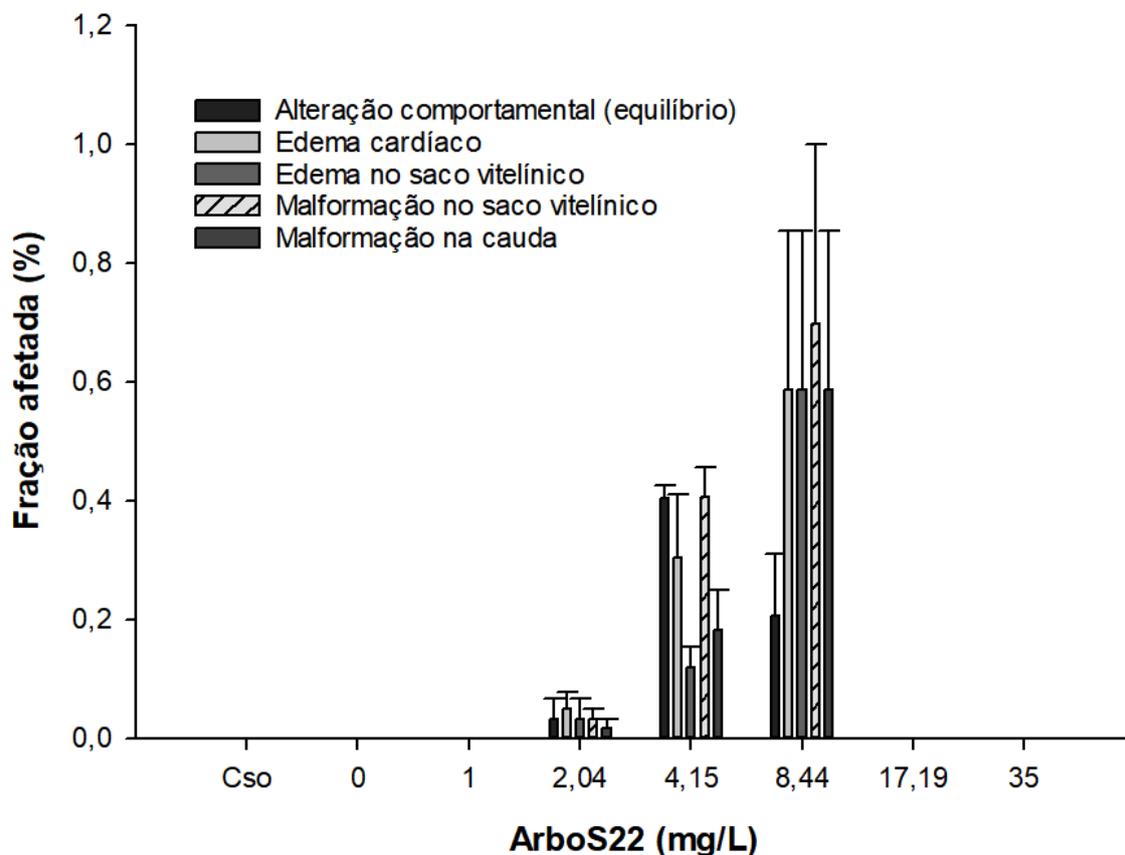


**Figura 12.** Curva de concentração resposta (mortalidade) dos organismos expostos por 96 h a ArboS22.  $CL_{50(96h)} = 6,01$  mg/L - Weibull 4 parâmetros –  $R^2: 0,97$  –  $p < 0,01$ .

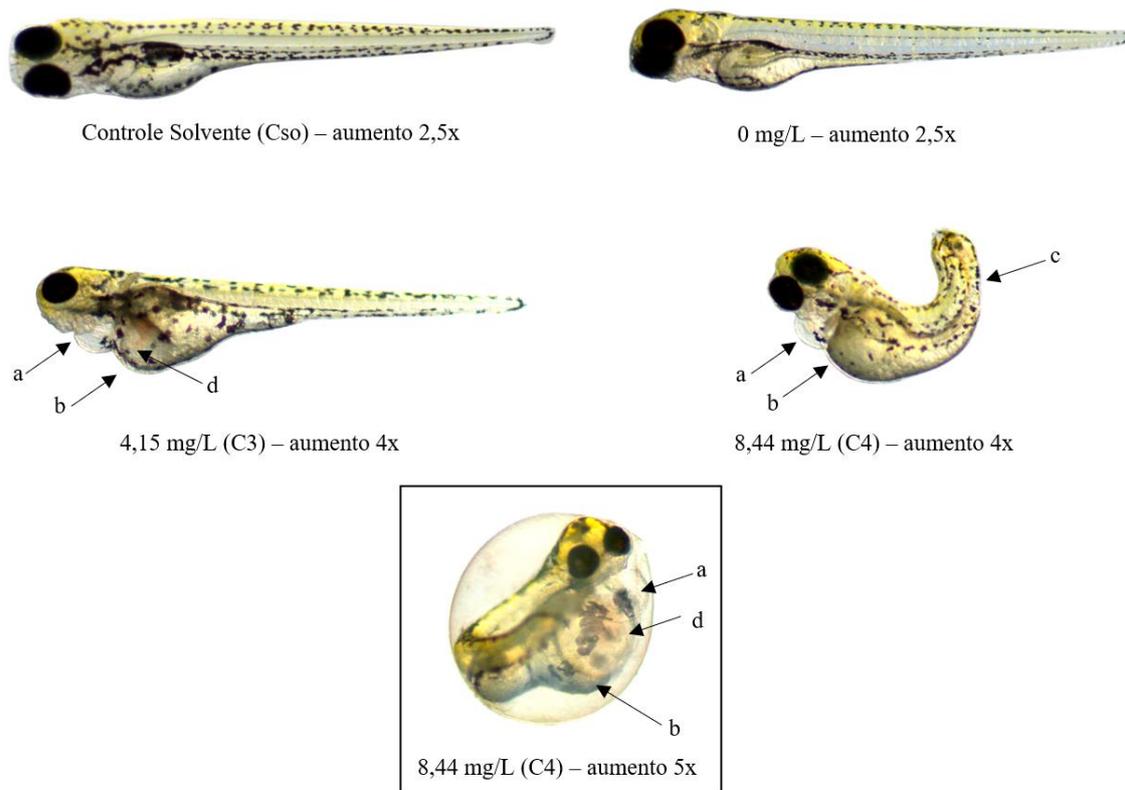
Em relação aos efeitos subletais causados pela ArboS22, em 24 h, a partir da C2 (2,04 mg/L), 12% dos embriões já apresentavam alterações no saco vitelínico, como edemas e malformações. Contudo, tais efeitos não mostraram persistência ao longo do tempo total de exposição, ou seja, em 96 h de exposição não haviam alterações significativas nas larvas de 2,04 mg/L, apenas nas concentrações seguintes. Principalmente, as duas concentrações mais elevadas, em 24 h, os embriões que ainda restavam estavam totalmente comprometidos, possuíam tantas alterações embrionárias, tais como malformação na cauda e no saco vitelínico, e, edema cardíaco e no saco vitelínico, que poderiam ser considerados inaptos à vida.

Com o decorrer do tempo de exposição houve um aumento progressivo nas alterações nos organismos, principalmente na C3 e na C4 (**Figura 13**), como: malformação na cauda, edema cardíaco, alteração comportamental (equilíbrio), e, apesar de não serem realizados testes morfométricos sugere-se uma diferença no tamanho das larvas na C4 (8,44 mg/L). Ademais, 8,44 mg/L foi a única concentração que em 96 h de

exposição houve um atraso de desenvolvimento, além dos efeitos subletais (**Figura 14**). Em relação as concentrações de 17,19 mg/L e de 35 mg/L devido a mortalidade total dos embriões não foram observadas alterações embriológicas, além das que já foram citadas anteriormente.



**Figura 13.** Frequência (%) das alterações embrionárias no zebrafish (*D. rerio*) exposto a ArboS22, em 96 h (valores médios  $\pm$  erro padrão).



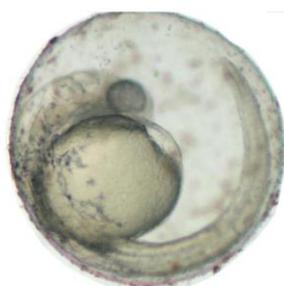
**Figura 14.** Embriões e larvas do zebrafish após exposição a ArboS22 por 96 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 4,15 mg/L (C3); e 8,44 mg/L (C4). a: edema cardíaco; b: malformação no saco vitelínico; c: malformação da cauda; d: edema no saco vitelínico.

Apesar dos efeitos subletais já aparecerem de forma significativa em 4,15 mg/L, ainda se sugere novos testes em organismos não-alvos para a ArboS22. Além de ser uma molécula com resultados promissores como larvicida, a  $CL_{50(96h)}$  (6,01 mg/L) no FET e as concentrações que geram alterações embrionárias são superiores à encontrada nos testes com *A. Aegypti* ( $CL_{50(72h)} = 1,3$  mg/L) (SILVA *et al.*, 2020), favorecendo futuros estudos.

### 6.1.2 ArboS18

Em relação ao comportamento da ArboS18, inicialmente havia dissolvido completamente no DMSO, contudo ao ter contato com a água ela ficou em forma de flóculos, sendo necessária uma agitação para que ficasse homogênea. Ademais, durante o teste, nas primeiras 24 h de exposição a ArboS18 atravessou o cório, sendo possível

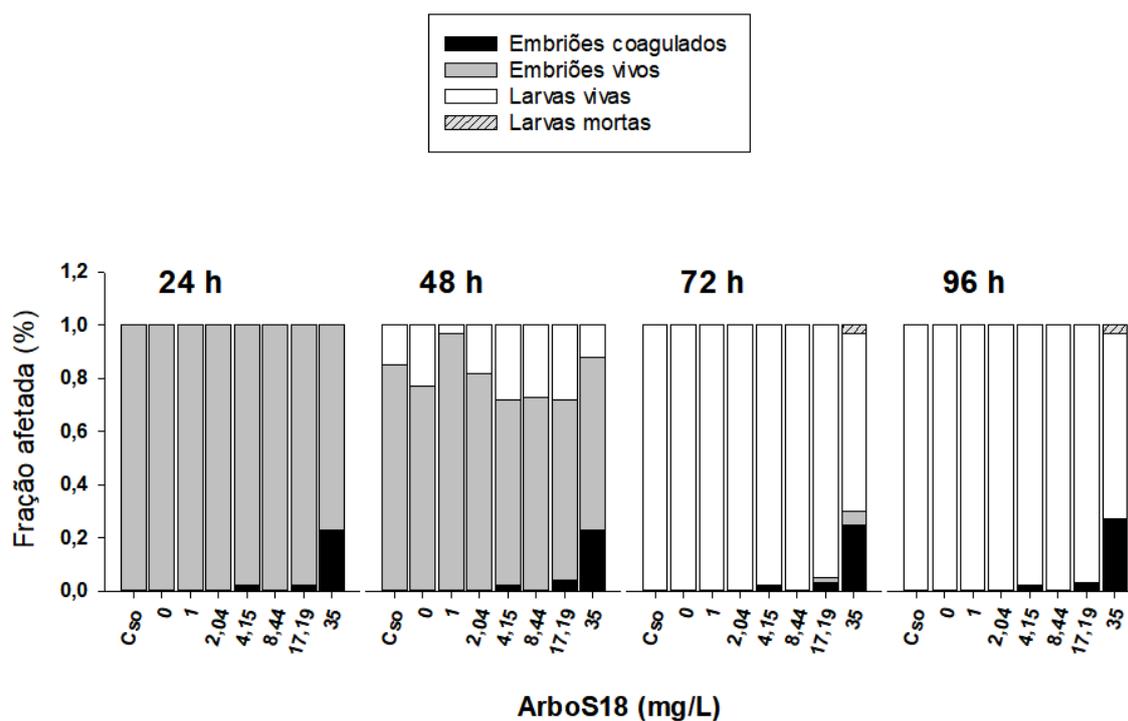
identifica-la internamente (**Figura 15**), contudo, não há evidências que tenha aumentado o seu potencial tóxico.



35 mg/L (C6) – aumento 5x

**Figura 15.** Evidência que a molécula ArboS18 atravessou o cório do embrião após 24 h de exposição.

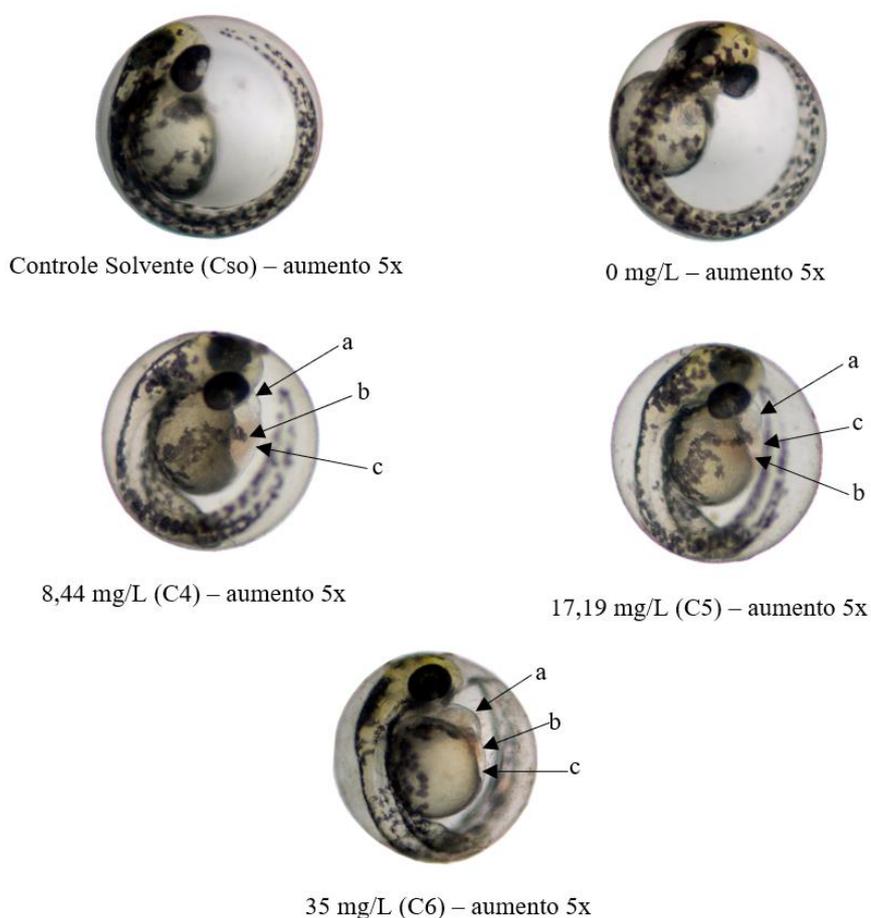
O teste embriotóxico da ArboS18 foi realizado durante 96 h, com as seguintes concentrações: DMSO 1% (C<sub>so</sub>); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 1 (C1); 2,04 (C2); 4,15 (C3); 8,44 (C4); 17,19 (C5); e 35 mg/L (C6), demonstrado na **Figura 16**.



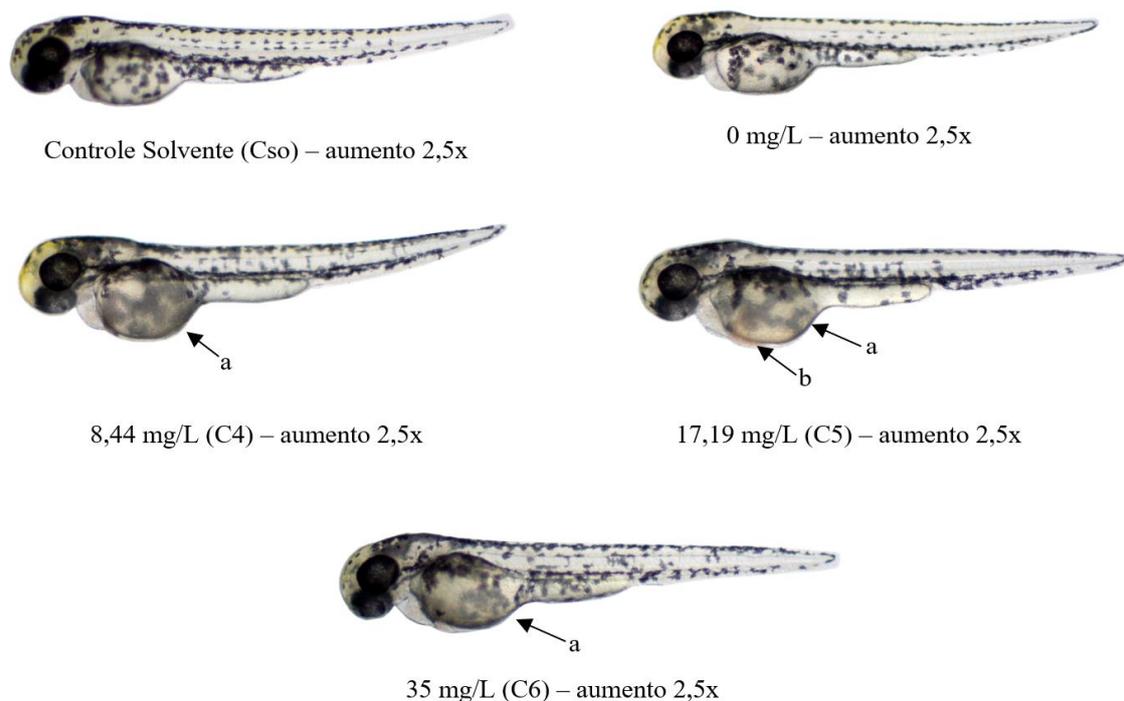
**Figura 16.** Panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish (*D. rerio*) durante 96 h de exposição a ArboS18, utilizando as seguintes concentrações: Cso (controle solvente – DMSO 1%); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 1; 2,04; 4,15; 8,44; 17,19; e 35 mg/L.

Apesar de ter havido mortalidade nas primeiras 24 h de exposição, apenas ocorreu em 35 mg/L, que estava acima de 10%, com 23% embriões coagulados. E de modo geral, os efeitos subletais só surgiram de forma significativa a partir de 48 h de exposição.

Em 48 h, houve um aumento na mortalidade apenas na C5 (17,19 mg/L), que não ultrapassou 10% dos organismos expostos. Contudo, a ocorrência de alterações iniciou-se a partir de 8,44 mg/L (C4), que progrediram e persistiram durante todo o teste – edema cardíaco, malformação do saco vitelínico, estase sanguínea e edema no saco vitelínico (**Figura 17 e 18**).



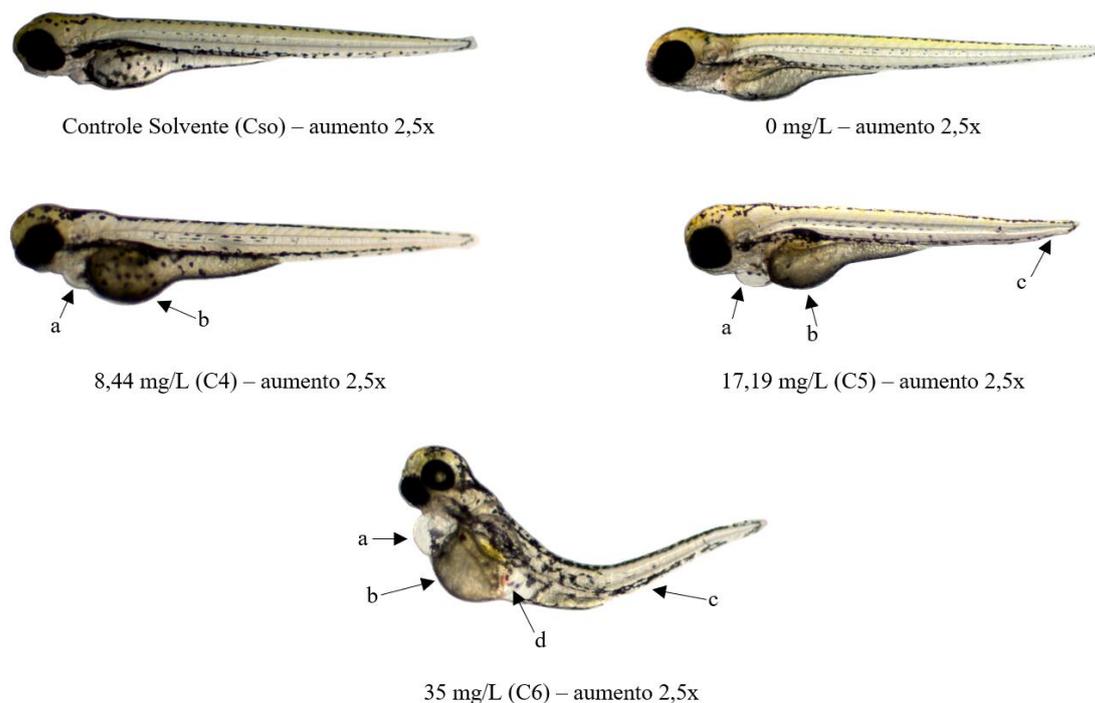
**Figura 17.** Embriões de zebrafish expostos a ArboS18 por 48 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 8,44 mg/L (C4); 17,19 mg/L (C5); e 35 mg/L (C6). a: edema cardíaco; b: estase sanguínea; c: edema no saco vitelínico.



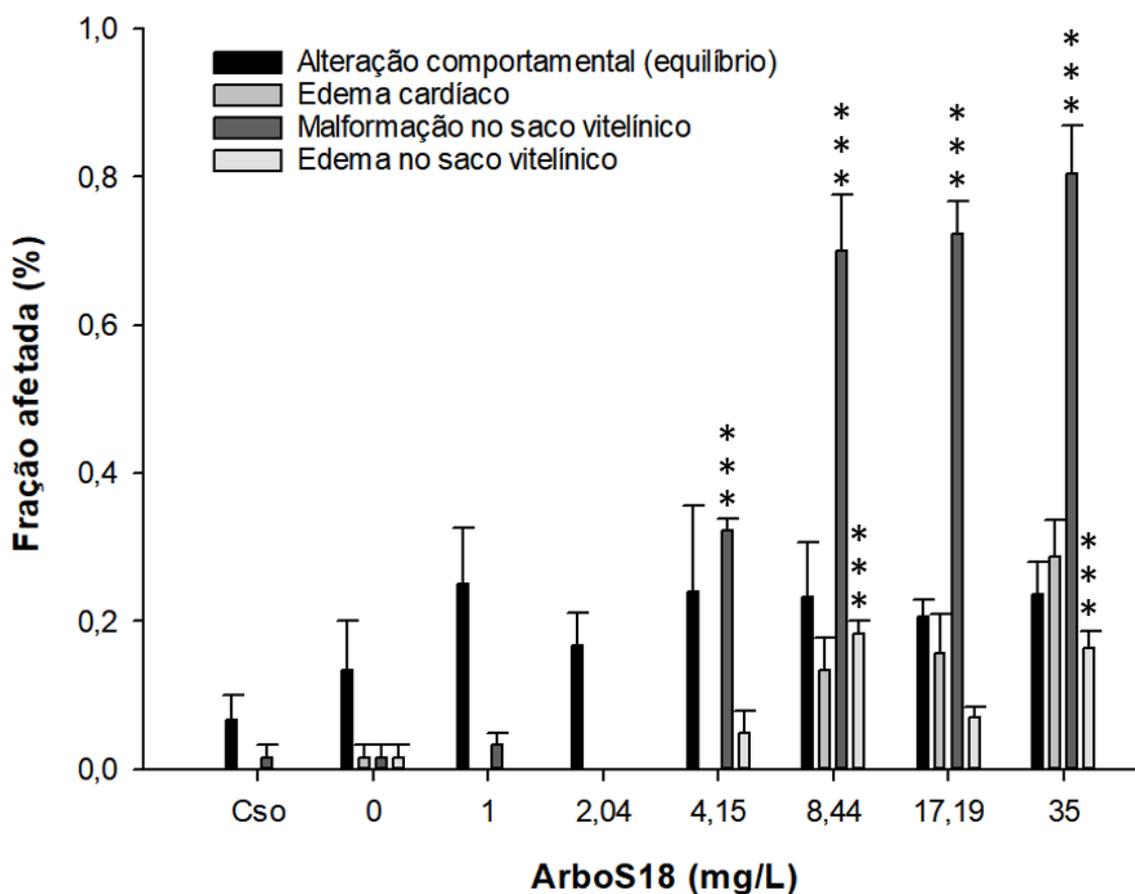
**Figura 18.** Larvas de zebrafish expostas a ArboS18 por 48 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 8,44 mg/L (C4); 17,19 mg/L (C5); e 35 mg/L (C6). a: malformação no saco vitelínico; b: estase sanguínea.

Nas próximas horas de exposição, 72 h e 96 h, a taxa de mortalidade alterou-se apenas na última concentração (35 mg/L), chegando em 30% em 96 h, impossibilitando a identificação da  $CL_{50}$  (96h) da ArboS18.

Em 96 h, houve um aumento nas alterações pré-existentes, e, o surgimento de malformação na cauda, majoritariamente, em 35 mg/L (**Figura 19**). E estatisticamente, em relação ao grupo controle (C0), houve um aumento significativo de edemas (8,44 mg/L e 35 mg/L) e malformações no saco vitelínico, nas últimas quatro concentrações (**Figura 20**). Ademais, em 96 h foi possível observar alterações comportamentais nos organismos, contudo, essa variante foi identificada também nos controles (controle negativo e controle solvente – Cso), sem diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ), sugerindo que esse desequilíbrio não esteja ligado à ArboS18 (**Figura 20**).



**Figura 19.** Larvas do zebrafish expostas a ArboS18 por 96 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 8,44 mg/L (C4); 17,19 mg/L (C5); e 35 mg/L (C6). a: edema cardíaco, b: malformação no saco vitelínico, c: edema no saco vitelínico, d: malformação na cauda.

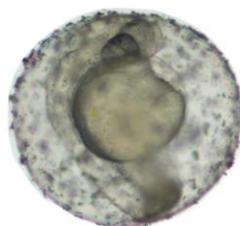


**Figura 20.** Frequência (%) das principais alterações embrionárias dos organismos expostos a ArboS18, em

96 h. Resultados expressam a média dos valores  $\pm$  erro padrão. Foi realizada a ANOVA One Way, método Dunnett's, mostrando a diferença significativa ( $p < 0,001^{***}$ ) em comparação ao controle negativo.

### 6.1.3 ArboS1

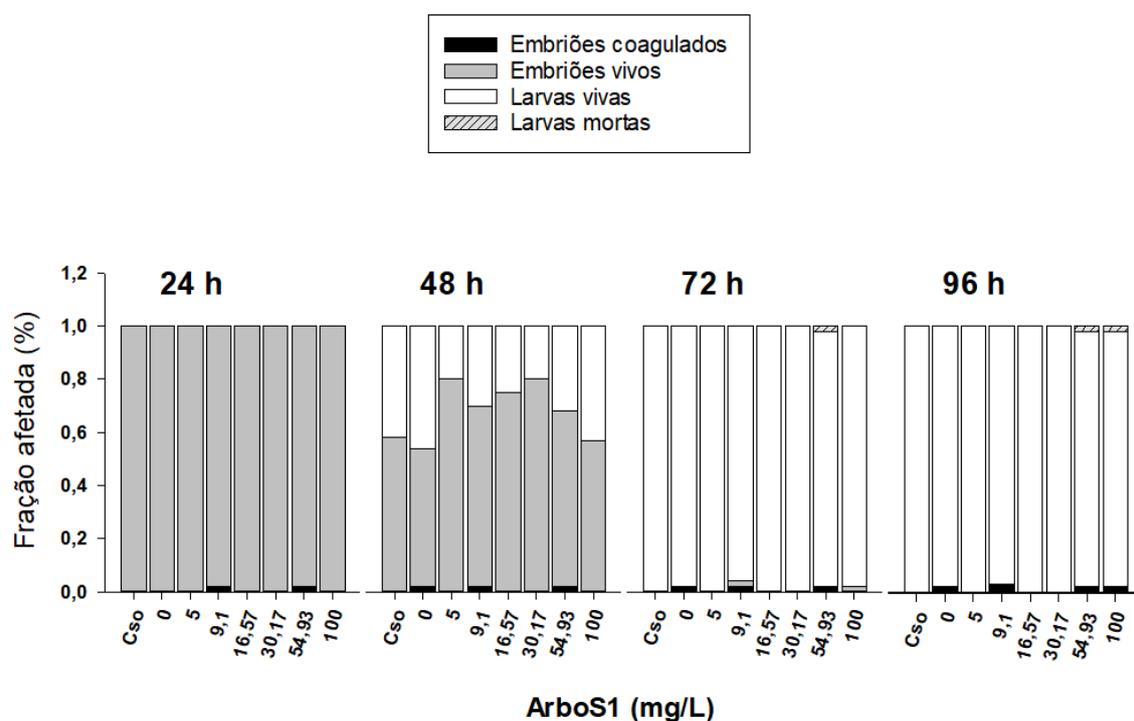
A quinona ArboS1 diferente da ArboS18 se aglutinou ao redor do cório dos embriões mesmo sendo uma solução homogênea (**Figura 21**), contudo não há evidências que esse comportamento tenha diminuído a toxicidade da quinona.



100 mg/L (C6) – aumento 5x

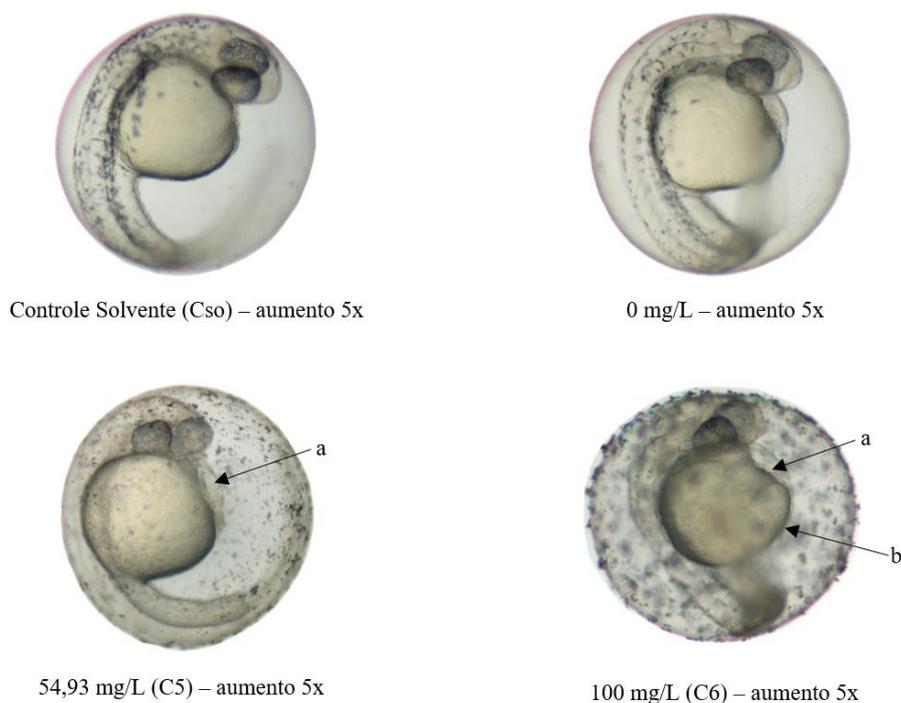
**Figura 21.** Evidência da adesão da quinona ArboS1 no cório do embrião do zebrafish após 24 h de exposição.

Na **Figura 22** é possível visualizar o comportamento tóxico da ArboS1, em embriões de *D. rerio* durante 96 h de exposição (FET), nas seguintes concentrações: DMSO 1% (Controle solvente - Cso); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 5 (C1); 9,10 (C2); 16,57 (C3); 30,17 (C4); 54,93 (C5); e 100 mg/L (C6).



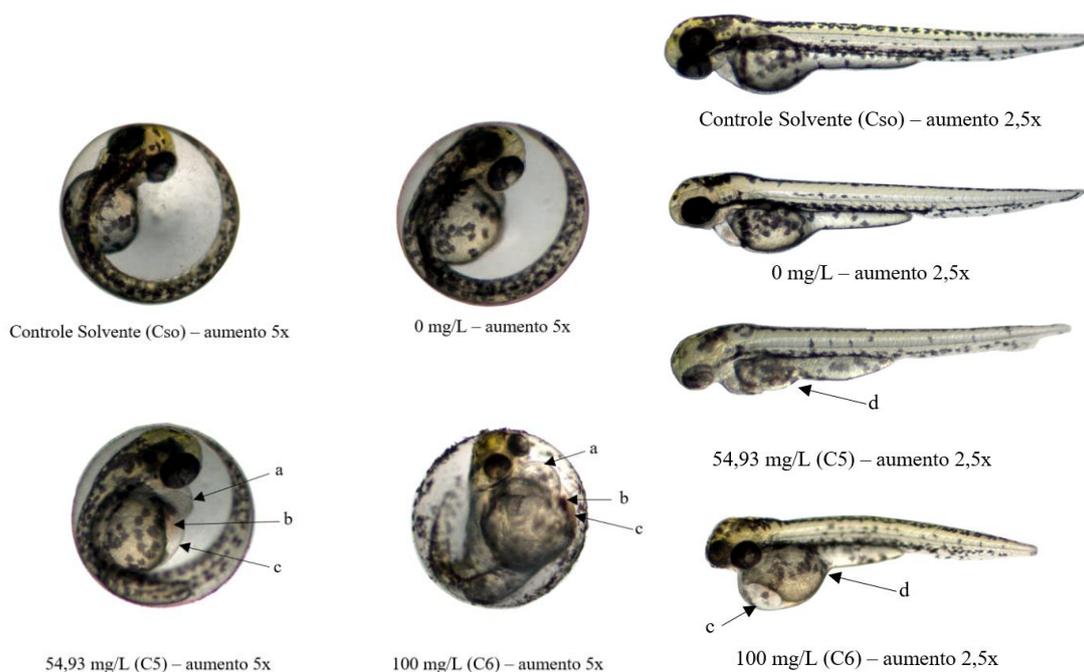
**Figura 22.** Gráfico do panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish (*D. rerio*) durante 96 h de exposição a ArboS1, utilizando as seguintes concentrações: Cso (controle solvente – DMSO 1%); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 5; 9,1; 16,57; 30,17; 54,93; 100 mg/L.

Durante a exposição de 96 h não foi possível identificar uma taxa de mortalidade significativa (acima de 10%) em nenhuma das concentrações testadas. E também não foi factível a determinação da  $CL_{50}$  da ArboS1, uma vez que a mesma encontrasse acima da concentração máxima determinada pelo protocolo da OECD nº 236 (*Guideline on Fish Embryo Toxicity Test – FET*), 100 mg/L. No entanto, desde as primeiras 24 h de exposição é possível observar efeitos subletais (**Figura 23**). Alterações como edema e malformações no saco vitelínico são verificadas de forma progressiva ao longo de toda a exposição a partir da C5 (54,93 mg/L).



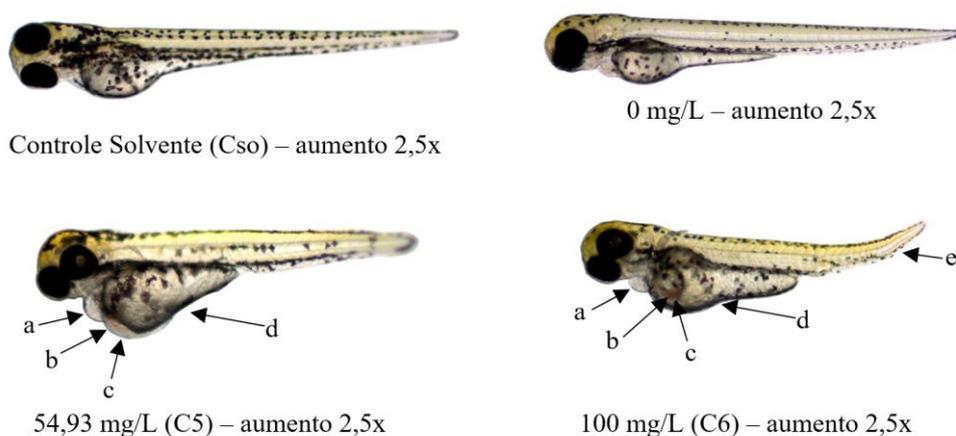
**Figura 23.** Embriões de zebrafish expostos a ArboS1 por 24 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 54,93 mg/L (C5); e 100 mg/L (C6). a: edema no saco vitelínico; b: malformação no saco vitelínico.

Estases sanguíneas só são registradas em 48 h e 72 h (**Figura 24**). Enquanto, em concentrações como 30,17 mg/L (C4) e abaixo, os efeitos subletais são quase nulos durante todo o tempo de exposição, sugerindo que a ArboS1 possui grande potencial como molécula ecoamigável.



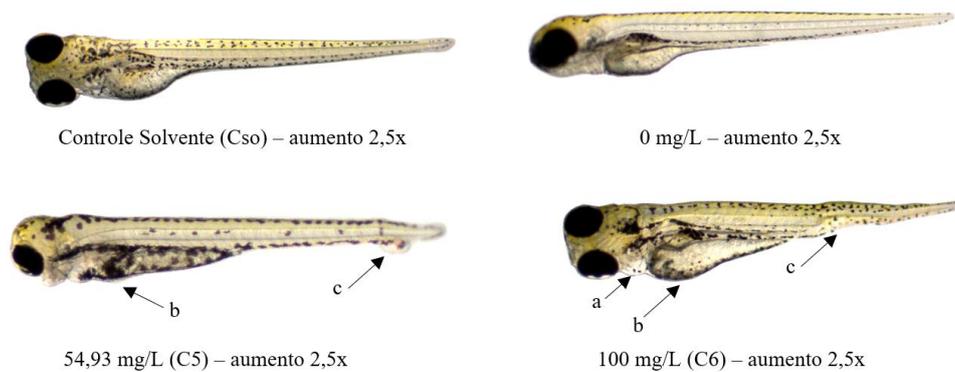
**Figura 24.** Embriões e larvas do zebrafish expostos a ArboS1 por 48 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 54,93 mg/L (C5); e 100 mg/L (C6). a: edema cardíaco; b: estase sanguínea; c: edema no saco vitelínico; d: malformação no saco vitelínico.

Em 72 h, os efeitos continuaram nas últimas duas concentrações. E apesar de não serem visualizados em um número significativo de organismos, houveram algumas larvas com malformação na cauda (**Figura 25**).

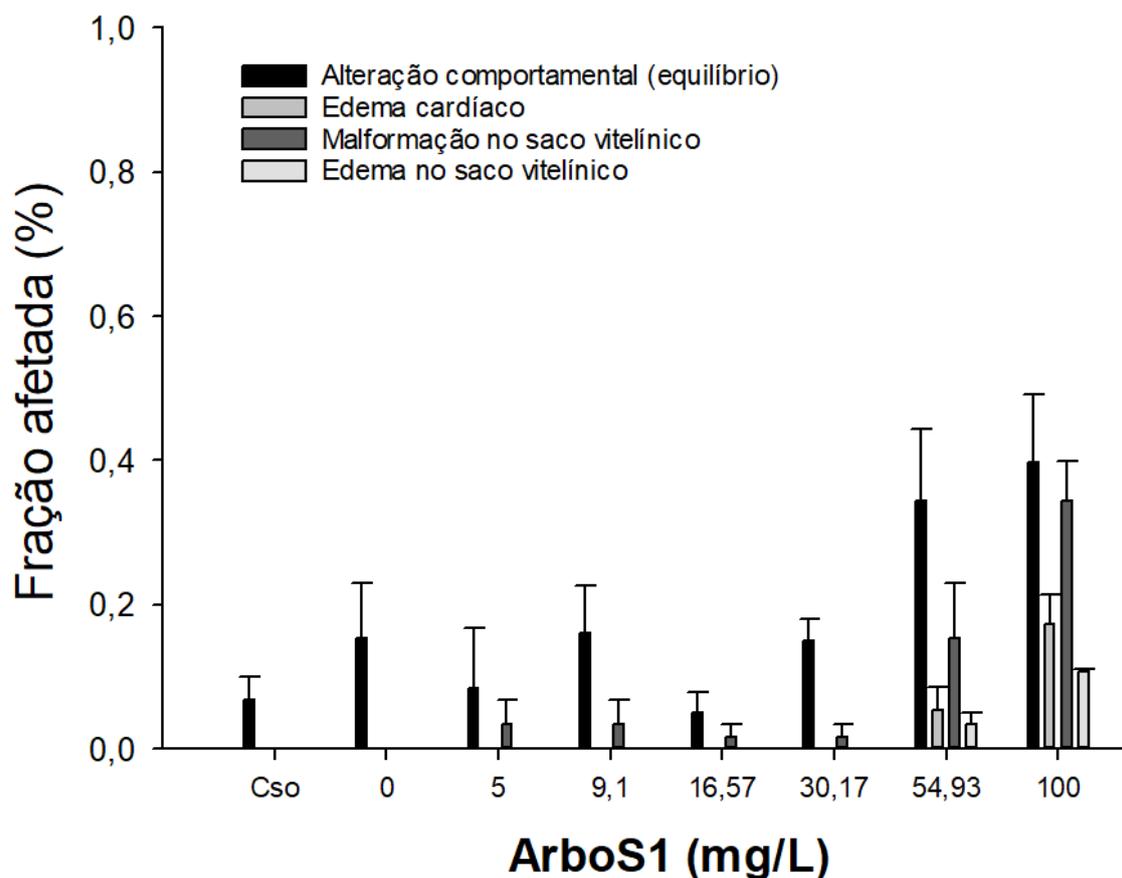


**Figura 25.** Larvas do zebrafish expostas a ArboS1 por 72 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 54,93 mg/L (C5); e 100 mg/L (C6). a: edema cardíaco; b: estase sanguínea; c: edema no saco vitelínico; d: malformação no saco vitelínico; e: malformação da cauda.

Em 96 h, as alterações apesar de persistirem, visualmente, pareciam menos agressivas que nos dias anteriores (**Figura 26**). Talvez, se o teste tivesse duração maior, efeitos subletais tais como edemas cardíacos e malformação no saco vitelínico, fossem revertidos, uma vez que ocorreu com as estases sanguíneas. Ademais, alterações comportamentais verificadas em 96 h, não foram estatisticamente significativas em relação ao controle negativo, sugerindo que essas deformações não tenham ligação com a ArboS1 (**Figura 27**).



**Figura 26.** Larvas do zebrafish expostas a ArboS1 por 96 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 54,93 mg/L (C5); e 100 mg/L (C6). a: edema cardíaco; b: malformação no saco vitelínico; c: malformação da cauda.



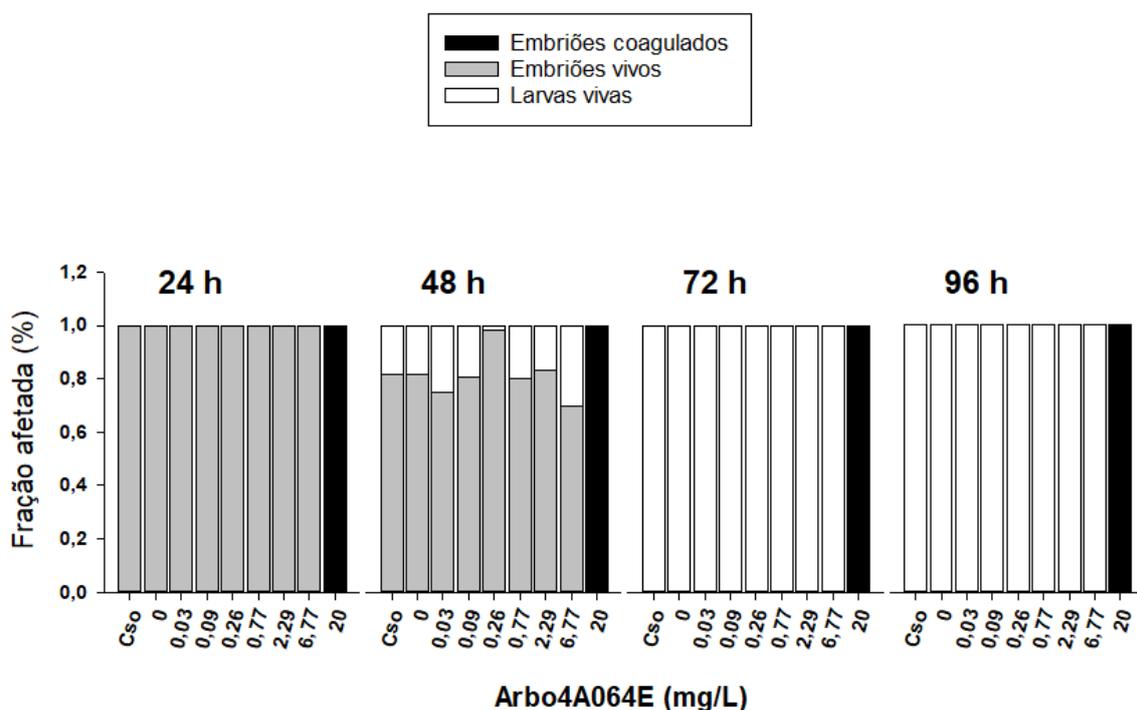
**Figura 27.** Frequência (%) das principais alterações embrionárias no zebrafish exposto a ArboS1, em 96 h (valores médios  $\pm$  erro padrão).

Por fim, apesar da quinona ArboS1 não ter tido a característica de mais potente, ou persistente, até mesmo a com a CL<sub>50</sub> com os melhores resultados (SILVA *et al.*, 2020), nos testes realizados com zebrafish, a molécula se destacou, provando ser pouco tóxica, não havendo efeitos subletais significativos em concentrações como 30,17 mg/L, e, possuindo uma CL<sub>50</sub> acima de 100 mg/L. Ademais, pode-se observar que talvez com testes mais duradouros, alterações como edemas e malformação no saco vitelínico possam ser recuperados nas duas concentrações mais altas (54,93 mg/L e 100 mg/L).

#### 6.1.4 Arbo4A064E

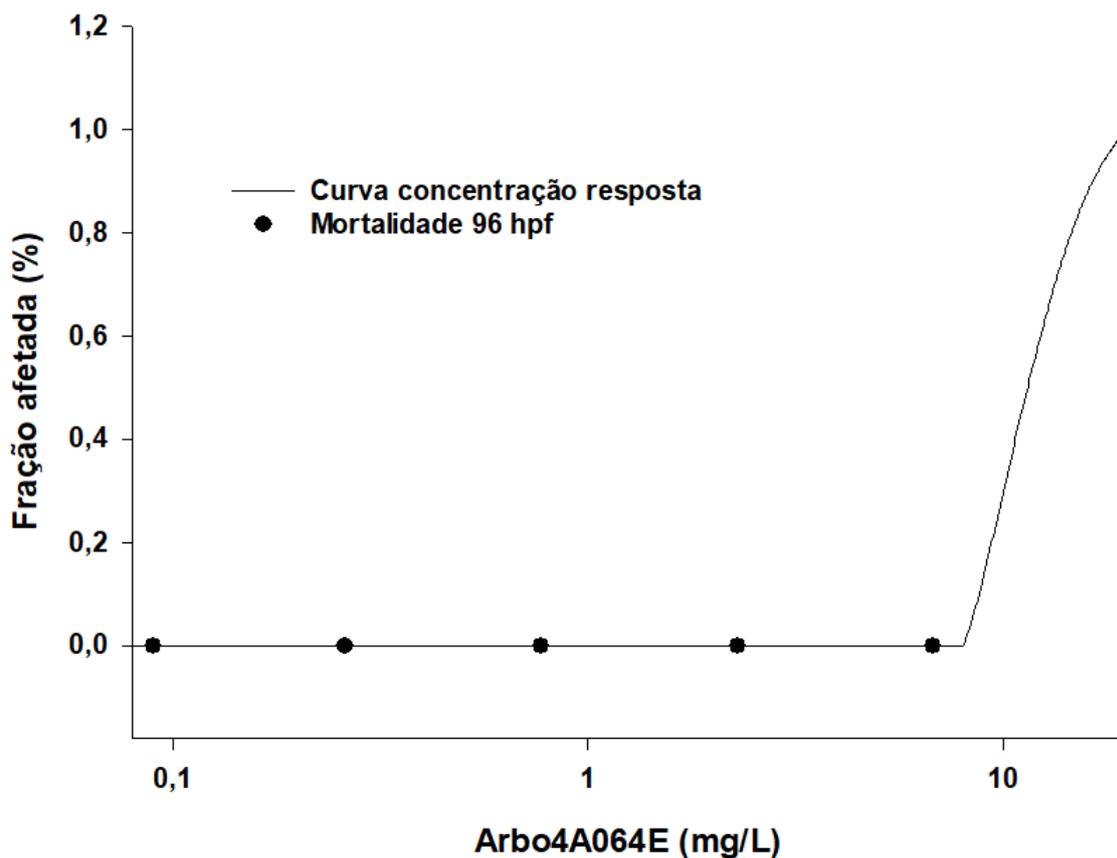
Foi observado que as diferentes concentrações da substância Arbo4A064E apresentaram-se homogêneas no momento de sua dissolução e permaneceram dessa forma até o término do teste. A **Figura 28** mostra a visão geral do teste de embriotoxicidade. As concentrações testadas foram: DMSO 1%; 0 (controle negativo –

água do sistema de cultivo); 0,03; 0,09; 0,26; 0,77; 2,29 e 20 mg/L e o tempo total de exposição foi de 96 h.



**Figura 28.** Gráfico do panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish (*D. rerio*) durante 96 h de exposição a Arbo4A064E utilizando as seguintes concentrações: Cso (controle solvente – DMSO 1%); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 0,03; 0,09; 0,26; 0,77; 2,29; 6,77; e 20 mg/L.

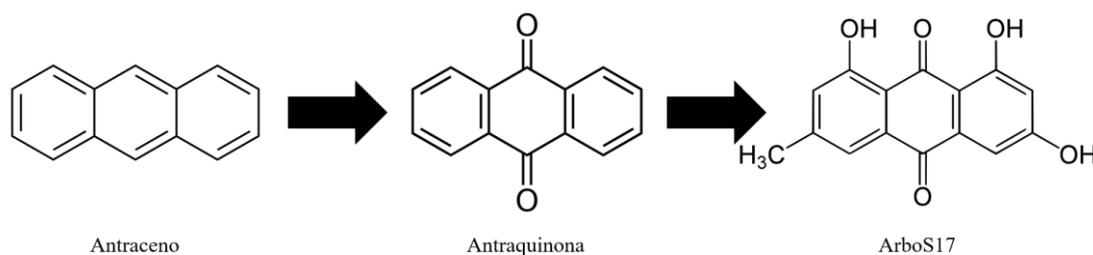
Dentre os FETs realizados com as quinonas, a Arbo4A064E foi a única molécula que nas concentrações testadas não foi verificado nenhum efeito subletal. Contudo, nas primeiras 24 h de exposição foi possível identificar a morte de 100% dos organismos na concentração mais alta. Ademais, não houve quaisquer alterações na taxa de mortalidade ao longo da exposição total, e, nem atrasos de desenvolvimento. Por fim, a  $CL_{50(96h)}$  foi definida em 11,68 mg/L - Weibull 4 parâmetros ( $R^2 = 1$ )  $p < 0,01$  (**Figura 29**). Apesar de não possuir efeito subletal algum a Arbo4A064E não é uma quinona que seria recomendado investir em novos testes, já que com base nos testes de larvicida ( $CL_{50(48h)} = 15,6$  mg/L) (SILVA *et al.*, 2020), provavelmente, ela possui mais toxicidade para organismos não-alvos que para o *A. aegypti*.



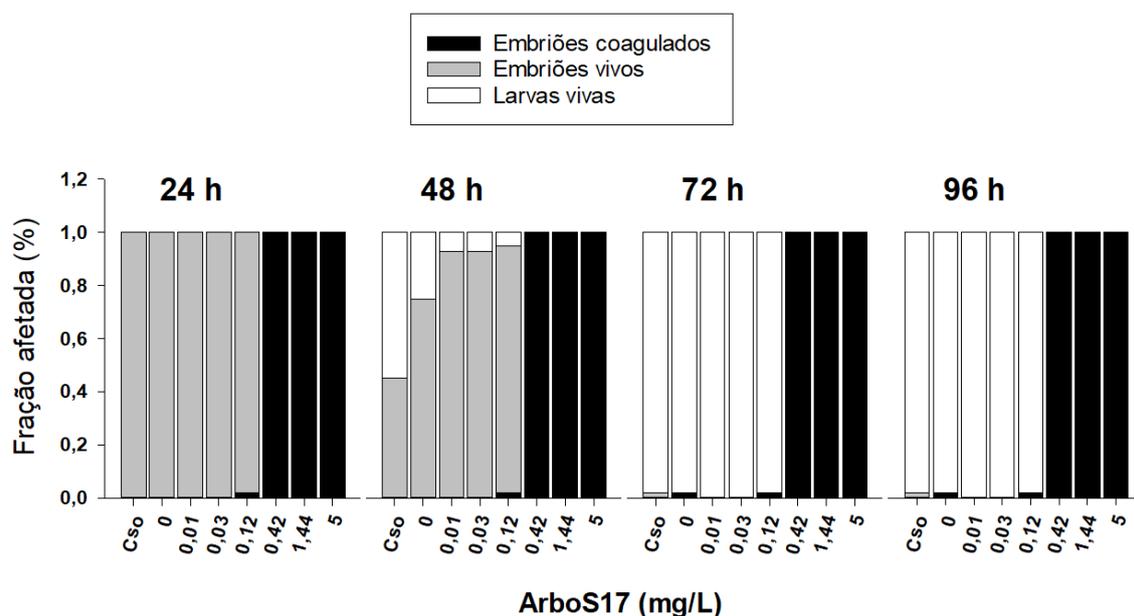
**Figura 29.** Curva de concentração resposta (mortalidade) dos organismos expostos por 96 h a Arbo4A064E.  $CL_{50(96h)} = 11,68$  mg/L - Weibull 4 parâmetros ( $R^2 = 1$ )  $p < 0,01$ .

#### 6.1.5 ArboS17

A ArboS17 é uma quinona classificada como antraquinona, e, que ao longo da sua cadeia aromática (antraceno) possui hidroxilas, o que sugere um possível aumento na toxicidade da molécula, já que estudos anteriores mostraram efeitos colaterais tóxicos associados à posição do grupo hidroxila no núcleo do antraceno (C-1/C4 e C-8/C-5) (**Figura 30**) (TANAKA *et al.*, 2000; DIBWE *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2019). Em vista disso, para a realização do teste de embriotoxicidade foram utilizadas baixas concentrações da molécula ArboS17, tais como: 0,01; 0,03; 0,12; 0,42; 1,44 e 25 mg/L, mais o DMSO 1% (conrole solvente – Cso) e 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo), com tempo total de exposição de 96 h (**Figura 31**).

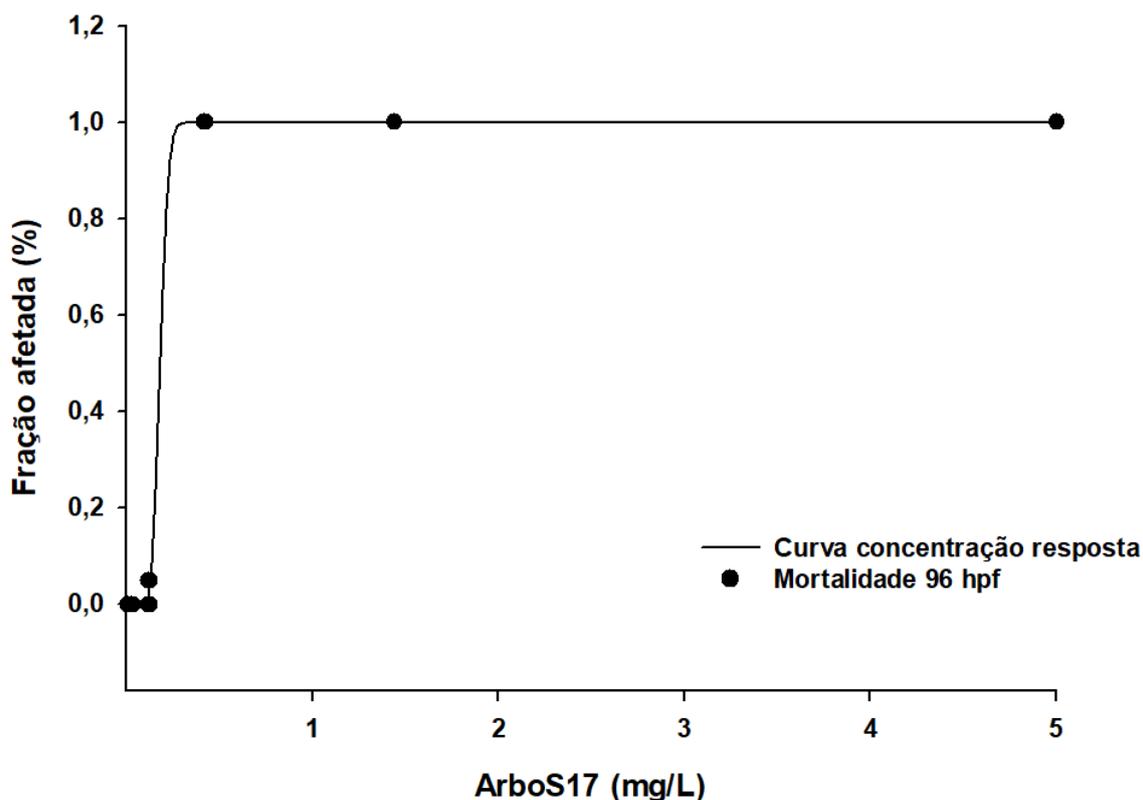


**Figura 30.** Estrutura molecular da ArboS17.



**Figura 31.** Gráfico do panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish (*D. rerio*) durante 96 h de exposição a ArboS17 utilizando as seguintes concentrações: Cso (controle solvente – DMSO 1%); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 0,01; 0,03; 0,12; 0,42; 1,44; e 5 mg/L.

Nas primeiras 24 h a taxa de mortalidade foi total nas três últimas concentrações mais altas (0,42 mg/L, 1,44mg/L e 5 mg/L) e insignificante (abaixo de 10%) na C3 (0,12 mg/L). No restante do teste não houveram mudanças significativas na mortalidade e nem efeitos subletais nas concentrações restantes. Assim, a  $CL_{50(96h)}$  foi determinada em 0,18 mg/L - L - Weibull 4 parâmetros ( $R^2 = 0,99$ )  $p < 0,01$  (**Figura 32**), corroborando com os dados da literatura ( $CL_{50(72h)} = 0,20$  mg/L) (HE *et al.*, 2012).



**Figura 32.** Curva de concentração resposta (mortalidade) dos organismos expostos por 96 h a ArboS17.  $CL_{50(96h)} = 0,18$  mg/L - Weibull 4 parâmetros ( $R^2 = 0,99$ )  $p < 0,01$ .

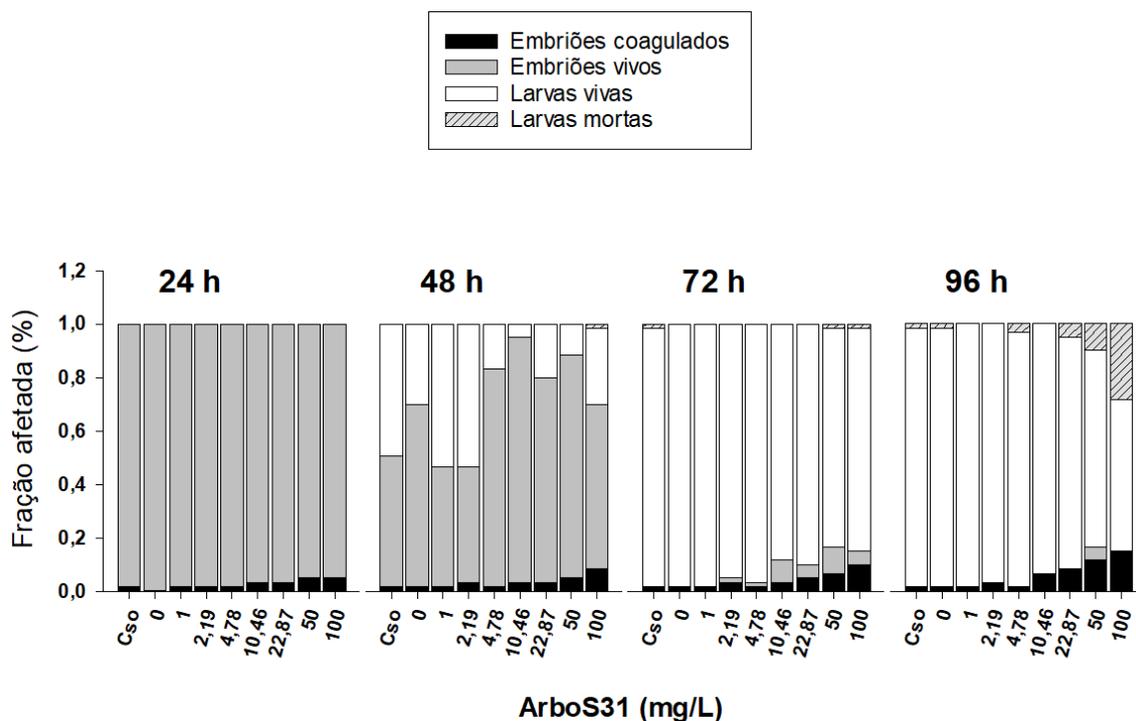
Como esperado, a ArboS17, dentre as quinonas, foi a segunda molécula mais tóxica para o embrião do zebrafish (*D. rerio*) dentre as sete quinonas testadas, possuindo uma  $CL_{50(96h)}$ , em organismo não-alvo, menor que a determinada em 48 h como larvicida de *A. aegypti* ( $CL_{50(48h)} = 4,8$  mg/L) (SILVA *et al.*, 2020). Sendo assim, recomenda-se não serem realizados mais testes com essa molécula e nem investimentos em futuras formulações para larvicida.

#### 6.1.6 ArboS31

Foi observada que as diferentes concentrações da substância ArboS31 estavam homogêneas no momento da dissolução, entretanto no dia posterior (dia de leitura do bioensaio) foi observado que parte do composto se aglomerou e decantou, cobrindo toda a superfície do córion do organismo (tornando-se uma suspensão).

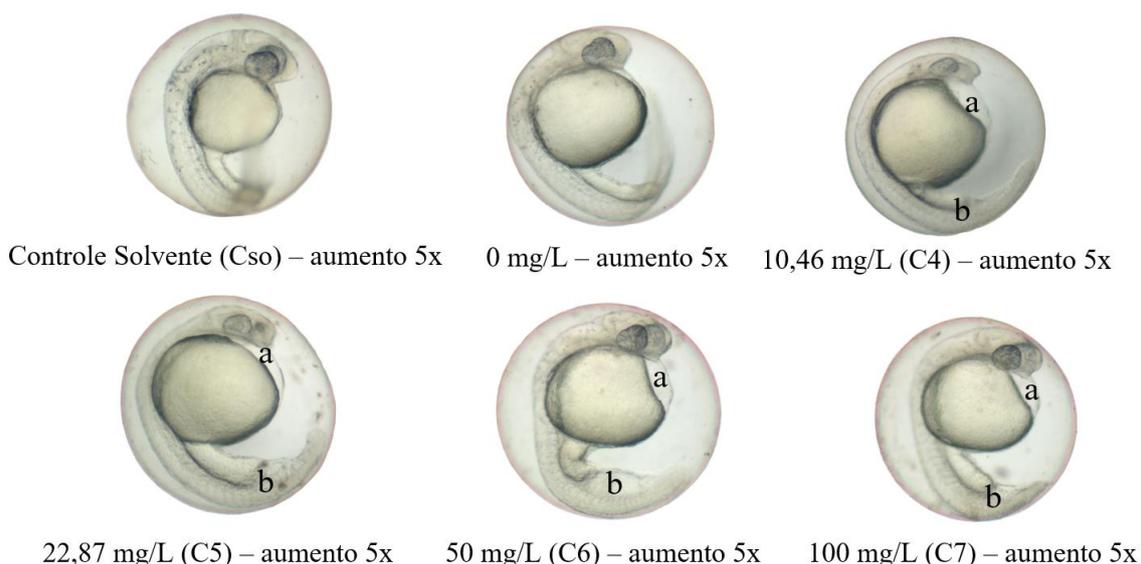
A **Figura 33** mostra a visão geral do teste de embriotoxicidade. As concentrações testadas foram: DMSO 1% (C<sub>so</sub>); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 1

(C1); 2,19 (C2); 4,78 (C3); 10,46 (C4); 22,87 (C5); 50 (C6); e 100 mg/L (C7) e o tempo total de exposição foi de 96 h.



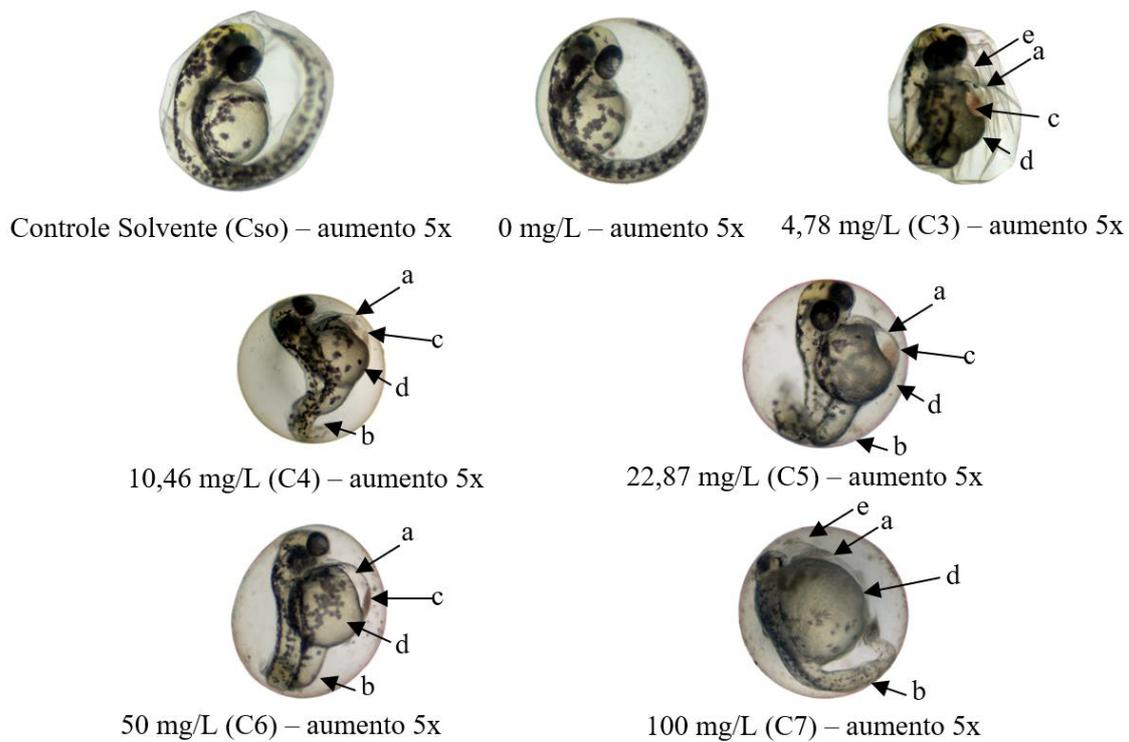
**Figura 33.** Gráfico do panorama geral do teste de embriotoxicidade do zebrafish (*D. rerio*) durante 96 h de exposição a ArboS31 utilizando as seguintes concentrações: Cso (controle solvente – DMSO 1%); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 1; 2,19; 4,78; 10,46; 22,87; 50; 100 mg/L.

Nas primeiras 24 h de exposição houve uma mortalidade nos embriões, sendo equivalente à 5% nas últimas duas concentrações (50 mg/L e 100 mg/L). Ademais, no mesmo dia foi observado a partir da C4 (10,46 mg/L) edemas no saco vitelínico em mais de 10% dos embriões, chegando à 80% nas concentrações mais altas. Além disso, a partir da C4 (10,46 mg/L) também foi possível verificar que cerca de 25% dos embriões estavam com malformação na cauda. Por fim, a partir da C6 (50 mg/L) foi possível aferir que mais de 20% dos embriões apresentavam malformações no saco vitelínico (**Figura 34**).

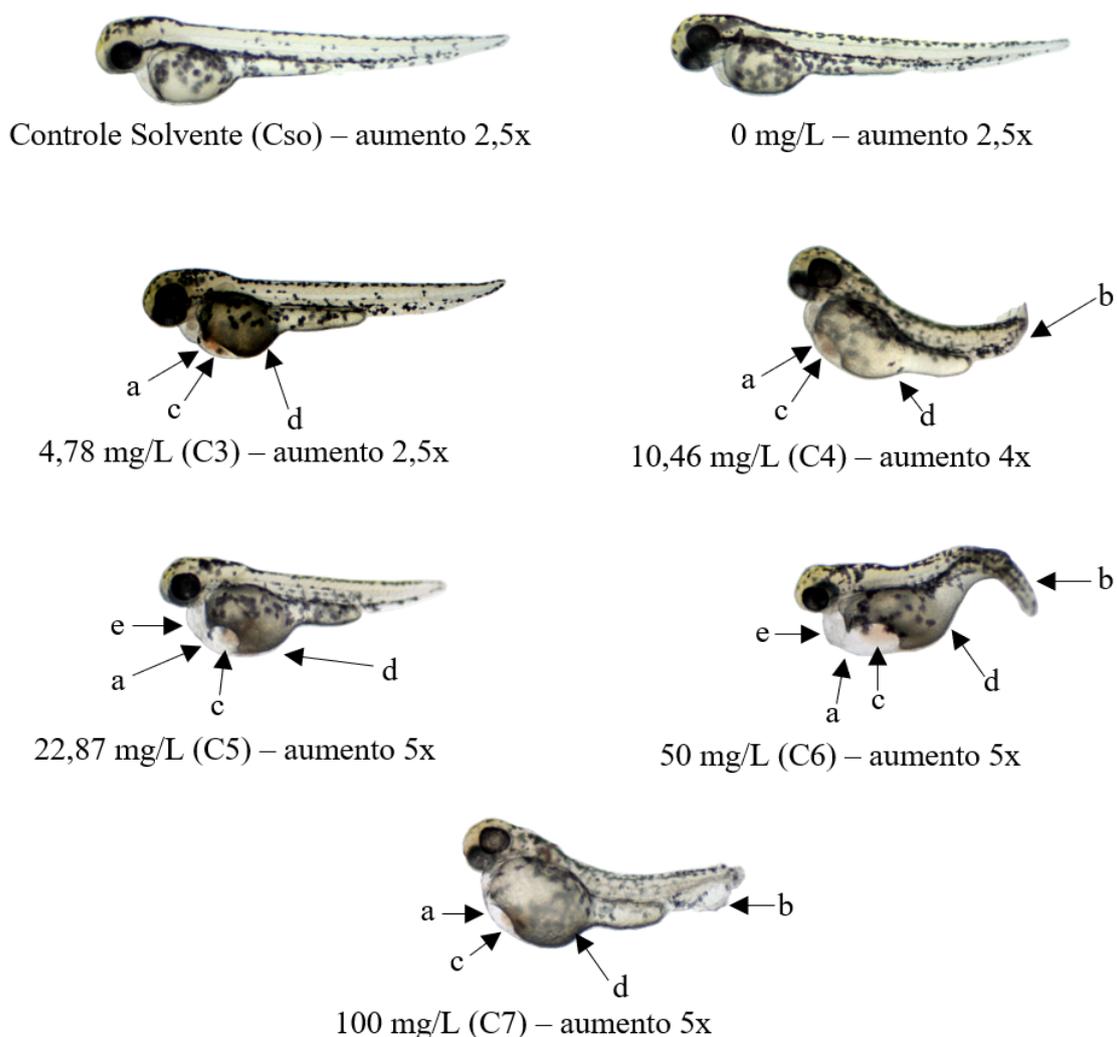


**Figura 34.** Embriões de zebrafish expostos a ArboS31 por 24 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 10,46 mg/L (C4); 22,87 mg/L (C5); 50 mg/L (C6); e 100 mg/L (C7). a: edema no saco vitelínico; b: malformação na cauda.

Em 48 h, já tiveram organismos eclodidos e um aumento na mortalidade apenas na última concentração (100 mg/L). No entanto, os efeitos subletais aumentaram consideravelmente, sendo possível identificá-los, tanto em embriões (**Figura 35**) quanto nas larvas (**Figura 36**), a partir da C3 (4,78 mg/L), como estase sanguínea (46% dos indivíduos), edema no saco vitelínico (68% dos indivíduos) e malformações no saco vitelínico (53% dos indivíduos). Ademais, as alterações morfológicas já visualizadas nas 24 h, foram verificadas em maiores quantidades, principalmente nas concentrações mais elevadas, como por exemplo, malformação no saco vitelínico com 81% dos organismos alterados já na C4 (10,46 mg/L). Em relação ao aparecimento de edemas cardíacos, houve uma maior aparição a partir da quinta concentração (22,87 mg/L), contudo, alguns embriões na C3 (10,46 mg/L) já possuíam essa anomalia. Por fim, em 48 h de exposição, apesar de não serem realizados testes morfométricos sugerisse uma pequena diferença, em relação aos controles, no tamanho dos embriões vivos eclodidos, a partir da quarta concentração também.

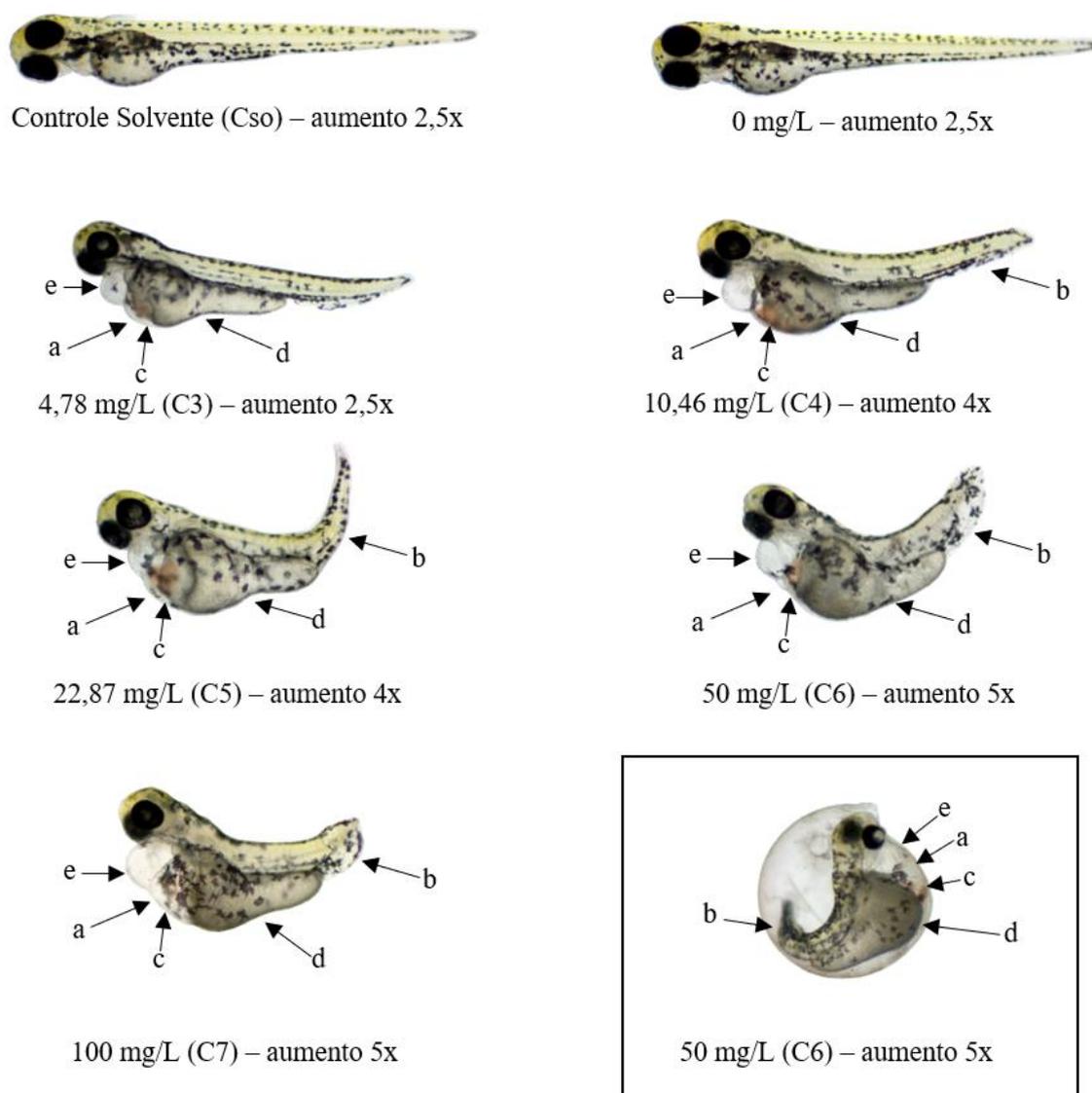


**Figura 35.** Embriões de zebrafish expostos a ArboS31 por 48 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 4,78 mg/L (C3); 10,46 mg/L (C4); 22,87 mg/L (C5); 50 mg/L (C6); e 100 mg/L (C7). a: edema no saco vitelínico; b: malformação na cauda; c: estase sanguínea; d: malformação do saco vitelínico; e: edema cardíaco.



**Figura 36.** Larvas de zebrafish expostas a ArboS31 por 48 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 4,78 mg/L (C3); 10,46 mg/L (C4); 22,87 mg/L (C5); 50 mg/L (C6); e 100 mg/L (C7). a: edema no saco vitelínico; b: malformação na cauda; c: estase sanguínea; d: malformação do saco vitelínico; e: edema cardíaco.

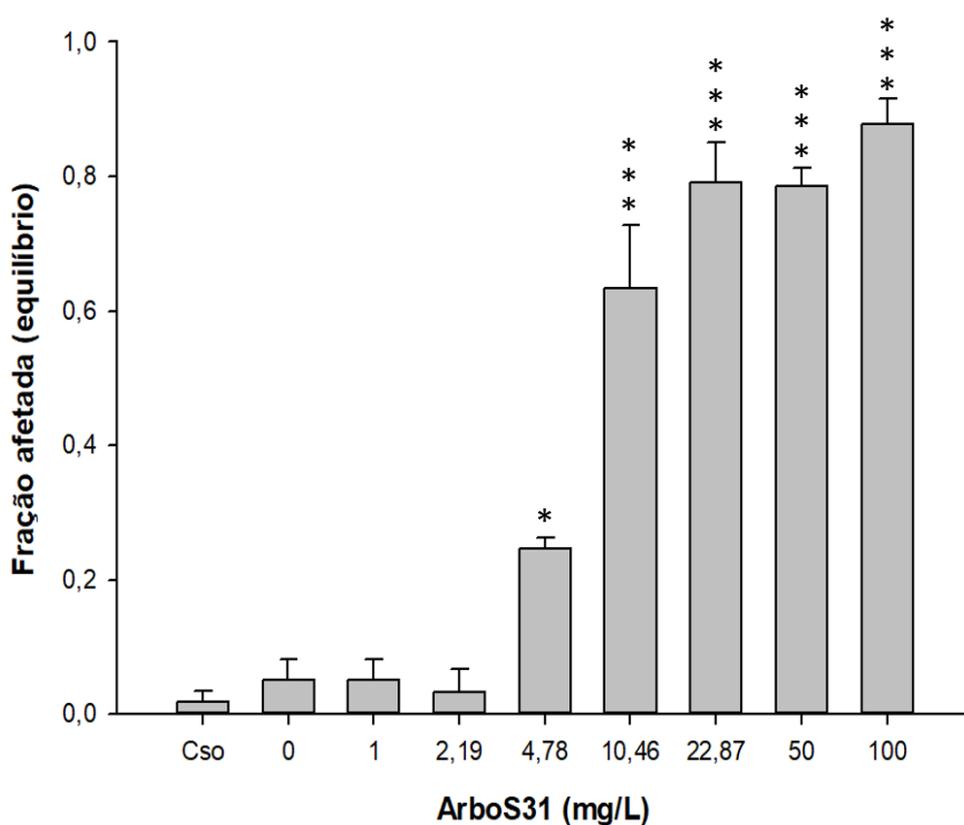
Após 72 h de exposição houve um aumento na mortalidade nas últimas 3 concentrações, e, notou-se uma inibição da eclosão em cerca de 10% dos organismos a partir da C4 (10,46 mg/L), que com exceção da C6 (50 mg/L), se normalizou em 96 h. Ademais, foram observadas as mesmas alterações morfológicas citadas anteriormente iniciados na terceira concentração. Por fim, com a eclosão dos embriões a malformação na cauda ficou mais evidente e em maiores números a partir da C4 (**Figura 37**).



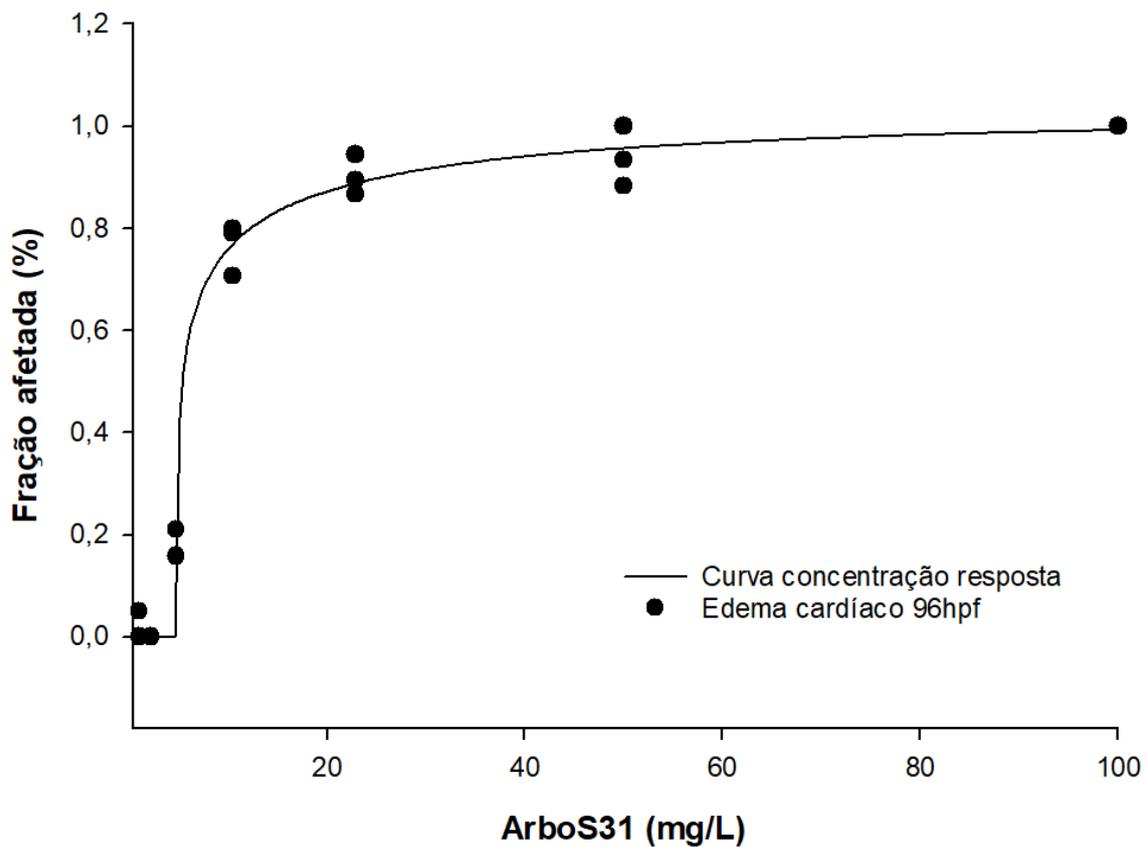
**Figura 37.** Embriões e larvas de zebrafish expostos a ArboS31 por 72 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 4,78 mg/L (C3); 10,46 mg/L (C4); 22,87 mg/L (C5); 50 mg/L (C6); e 100 mg/L (C7). a: edema no saco vitelínico; b: malformação na cauda; c: estase sanguínea; d: malformação do saco vitelínico; e: edema cardíaco.

Por fim, nas 96 h de exposição foi possível observar desde a C3 (4,78 mg/L) um aumento na porcentagem de organismos mortos, que na C7 (100 mg/L) chega a atingir 45%, mostrando que a  $CL_{50}$  da ArboS31 está acima da concentração limite estabelecida pelo protocolo OECD nº 236 (*Guideline on Fish Embryo Toxicity Test – FET*), 100 mg/L. Ademais, nota-se que apenas na C6 (50 mg/L) há um retardo no desenvolvimento embrionário em 6% dos organismos vivos. Contudo, desde a C2 (2,19 mg/L) pode-se

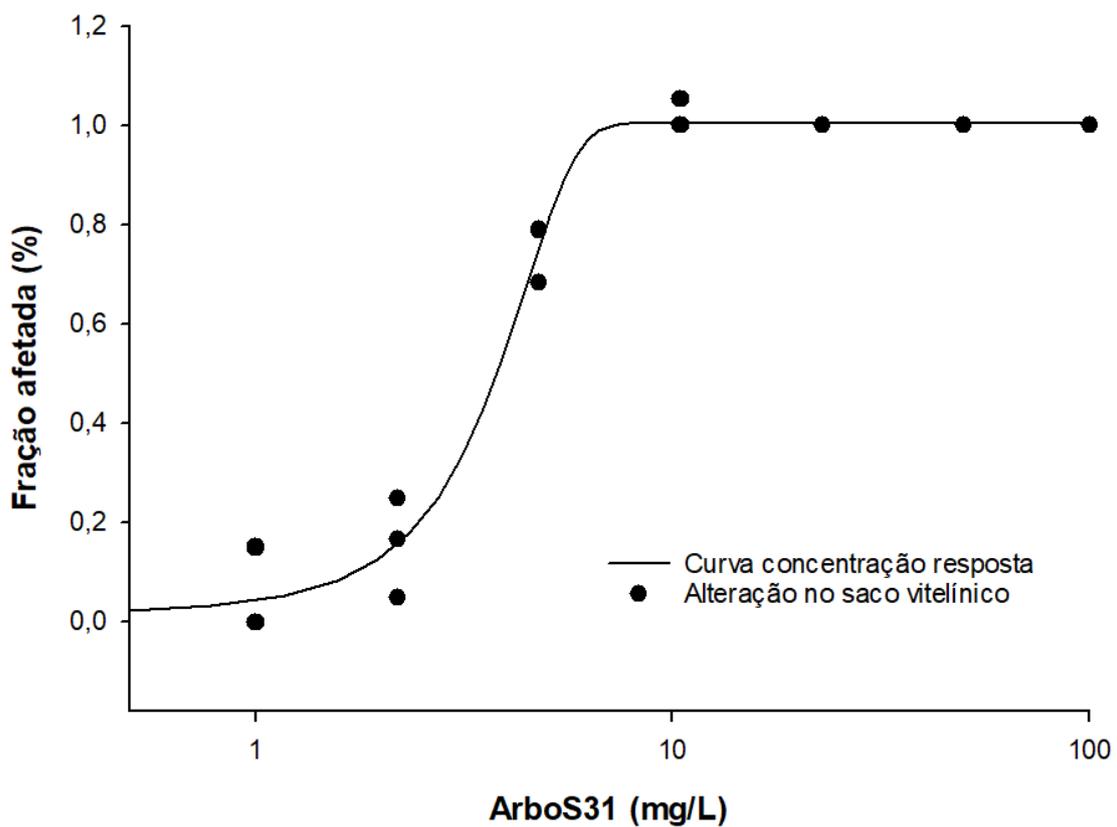
observar alterações no saco vitelínico (15% das larvas), e, a partir da C3 já existem alterações comportamentais significativas ( $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,001^{***}$ ) (**Figura 38**). Em relação aos efeitos subletais já citados, como malformação na cauda e no saco vitelínico, edemas cardíacos (**Figura 39**) e no saco vitelínico (**Figura 40**), estase sanguínea, desde a C3 há um crescimento gradual, sendo possível visualizar ao longo das concentrações (**Figura 41**). Por fim, vale destacar que baseado nos presentes dados a mortalidade aumenta progressivamente com o tempo de exposição nas concentrações mais altas, e, que apesar de não ter sido realizado o teste morfométrico, ao fim das 96 h ainda é possível supor uma diminuição no tamanho das larvas desde a C4 (10,46 mg/L).



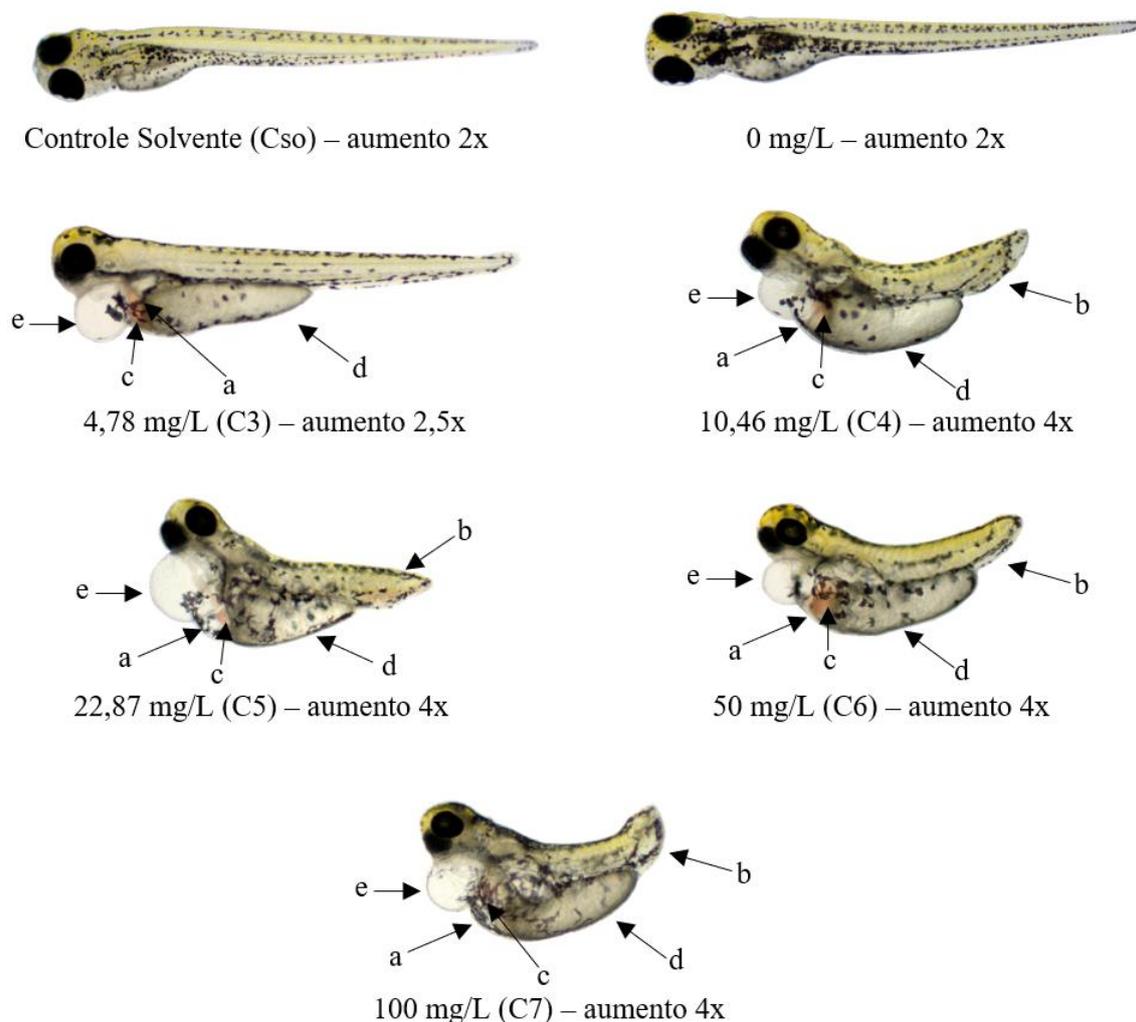
**Figura 38.** Alterações comportamentais das larvas de zebrafish expostas a ArboS31 por 96 h. Resultados expressam a média dos valores  $\pm$  erro padrão. Foi realizada a ANOVA One Way, método Dunnett's, mostrando a diferença significativa ( $p < 0,05^*$  e  $p < 0,001^{***}$ ) em comparação ao controle negativo.



**Figura 39.** Curva de concentração resposta (edema cardíaco) dos organismos expostos por 96 h a ArboS31.  $CL_{50(96h)} = 5,43$  mg/L. Modelo: Weibull – 4 parâmetros.  $R^2$  0.99.



**Figura 40.** Curva de concentração resposta (saco vitelínico) dos organismos expostos por 96 h a ArboS31.  $CL_{50(96h)} = 3,79\text{mg/L}$ . Modelo: Weibull – 4 parâmetros.  $R^2 0,99$ .



**Figura 41.** Larvas de zebrafish expostas a ArboS31 por 96 h. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); DMSO 1% (controle solvente – Cso); 4,78 mg/L (C3); 10,46 mg/L (C4); 22,87 mg/L (C5); 50 mg/L (C6); e 100 mg/L (C7) da ArboS31. a: edema no saco vitelínico; b: malformação na cauda; c: estase sanguínea; d: malformação do saco vitelínico; e: edema cardíaco.

Após a realização do teste de embriotoxicidade da ArboS31, apesar de não ser estipulada a  $CL_{50}$ , a partir da C3 (4,78 mg/L) já foi identificado uma elevada taxa de efeitos subletais, que talvez, com exposições mais prolongadas mostrassem inviabilidade à vida nessas concentrações. Contudo, como o intuito do teste era verificar se a quinona ArboS31 causaria efeitos embriotóxicos, sendo viável ou não para sua utilização como larvicida de *A. aegypti* de forma ecoamigável, com base nas concentrações previamente testadas (**Tabela 3**), a ArboS31 possui potencial não letal. Uma vez que a  $CL_{50}$  mais alta é 1,1 mg/L em *A. aegypti* (SILVA *et al.*, 2020), e com base no FET realizado em 96 h de

exposição, até a C2 (2,19 mg/L) não há taxa de mortalidade e nem aparição de efeitos subletais persistentes e significativos (acima de 10% - OECD n° 236).

Assim, com base nos resultados do FET, foi possível identificar o grau de toxicidade das sete moléculas, classificando-as, em relação a mortalidade (CL<sub>50</sub> (96h)): ArboS97 (< 0,01 mg/L) < ArboS17 (0,18 mg/L) < ArboS22 (6,01 mg/L) < Arbo4A064E (11,68 mg/L) < ArboS18 (> 35 mg/L) < ArboS31 (> 100 mg/L) < ArboS1 (> 100mg/L). Devido ao desempenho larvicida (CHENG *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2020) e os resultados de embriotoxicidade, a ArboS31 foi a molécula selecionada para os testes em adultos de zebrafish.

## 6.2 Testes de toxicidade em zebrafish (*Danio rerio*) adulto

A ArboS31 foi a molécula selecionada para a realização dos testes em zebrafish adultos devido os resultados obtidos durante os testes embrionários e desempenho como larvicida para *A. aegypti*, já que a intenção dos testes ecotóxicos foram descobrir qual molécula teria melhores qualidades para virar uma formulação futuramente, diminuindo os danos ambientais e aumentando a eficiência como larvicida.

Durante todo o período de exposição (96 h) e pós-exposição (96 h), os peixes não apresentaram alterações comportamentais ou clínicos, tais como: perda do equilíbrio, natação superficial, errática e/ou circular, alterações respiratórias, mudanças na cor da pele, morbidade e mortalidade.

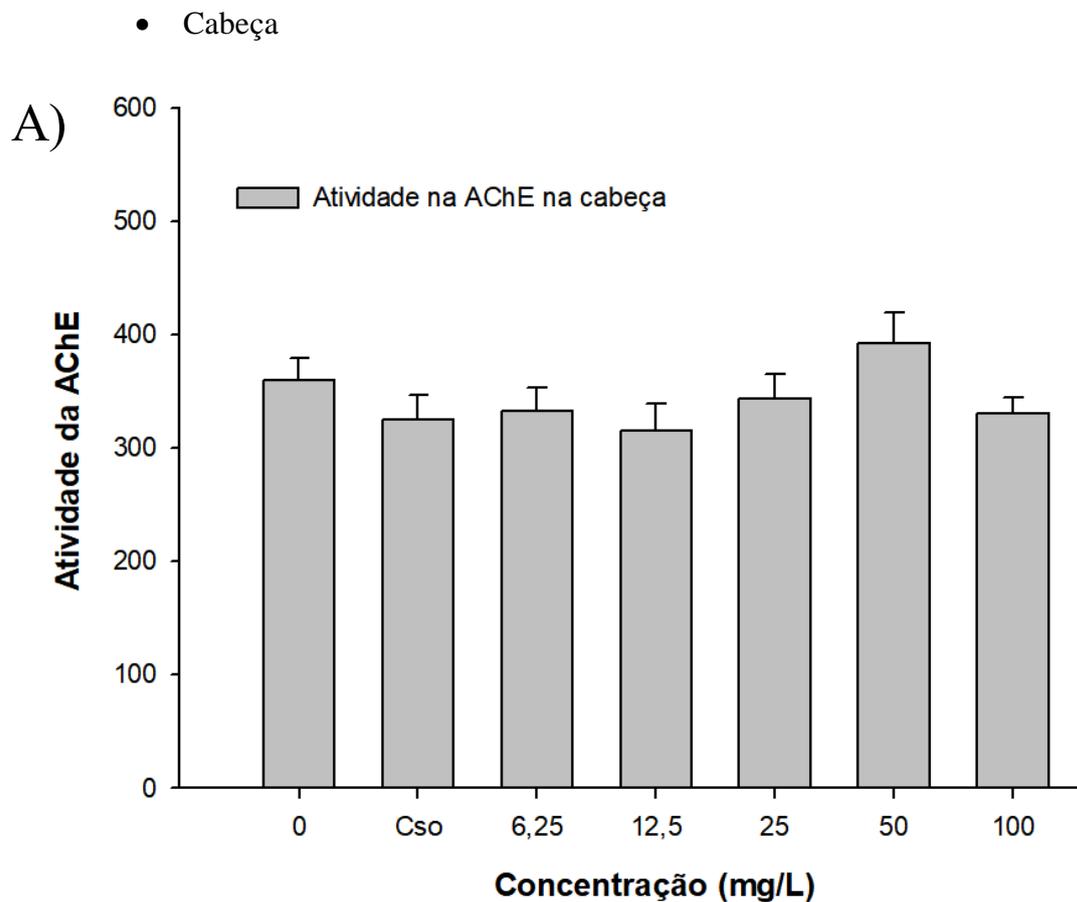
### 6.2.1 Marcadores bioquímicos

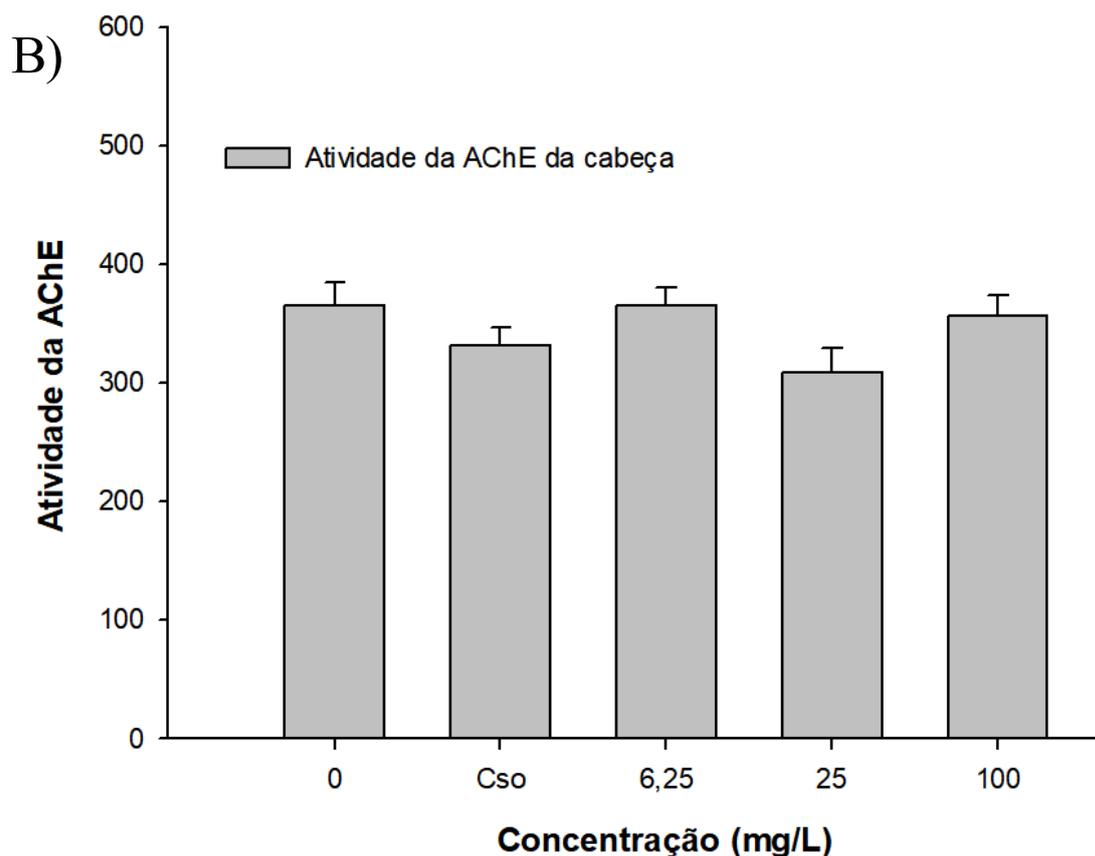
Foram testados os seguintes marcadores bioquímicos: I) biomarcador de neurotoxicidade (atividade de colinesterase); e, enzimas representativas de diferentes vias metabólicas, II) glutathione-S-transferase (fase II do processo de desintoxicação); e, III) lactato desidrogenase (fase anaeróbica de produção de energia).

#### 6.2.1.1 Acetilcolinesterase (AChE)

A AChE por ser uma enzima chave do sistema nervoso central (SNC) e que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina no sistema nervoso e na placa

neuromuscular (TÕUGU; KESVATERA, 1996; CHEN *et al.*, 2011; LIONETTO *et al.*, 2013; COLOVIC *et al.*, 2013) foi selecionada para teste em duas regiões diferentes: a cabeça e a cauda, regiões do zebrafish que possibilitam deslumbrar de melhor forma o sistema nervoso e a placa neuromuscular (LIONETTO *et al.*, 2013; MARINHO *et al.*, 2019) (**Figura 42 e 43**).

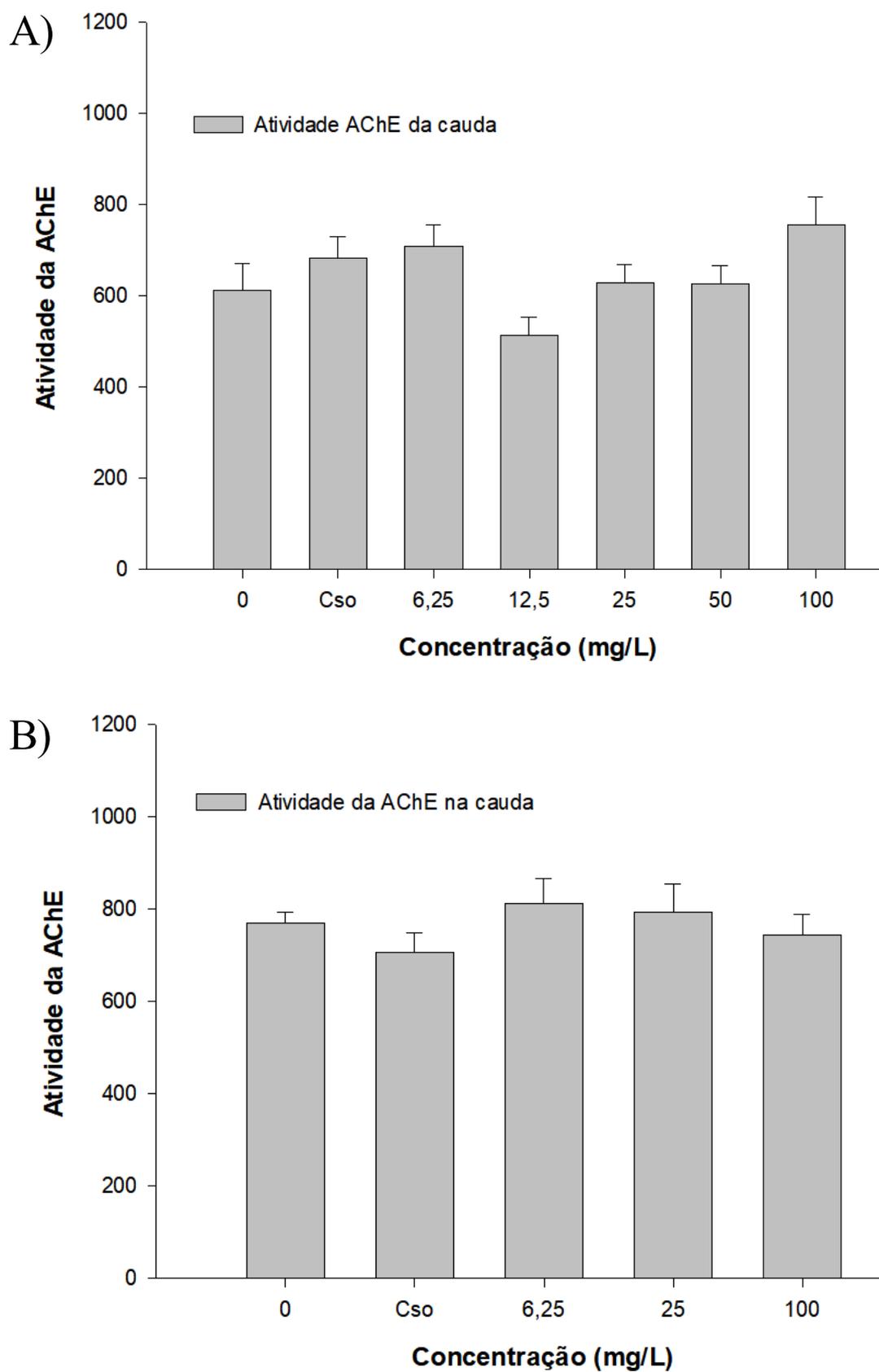




**Figura 42.** Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) na cabeça do adulto de *Danio rerio* depois de 96 h de exposição à ArboS31. A – Atividade da exposição (96 h). B – Atividade da pós-exposição (96 h). Resultados expressam a média dos valores  $\pm$  erro padrão. Ambos os testes passaram no teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e de variância (Brown-Forsythe), e, não houve diferença significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ) em ambos os ensaios.

Os resultados da atividade enzimática da AChE na cabeça não tiveram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos, nem na exposição, ou na pós-exposição, indicando que a quinona ArboS31 não inibe e nem estimula a AChE nessa região.

- Cauda



**Figura 43.** Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) na cauda do adulto de *Danio rerio* depois de 96 h de exposição à ArboS31. A – Atividade da exposição (96 h). B – Atividade da pós-exposição (96 h). Resultados expressam a média dos valores  $\pm$  erro padrão. 0 - controle negativo; Cso - controle DMSO; Os

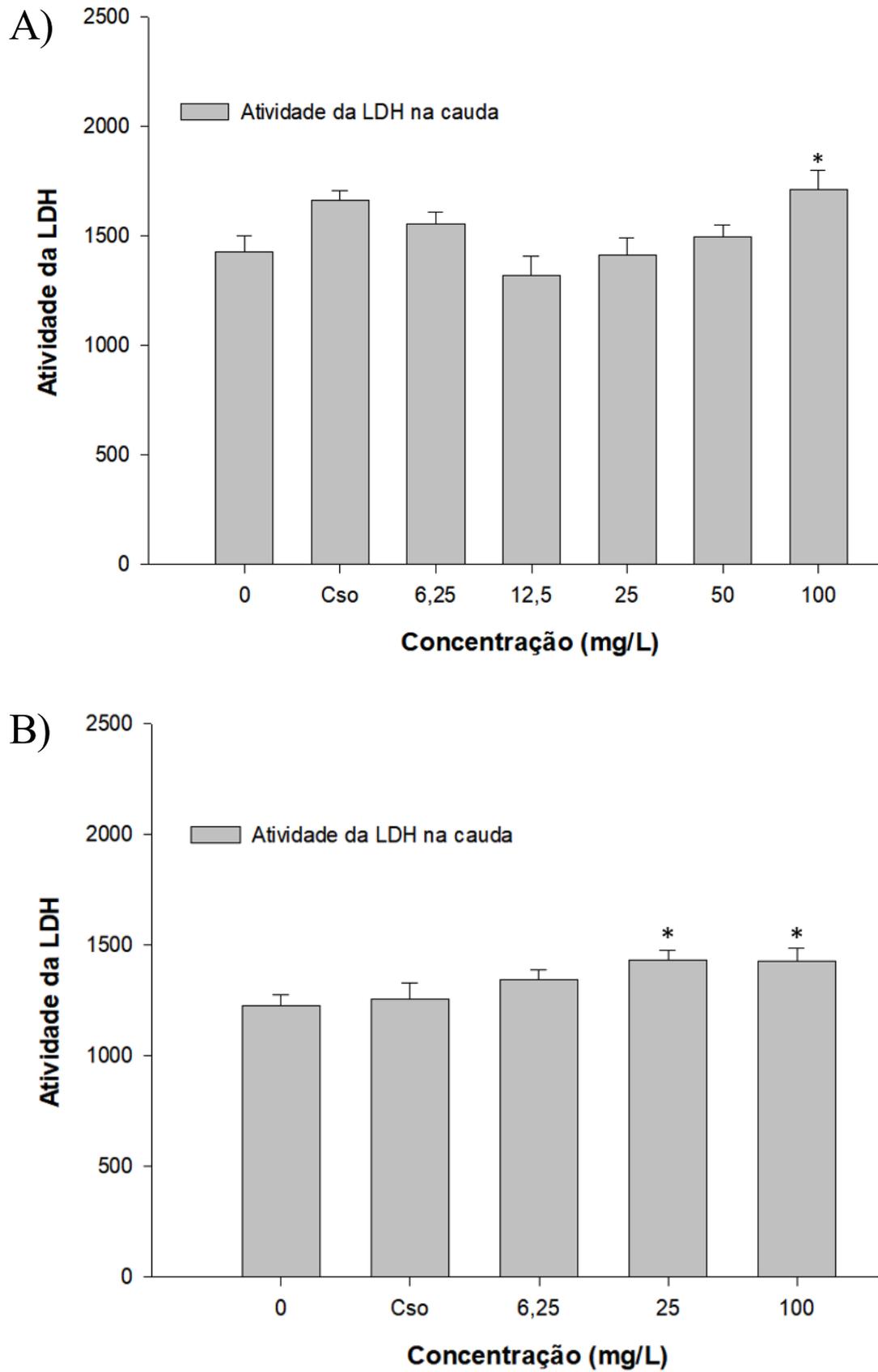
demais grupos foram expostos a 6,25, 25 e 100 mg/L do material-teste. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (0) não foram observadas,  $p > 0,05$ .

Em relação à atividade da AChE na região da cauda, na exposição houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a média dos grupos, contudo após a realização do teste Dunnett's (teste paramétrico) não foi identificada nenhuma diferença entre os grupos em relação ao controle negativo (0 mg/L). Já na pós-exposição, não houve diferença significativa entre a média dos grupos ( $p > 0,05$ ) após o ANOVA One Way.

Portanto, com base nos resultados da atividade enzimática da AChE em duas regiões do adulto do zebrafish sugere-se que a ArboS31 não é uma substância com potencial neurotóxico em organismo não-alvo, uma vez que não houve aumento e nem inibição da acetilcolinesterase na cabeça e nem na cauda do peixe, pelo menos em zebrafish.

#### 6.2.1.2 Lactato Desidrogenase (LDH)

Além de poder causar alterações na AChE, o estresse oxidativo pode influenciar na atividade da lactato desidrogenase (LDH), enzima de grande importância para a via anaeróbica de produção de energia (metabolismo), e, para o reconhecimento de estresse oxidativo causado por xenobióticos em peixes (SARAVANAN *et al.*, 2011; JIA *et al.*, 2020). Ademais, sabe-se que o aumento de LDH pode-se está relacionado com danos na membrana celular ou com a apoptose (morte celular) (RAI *et al.*, 2015; KREUZ; FISCHLE, 2016; ZHANG *et al.*, 2021). Assim, com o intuito de entender um pouco mais da atuação metabólica da ArboS31 em organismos não-alvos, o presente estudou testou a atividade enzimática da LDH na região da cauda do zebrafish (*Danio rerio*). Obtendo os seguintes resultados (**Figura 44**).



**Figura 44.** Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na cauda do adulto de *Danio rerio* depois de 96 h de exposição à ArboS31. A – Atividade da exposição (96 h). B – Atividade da pós-exposição (96 h).

Resultados expressam a média dos valores  $\pm$  erro padrão. 0 - controle negativo; Cso - controle DMSO; Os demais grupos foram expostos a 6,25, 25 e 100 mg/L do material-teste. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (0) foram observadas e estão representadas por asteriscos (\*), \* $p < 0,05$ .

A AboS31 apresentou uma alteração significativa (\* $p < 0,05$  – Método Dunnett's – teste paramétrico), na atividade da LDH tanto na exposição, quanto na pós-exposição, somente nas concentrações mais altas.

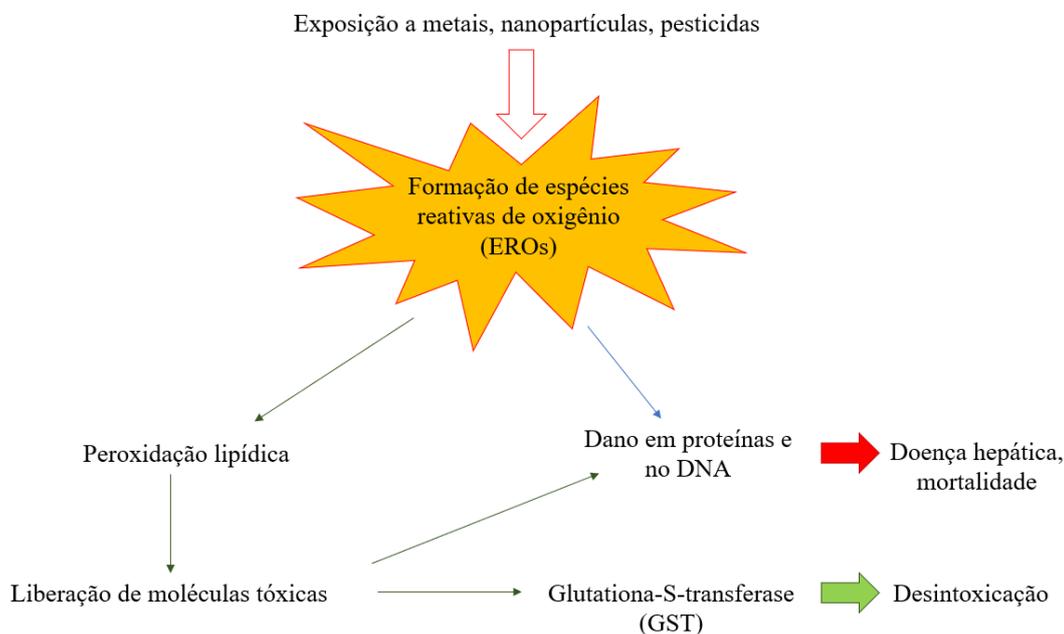
Em relação à exposição, o aumento da atividade enzimática da lactato desidrogenase, na última concentração (100 mg/L), sugere um aumento de radicais livres, conseqüentemente, um estresse oxidativo (NITA; GRZYBOWSKI, 2016), que por sua vez pode desencadear um estresse apoptótico, já que, o estresse oxidativo é conhecido por causar danos diretos ao DNA e apoptose celular (RAI *et al.*, 2015; KREUZ; FISCHLE, 2016). Contudo, não se pode afirmar que o aumento do LDH em 100 mg/L esteja diretamente ligado a morte celular, uma vez que a célula apoptótica pode não romper a membrana plasmática (PEREIRA *et al.*, 2015). Mas, vale ressaltar que a morte celular programada é um componente vital para o organismo, e, ocorre por meio de mecanismos bioquímicos, que dependem de energia (ELMORE, 2007). Ademais, a apoptose também ocorre como mecanismo de defesa contra xenobióticos e doenças (SULUKAN *et al.*, 2017). Portanto, o aumento da atividade da LDH indica um possível dano no metabolismo da cauda durante a exposição de 100 mg/L, ocasionado, provavelmente, pelo estresse oxidativo, resultando no apoptose das células nessa região.

A resposta da atividade enzimática pós-exposição também obteve diferença significativa (\* $p < 0,05$  – Método Dunnett's – teste paramétrico), em 25 mg/L (concentração intermediária) e 100 mg/L (última concentração), sugerindo um efeito residual da exposição. A partir desses resultados, presume-se que seria interessante aumentar o tempo de pós-exposição, e, talvez realizar testes de biomagnificação.

#### 6.2.1.3 Glutationa-S-transferase (GST)

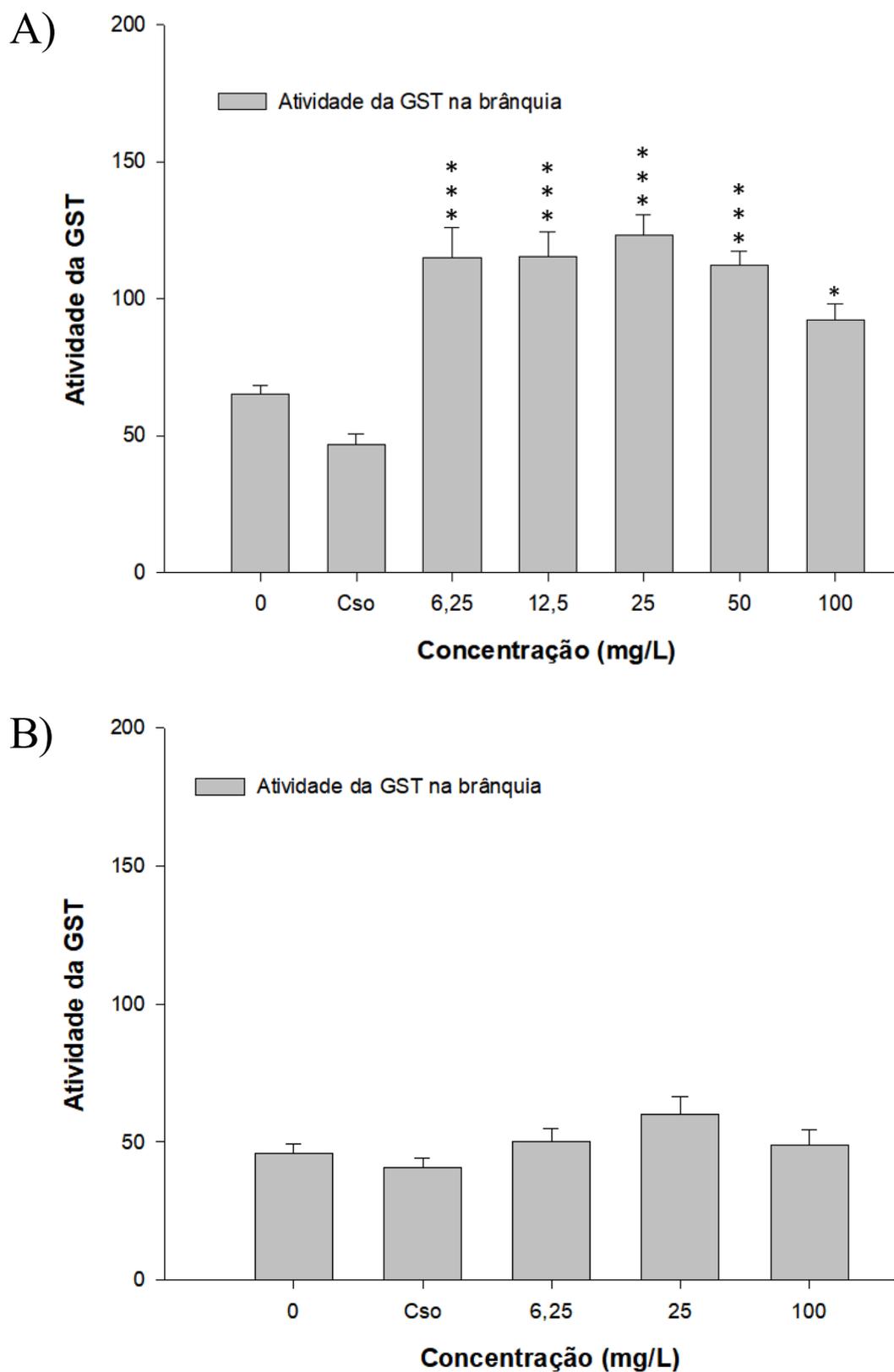
A glutathione-S-transferase (GST) é uma das principais enzimas que participam da fase II de desintoxicação celular (GLISIC *et al.*, 2015). Sendo elemento crucial para a manutenção da homeostase do óxido, constituindo uma enzima essencial na defesa

secundária do estresse oxidativo (GUILIO RICHARD; HINTON, 2008; MIHALJEVIĆ *et al.*, 2020) (**Figura 45**). Dessa forma, para aferir a atividade da GST exposta a ArboS31 foram feitos testes em duas regiões diferentes do *D. rerio* adulto: brânquias (**Figura 46**) e tronco, onde localizam o fígado, rim e intestino, órgãos com maior ação dessa enzima (GLISIC *et al.*, 2015; MIHALJEVIĆ *et al.*, 2020) (**Figura 47**).



**Figura 45.** Esquema de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e desintoxicação através da glutaciona-S-transferase (GST). Fonte: adaptado de Schlenk *et al.* (2008).

- Brânquias



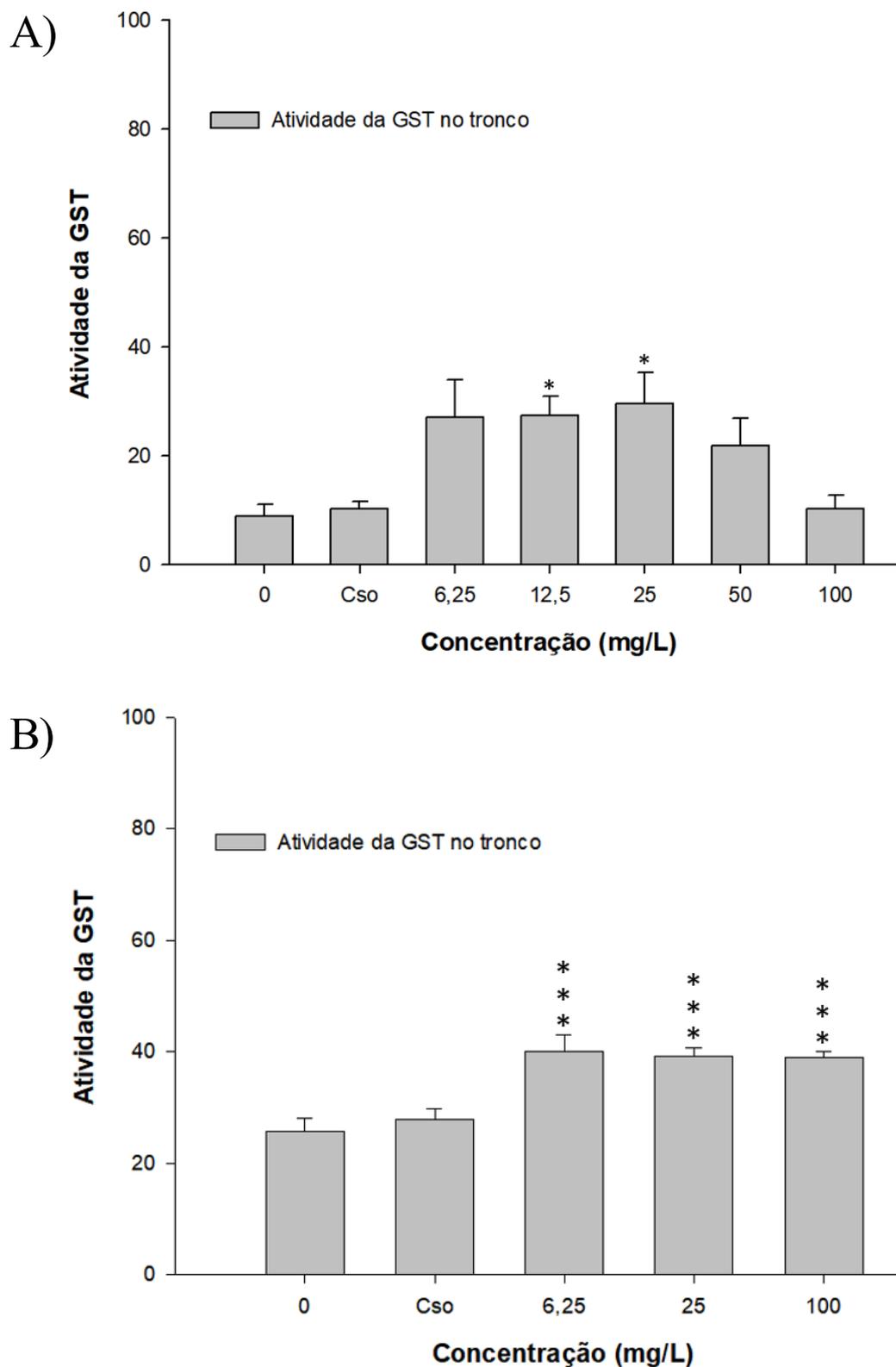
**Figura 46.** Atividade da glutatona-S-transferase (GST) na brânquia do adulto de *Danio rerio* depois de 96 h de exposição à ArboS31. A – Atividade da exposição (96 h). B – Atividade da pós-exposição (96 h). Resultados expressam a média dos valores  $\pm$  erro padrão. 0 - controle negativo; Cso - controle DMSO; Os

demais grupos foram expostos a 6,25, 25 e 100 mg/L do material-teste. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (0) foram observadas e estão representadas por asteriscos (\*), \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Houve um aumento significativo na atividade da GST durante a exposição a ArboS31, nas concentrações de 6,25 mg/L ( $p < 0,001$ ); 12,5 mg/L ( $p < 0,001$ ); 25 mg/L ( $p < 0,001$ ); 50 mg/L ( $p < 0,001$ ); e, 100 mg/L ( $p < 0,05$ ), sugerindo que a GST desempenha o papel na desintoxicação da molécula na brânquia, órgão de grande importância fisiológica, uma vez que é responsável pelas trocas gasosas, osmorregulação, excreção de resíduos de nitrogênio, e, auxilia no equilíbrio ácido-base (ROMBOUGH, 2002; ORUC; SEVGILER; UNER, 2004).

Na pós-exposição não houve diferença significativa entre a média dos grupos ( $p > 0,05$  – Teste do Kruskal-Wallis – teste não-paramétrico), sugerindo que após a retirada da ArboS31 o organismo volta a sua condição normal, supostamente desintoxicado. Esse comportamento era esperado, já que as brânquias são órgãos responsáveis pela osmorregulação e troca de gases, além de serem a primeira barreira de contato da molécula, sendo mais vulneráveis por estarem em contato direto com o ambiente (ROMBOUGH, 2002; SEITBAYEV *et al.*, 2013).

- Tronco



**Figura 47.** Atividade da glutatona-S-transferase (GST) no tronco do adulto de *Danio rerio* depois de 96 h de exposição à ArboS31. A – Atividade da exposição (96 h). B – Atividade da pós-exposição (96 h). Resultados expressam a média dos valores  $\pm$  erro padrão. 0 - controle negativo; Cso - controle DMSO; Os demais grupos foram expostos a 6,25, 25 e 100 mg/L do material-teste. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (0) foram observadas e estão representadas por asteriscos (\*), \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Em ambos bioensaios (exposição e pós-exposição), foi possível ver um aumento significativo ( $p < 0,05$  – método Dunn's, teste não paramétrico –  $p < 0,001$  – método Dunnett's, teste paramétrico, respectivamente) na atividade da glutationa-S-transferase (GST).

Na exposição, o aumento significativo ocorreu em duas concentrações intermediárias (12,5 mg/L e 25 mg/L), supostamente indicando que em 6,25 mg/L a quantidade de radicais livres não era tão exorbitante (COGO *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2010), talvez, devido a pré-absorção e metabolismo nas brânquias (ROMBOUGH, 2002; SCHLENK *et al.*, 2008). Então, nas concentrações 12,5 mg/L e 25 mg/L, o aumento da atividade demonstra que o organismo teve uma reação positiva à exposição, favorecendo o metabolismo e eliminação das espécies reativas subsequentes da ArboS31 (ORUC; SEVGILER; UNER, 2004). Já nas dosagens de 50 mg/L e 100 mg/L, apesar de não haver relevância estatisticamente, a diminuição nessas concentrações em relação as outras testadas pode ter relação com o consumo total dos estoques de GST ou com o aumento da produção de subprodutos que causam a inibição do biomarcador (COGO *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2015), ou então, pode estar interligada com a quantidade de GSH na região, uma vez que a GST possui o papel de catalizadora na conjugação de espécies reativas e GSH. Assim, se os níveis de GSH estiverem baixos, conseqüentemente os de GST estarão diminuídos também (ALMEIDA *et al.*, 2014). Ademais, essa queda na atividade da GST, pode ser vista também nas brânquias, nas mesmas faixas (mg/L), corroborando com a região do tronco e a literatura.

Na pós-exposição, a atividade enzimática da GST continua com uma elevação significativa ( $p < 0,001$  – método Dunnett's, teste paramétrico), possivelmente devido à um efeito residual.

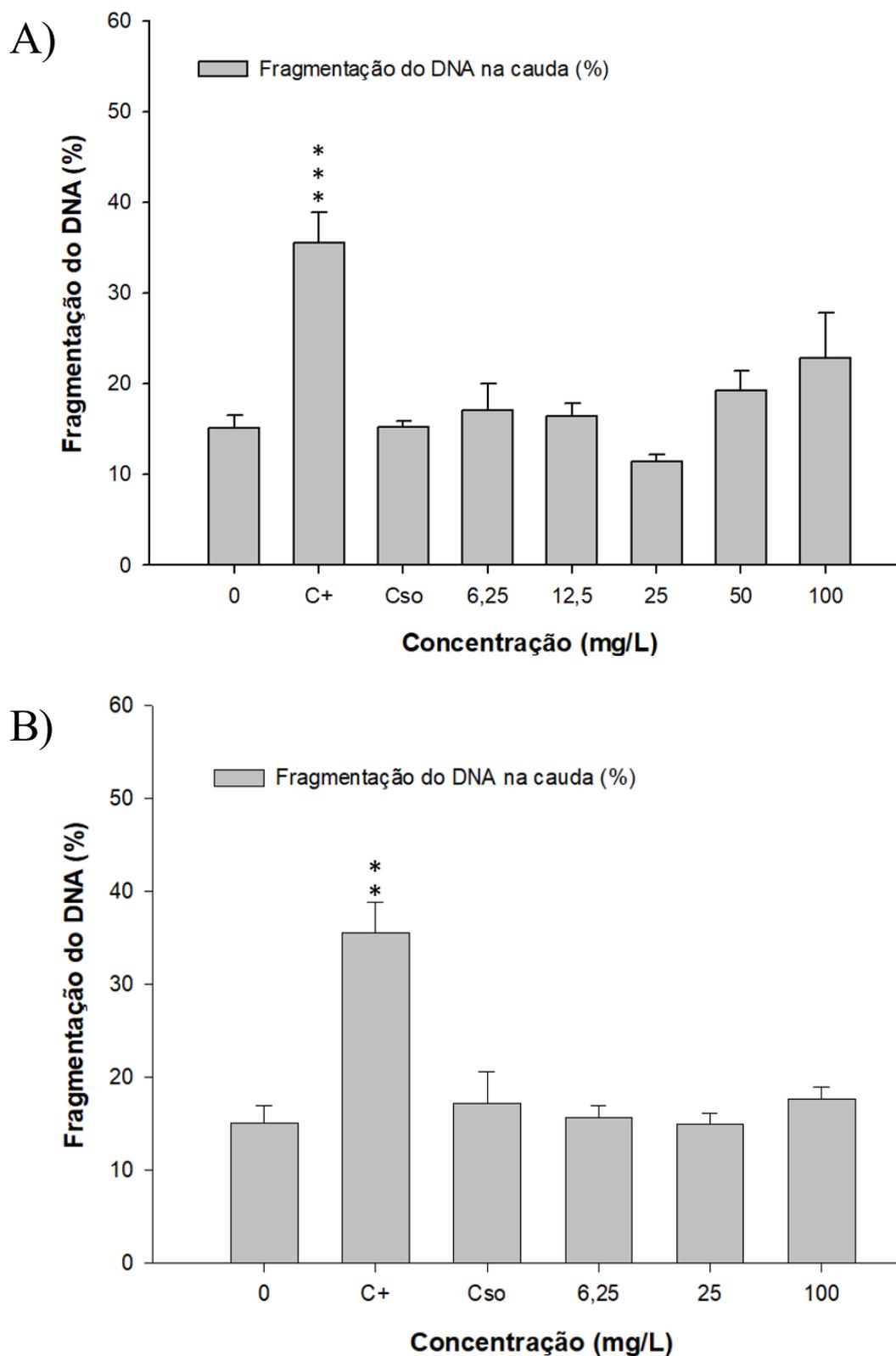
Por fim, como o biomarcador GST age no metabolismo de fase II, incentivando a interação entre a GSH e compostos formados por xenobióticos, para que sejam eliminadas do organismo (GLISIC *et al.*, 2015), o aumento observado de modo geral nos resultados da atividade da GST, pode-se denotar a reação do *D. rerio* à presença de espécies reativas oriundas da ArboS31, em ambas as regiões testadas (ORUC; SEVGILER; UNER, 2004; COGO *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2015).

### 6.2.2 Testes de genotoxicidade

O ensaio cometa é bastante utilizado para detectar danos reversíveis no DNA, como sítios alcali-lábeis e quebras de fita simples e dupla no DNA, e consequentemente, o mecanismo de reparo do organismo (SINGH *et al.*, 1988; COLLINS, 2004; CHANG *et al.*, 2017). Já o teste do MN é um teste amplamente usado para detectar quebras irreversíveis na cromatina, bem como perdas cromossômicas (erros de segregação) durante as mitoses, que seriam os efeitos clastogênicos e aneugênicos respectivamente (FENECH, 2000; FENECH *et al.* 2003; RAO *et al.*, 2008; VRAL *et al.*, 2011; UDROIU *et al.*, 2015; SADIQUL *et al.*, 2016). Então, com a combinação dos testes é possível identificar danos reversíveis e irreversíveis causados pelo contaminante ao material genético do organismo.

O dano ao DNA pode estar relacionado à diversos fatores, como radiação (ANBUMANI; MOHANKUMAR, 2012; FERNÁNDEZ-DÍEZ *et al.*, 2018) que ocasiona um dano direto na molécula do DNA, ou, a fatores que causam danos indiretos, através de mecanismos de bioativação (COHEN; ARNOLD, 2011; BARNES *et al.*, 2018), como estresse oxidativo, uma vez que o excesso de EROs no organismo modifica a membrana nuclear, desencadeando danos ao material genético (XU *et al.*, 2013). Contudo, como já foi dito anteriormente, a GST é uma enzima que participa desse processo de desintoxicação celular causada por xenobiótico (GLISIC *et al.*, 2015). Dessa forma, pode-se dizer que a ativação da GST durante a exposição e pós-exposição esteja relacionado com a baixa quantidade de fragmentação do DNA já que o organismo teve uma indução desse biomarcador, possivelmente, diminuindo a intoxicação da ArboS31, consequentemente, decaindo o dano causado pelos EROs ao material genético (**Figura 47**).

Ademais, apesar de não ter ocorrido uma diferença estatisticamente significativa no teste do cometa, o padrão da fragmentação correspondeu à resposta observada na atividade da GST. Assim, sugestionando que, com a diminuição da GST, nas últimas duas concentrações, houve um aumento dos EROs, desencadeando um dano ao material genético (**Figura 48**).



**Figura 48.** Ensaio cometa - fragmentação no DNA (%) em eritrócitos de peixes (*Danio rerio*) expostos a ArboS31 por 96 h. As figuras representam exposição (A) e pós-exposição (B). Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. 0 - controle negativo; C+ - controle positivo; Cso - controle DMSO; Os demais grupos foram expostos a 6,25, 25 e 100 mg/L do material-teste. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (0) foram observadas e estão representadas por asteriscos (\*), \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

O teste de micronúcleo e anormalidades nucleares em zebrafish adultos também não observou-se diferença significativa entre os grupos (**Tabela 6**). Esse resultado corrobora com os dados encontrados no ensaio cometa e resposta dos biomarcadores bioquímicos, mostrando que a ArboS31 não causa danos reversíveis e nem irreversíveis na cromatina, além de não alterar sua via metabólica de desintoxicação.

**Tabela 6.** Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares observadas em eritrócitos de sangue de peixes (*Danio rerio*) expostos a ArboS31 por 96 h.

Tratamento	Concentração (mg/L)	MN	BR	BN	BB	LB	NT	VC
Exposição	0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,5
	Cso	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,5	0	0,5 ± 0,7	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	6,25	0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,4	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,5	0
	12,5	0 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0	0,7 ± 0,8	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,3
	25	0 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,4	0,1 ± 0,3
	50	0	0	0 ± 0,1	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,6	0
	100	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0
Pós-exposição	0	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,4 ± 0,8
	Cso	0,2 ± 0,3	0	0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,5 ± 0,7
	6,25	0,1 ± 0,2	0 ± 0,1	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,7	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,3	0
	25	0 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,4	0,1 ± 0,3
	100	0,5 ± 0,7	0,4 ± 0,4	0	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0

Os dados representam a média ± desvio padrão de eritrócitos micronucleados (MN), com brotos (BR), binucleados (BN), “blebbed” (BB), “lobed” (LB), “notched” (NT) e “vacuolated” (VC). 0 - controle negativo; DMSO - controle DMSO; Os demais grupos foram expostos a 6,25, 25 e 100 mg/L do material-teste. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (0) não foram observadas,  $p > 0,05$ .

Estudos anteriores mostraram que diversos derivados das antraquinonas possuem atividade genotóxica (MÜLLER *et al.*, 1996; MÜLLER *et al.*, 1999) e mutagênica (MÜLLER *et al.*, 1996), atuando como intercalante do DNA com a topoisomerase (topo

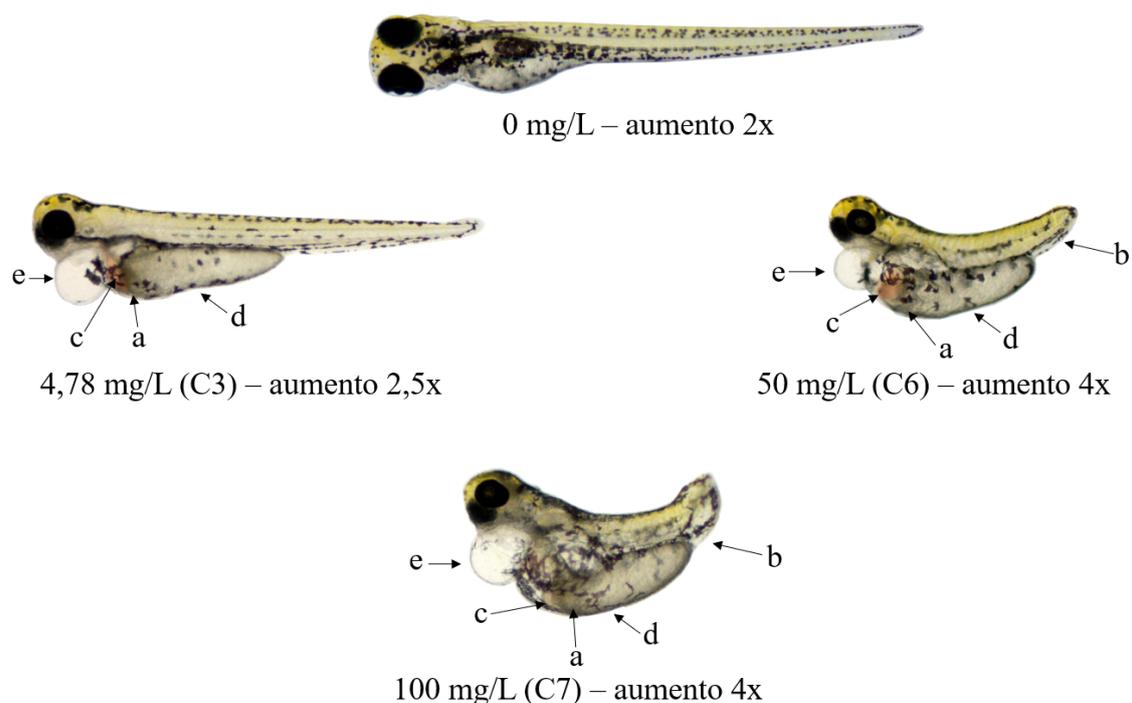
II), inibindo sua função catalítica (LIU, 1989; FROELICH-AMMON; OSHEROFF, 1995), podendo levar a quebra do DNA cromossômico (FERGUSON; BAGULEY, 1996). Tais fatores, em sua maioria, são desencadeados devido a produção de EROs (ZOU *et al.*, 2009), que está, principalmente, relacionada com a presença de hidroxilas (WESTENDORF *et al.*, 1990) e a quantidade desse grupo na molécula, até três há possível efeito mutagênico, acima disso ela fica destituída dessa atividade (TIKKANE; MATSUSHIMA, 1983). No entanto, a estrutura molecular da ArboS31 é desprovida de grupo hidroxilas, sugestionando a possibilidade de que a ausência desse grupo favoreça a manutenção do material genético, diminuindo a quantidade de EROs produzida pela antraquinona.

Portanto, a ArboS31 não tem potencial genotóxico ou mutagênico significativo ( $p > 0,05$ ) em zebrafish, associado às condições utilizadas no decorrer dos experimentos como duração da exposição, concentrações avaliadas e o organismo teste selecionado.

### 6.3 Possíveis efeitos hepatotóxicos

Com base nos resultados dos biomarcadores, do FET (*Fish Embryo Toxicity*) da ArboS31, e, na literatura, antraquinonas podem causar efeitos hepatotóxicos *in vivo* e *in vitro* (WU *et al.*, 2018; LIU; MAPA; SPRANDO, 2020) existe a possibilidade de a ArboS31 ser hepatotóxica. Contudo, há a necessidade da realização de novos testes bioquímicos de estresse oxidativo (CAT, SOD, ROS, GSH); testes com caspase-3; e testes histopatológicos do fígado.

O zebrafish (*Danio rerio*) por ser um peixe que possui transparência por várias horas pós-fertilização facilitando a observação visual *in vivo* de órgãos internos (WESTERFIELD, 2000). Assim, ao realizar o FET da ArboS31 foi possível observar alterações morfológicas indicativas de hepatotoxicidade (**Figura 49**), que condiziam com a literatura, como retardo e escurecimento do saco vitelínico, estase sanguínea na região do fígado e alterações no tamanho da larva, mesmo não sendo realizados testes morfométricos (HE *et al.*, 2013; JIA *et al.*, 2020).

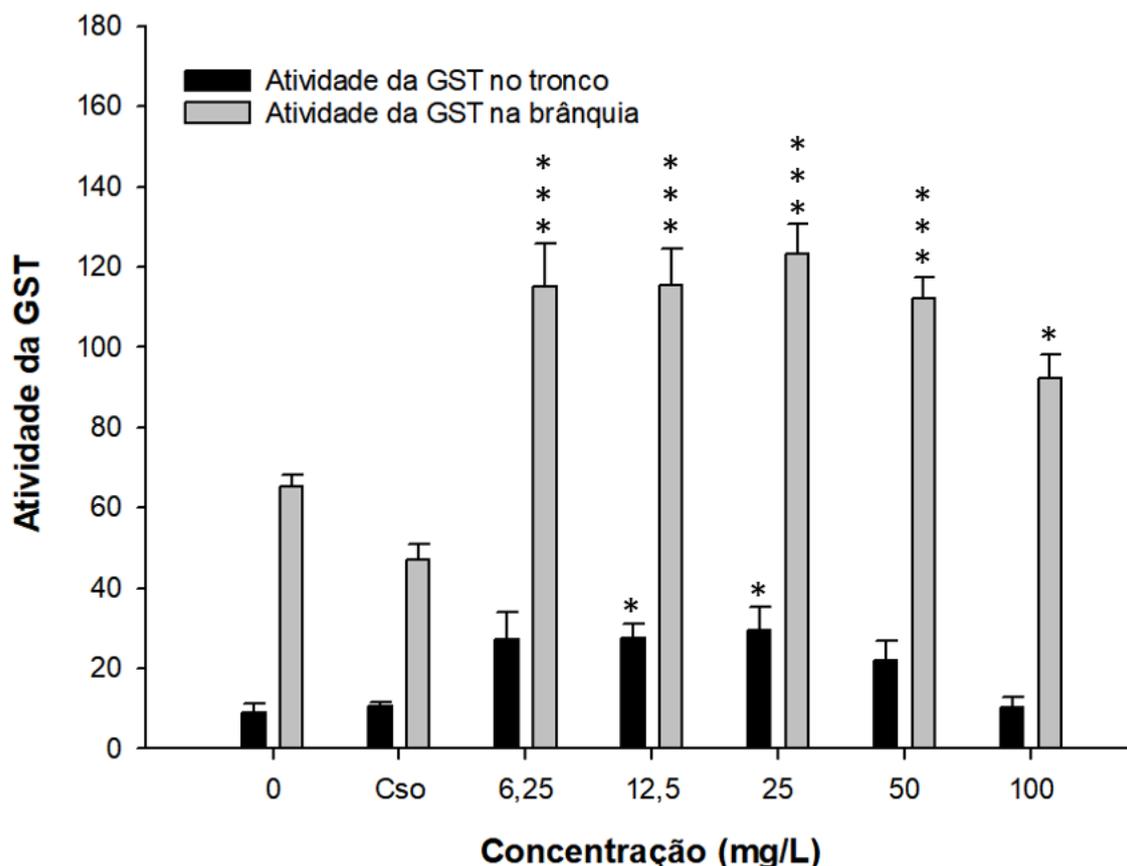


**Figura 49.** Organismos expostos por 96 h à ArboS31. Concentrações de 0 mg/L (controle negativo); 4,78 mg/L (C3); 50 mg/L (C6); e 100 mg/L (C7). a: escurecimento no saco vitelínico, região do fígado; b: alteração no tamanho da larva, apesar de não serem realizados testes morfométricos é possível visualizar; c: estase sanguínea; d: retardo no saco vitelínico; e: edema cardíaco.

A partir de 4,78 mg/L, em 96 hpf, já foi possível identificar indícios de hepatotoxicidade, com exceção da diminuição no tamanho, que se tornou evidente na concentração seguinte (10,46 mg/L). Assim, como visto na literatura, o escurecimento da região onde se localiza o fígado é uma evidência de que há uma degeneração local, possivelmente, no fígado (JIA *et al.*, 2020). Condição que pode gerar uma diminuição no tamanho do órgão, que conseqüentemente, afeta o metabolismo do organismo, prejudicando a absorção do saco vitelínico (características observadas), que é metabolizado pelo fígado (JONES *et al.*, 2008; HILL, 2011; HE *et al.*, 2013), sendo um indicativo confiável da função hepática na larva do zebrafish (HILL *et al.*, 2012).

Diversos estudos mostram que o zebrafish possui mecanismos contra xenobióticos similares aos mamíferos, incluindo vias metabólicas (GRANATO; NÜSSLEIN-VOLHARD, 1996; MCGRATH; LI, 2008; LI *et al.*, 2011; JIA *et al.*, 2020). Assim, como no estudo de Ibtissem *et al.* (2017), em ratos adultos, a quantidade de GSH pode ter tido uma pequena queda, que causou uma pequena diminuição na quantidade de GST, principalmente em 100 mg/L (**Figura 50**) (ALMEIDA *et al.*, 2014). A queda da GST

também foi ligada às disfunções no fígado, causadas presumidamente, por radicais livres, que geram modificações oxidativas no tecido hepático (TONI *et al.*, 2011; NI *et al.*, 2019).



**Figura 50.** Atividade da glutiona-S-transferase (GST) no tronco e na brânquia do adulto de *Danio Rerio* depois de 96 h de exposição à ArboS31. Resultados expressam a média dos valores  $\pm$  erro padrão. 0 - controle negativo; Cso - controle DMSO; Os demais grupos foram expostos a 6,25, 25 e 100 mg/L do material-teste. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (0) foram observadas e estão representadas por asteriscos (\*), \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Ademais, para corroborar com a hipótese de hepatotoxicidade, a atividade enzimática do LDH, em 100 mg/L, aumentou significativamente, indicando um possível aumento de gasto energético já correlacionada com essa patologia anteriormente na literatura (QIU *et al.*, 2019; JIA *et al.*, 2020). Danos ocasionados à membrana celular aceleram a atividade das enzimas hepáticas que participam do metabolismo energético, para que haja a renovação das células do tecido ou a remoção das células lesadas (ULLAH *et al.*, 2018). Com a pequena queda da GST, há a possibilidade de um aumento no estresse oxidativo, que também podem elevar os níveis de LDH no organismo de peixes (MOHAMED *et al.*, 2019).

A toxicidade das quinonas é explorada de diversas formas, principalmente como pesticida e anticancerígena. Através, principalmente, da produção de EROs e a alquilação de proteínas essenciais e ácidos nucleicos, que a citotoxicidade dessas moléculas é estudada, uma vez que tais reações causam danos celular, levando à apoptose, mecanismo utilizado primordialmente no contexto do câncer (ZOU *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2015).

A ação citotóxica das quinonas pode ocorrer de diversas formas aumentando o estresse oxidativo com a superprodução de EROs; inibindo a atividade enzimática; causando danos ao DNA, por exemplo (XAVIER, 2021). Em contraste, as quinonas podem causar citoproteção para o organismo também por meio da indução de enzimas de desintoxicação, modificando o estado redox e ação anti-inflamatória (BOLTON; DUNLAP, 2017). Os mecanismos utilizados pelas quinonas para gerar tais efeitos são extremamente complexos, sendo necessários estudos aprofundados para saber quais vias metabólicas estão sendo ativadas.

Dessa forma, com base na literatura e nos achados do presente estudo, sugere-se novos testes hepatológicos, com histopatologia do fígado e bioquímica com novos biomarcadores, principalmente, para que haja mais certeza da via metabólica de atuação da ArboS31, em organismos não-alvos.

Esse estudo caracterizou-se por uma avaliação ecotoxicológica de moléculas (quinonas), adquiridas comercialmente e por extração de uma planta do cerrado do planalto central brasileiro (*Connarus suberosus*), com o intuito de tornarem-se larvicidas para *Aedes aegypti*. Como o meio de dispersão será a água, foram realizados testes em zebrafish, como um organismo não-alvo, para se entender possíveis impactos ambientais sobre a biota aquática. Devido a origem das moléculas e as poucas pesquisas ecotoxicológicas sobre essas moléculas, uma discussão mais profunda e circunstanciada em outros estudos na literatura científica, ficou bastante limitada.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a classe das quinonas possuem grande potencial para larvicidas naturais, eficazes e ecoamigáveis. Testes em adultos, como foi realizado com a ArboS31, serão necessários para se conhecer com mais detalhes as propriedades dessas moléculas. Já que apenas foram realizados testes embriotóxicos, comprovando a baixa toxicidade em organismo não-alvo (*D. rerio*) comparada a CL<sub>50</sub> como larvicida. Sendo a ArboS97 e ArboS17 as exceções, pois se mostraram bastante tóxicas, e, a Arbo4A064E, pois a CL<sub>50 (96h)</sub> (11, 68 mg/L) encontrada em zebrafish foi menor que a CL<sub>50 (48h)</sub> (15,6 mg/L) determinada para *A. aegypti*.

Em relação aos testes realizados em adultos de zebrafish com a ArboS31, presume-se que está molécula não seja neurotóxica, já que não houve alteração na atividade da AChE; nem seja genotóxica ou mutagênica, pois não houve quaisquer alterações nesses dois testes (ensaio cometa e teste do MN e ANs, respectivamente). Ademais, apenas na concentração de 100 mg/L ocorreu alteração da lactato desidrogenase (LDH), possivelmente devido a um dano metabólico nessa concentração. E a glutathione-S-transferase (GST) teve atividade aumentada, respondendo a exposição à molécula, provavelmente, provocando uma resposta de desintoxicação, resultado que corroborou com a baixa fragmentação do DNA encontrada (teste do cometa).

Portanto, apesar de algumas alterações embriotóxicas e nos biomarcadores, nas concentrações sugeridas para larvicida, a ArboS31 aparenta ser segura para organismo não-alvo (*D. rerio*), sendo uma possível candidata para futuras formulações e testes mais específicos.

## REFERÊNCIAS

ABÍLIO, Ana Paula et al. Distribution and breeding sites of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in 32 urban/peri-urban districts of Mozambique: implication for assessing the risk of arbovirus outbreaks. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006692, 2018.

Agrofit. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) Acessado em 10 de julho de 2019.

ALMEIDA, Ângela et al. Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: effects on bivalves. **Aquatic toxicology**, v. 156, p. 74-87, 2014.

ALTÝNDAG, A. et al. The acute toxicity of lead nitrate on *Daphnia magna* Straus. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 23, 2008.

ANBUMANI, S.; MOHANKUMAR, Mary N. Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish *Catla catla*. **Aquatic toxicology**, v. 122, p. 125-132, 2012.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Biomarcadores do estresse oxidativo e determinantes da síndrome metabólica em adultos jovens saudáveis. 2010.

BARBOZA, Henriqueta Talita Guimarães et al. Compostos organofosforados e seu papel na agricultura. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 1, 2018.

BARNES, Jessica L. et al. Carcinogens and DNA damage. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 5, p. 1213-1224, 2018.

BASTOS, Cynthia Molina et al. O uso de larvicidas em água potável é seguro?. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 11, n. 38, p. 1-5, 2016.

BELDEN, Jason. Introduction to ecotoxicology. In: **An Introduction to Interdisciplinary Toxicology**. Academic Press, 2020. p. 381-393.

BELLINATO, Diogo Fernandes et al. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

BENELLI, Giovanni. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. **Parasitology research**, v. 114, n. 8, p. 2801-2805, 2015.

BENELLI, Giovanni; MEHLHORN, Heinz. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. **Parasitology research**, v. 115, n. 5, p. 1747-1754, 2016.

BERNARDINO, Murilo Martins et al. Comportamento e ecotoxicologia de pesticidas em solos do Cerrado, 2019.

BOHRER, M. B. C. Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do sistema de tratamento dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplanctônica. **São Carlos, UFSC, 470p (Master Thesis)**, 1995.

BOLTON, Judy L.; DUNLAP, Tareisha. Formation and biological targets of quinones: cytotoxic versus cytoprotective effects. **Chemical research in toxicology**, v. 30, n. 1, p. 13-37, 2017.

BONA, Ana C. Dalla et al. Genetic profile and molecular resistance of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) in Foz do Iguaçu (Brazil), at the border with Argentina and Paraguay. **Zoologia (Curitiba)**, v. 29, n. 6, p. 540-548, 2012.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAGA, Ima Aparecida et al. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. 2007.

BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação. In: VALLE, D. (Org.) **Dengue: Teorias e Práticas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p. 458, 2015.

BRETON, J.; NABEDRYK, E. Protein-quinone interactions in the bacterial photosynthetic reaction center: light-induced FTIR difference spectroscopy of the quinone vibrations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics**, v. 1275, n. 1-2, p. 84-90, 1996.

BROUGHTON, Richard E.; MILAM, Jami E.; ROE, Bruce A. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. **Genome research**, v. 11, n. 11, p. 1958-1967, 2001.

BUSATO, M. A.; VITORELLO, J.; LUTINSKI, J. A.; MAGRO, J. D.; SCAPINELLO, J. Potencial larvicida de *Melia azedarach* L. e *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. no controle de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Ciência e Natura**, v.37 n.2, 2015.

CANEDO, Aryelle; ROCHA, Thiago Lopes. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: historical review, current status and trends. **Science of The Total Environment**, p. 144084, 2020.

CARRASCO, Kenneth R.; TILBURY, Karen L.; MYERS, Mark S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990.

CARVALHO, Fernando P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48-60, 2017.

CARVALHO, Fabiano Duarte; MOREIRA, Luciano Andrade. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? **Neotropical entomology**, v. 46, n. 3, p. 243-255, 2017.

CAVALCANTI, Antonio Emanuel Holanda Dias et al. **Caracterização da resistência aos piretroides pelo mecanismo de penetração reduzida em populações de *Aedes aegypti* (diptera: culicidae), do Estado de Pernambuco.** 2017. Tese de Doutorado.

CHANG, Yung et al. Mercury (II) impairs nucleotide excision repair (NER) in zebrafish (*Danio rerio*) embryos by targeting primarily at the stage of DNA incision. **Aquatic Toxicology**, v. 192, p. 97-104, 2017.

CHEN, Vicky P. et al. Molecular assembly and biosynthesis of acetylcholinesterase in brain and muscle: the roles of t-peptide, FHB domain, and N-linked glycosylation. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 4, p. 36, 2011.

CHEN, Zhenzhong et al. The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 31, n. 8, p. 805-816, 2001.

CHENG, Sen-Sung et al. Larvicidal activity of tectoquinone isolated from red heartwood-type *Cryptomeria japonica* against two mosquito species. **Bioresource technology**, v. 99, n. 9, p. 3617-3622, 2008.

COHEN, Samuel M.; ARNOLD, Lora L. Chemical carcinogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. suppl\_1, p. S76-S92, 2011.

COLLINS, Andrew R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

COLOVIC, Mirjana B. et al. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, Elva I. et al. Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

COSTA, Carla Regina et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COUTINHO, Cláudia FB et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 15, 2005.

CUNHA, Marta Lacerda da. **Hereditariedade Epigenética Transgeracional**. 2019. Tese de Doutorado.

COGO, Antônio JD et al. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

DA SILVA, Daniel Clemente Vieira Rêgo; POMPÊO, Marcelo; DE PAIVA, Teresa Cristina Brazil. A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. **Ecologia de reservatórios e interfaces. Instituto de Biociência da USP, cap**, v. 22, 2015.

DA SILVA SANTOS, Niedja et al. Chronic effects of carbamazepine on zebrafish: Behavioral, reproductive and biochemical endpoints. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 164, p. 297-304, 2018.

DAR, Owias Iqbal et al. Biochemical markers for prolongation of the acute stress of triclosan in the early life stages of four food fishes. **Chemosphere**, v. 247, p. 125914, 2020.

DAVID, Mariana Rocha et al. Insecticide Resistance and Fitness: The Case of Four *Aedes aegypti* Populations from Different Brazilian Regions. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

DE ALMEIDA VIANA, Glautemberg; DE GOES SAMPAIO, Caroline; MARTINS, Victor Emanuel Pessoa. Produtos naturais de origem vegetal como ferramentas alternativas para o controle larvário de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 4, p. 449-462, 2018.

DE LAPUENTE, Joaquín et al. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 180, 2015.

DE OLIVEIRA, Reginaldo Carlyle Silva et al. Lethal and sub-lethal effects of nitrofurantoin on zebrafish early-life stages. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 2, p. 1-14, 2020.

DE SOUZA, Renata Mariane et al. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 135, p. 22-37, 2020.

DELIBERTO, Shelagh T.; WERNER, Scott J. Review of anthraquinone applications for pest management and agricultural crop protection. **Pest Management Science**, v. 72, n. 10, p. 1813-1825, 2016.

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 161-172, 1994.

DHAWAN, Alok; BAJPAYEE, Mahima; PARMAR, Devendra. The comet assay: a versatile tool for assessing DNA damage. In: **The comet assay in toxicology**. 2009. p. 3-52.

DIBWE, Dya Fita et al. Damnacanthal from the Congolese Medicinal Plant *Garcinia huillensis* has a Potent Preferential Cytotoxicity against Human Pancreatic Cancer PANC-1 Cells. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 12, p. 1920-1926, 2012.

DIAMANTINO, Teresa C. et al. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. **Chemosphere**, v. 45, n. 4-5, p. 553-560, 2001.

DIAS, Gleiston G. et al. Quinone-based fluorophores for imaging biological processes. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 1, p. 12-27, 2018.

DING, Guodong et al. Prenatal exposure to pyrethroid insecticides and birth outcomes in Rural Northern China. **Journal of exposure science & environmental epidemiology**, v. 25, n. 3, p. 264-270, 2015.

DO AMARAL, Aline Monique Blank et al. Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir. **Chemosphere**, v. 191, p. 876-885, 2018.

DOS SANTOS SILVA, Josielma et al. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Revista bioética**, v. 23, n. 2, p. 409-418, 2015.

DOOLEY, Kimberly; ZON, Leonard I. Zebrafish: a model system for the study of human disease. **Current opinion in genetics & development**, v. 10, n. 3, p. 252-256, 2000.

DUDGEON, David. Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. **Current Biology**, v. 29, n. 19, p. R960-R967, 2019.

ELLMAN, George L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

EL-MAGHRABEY, Mahmoud et al. Design of a dual functionalized chemiluminescence ultrasensitive probe for quinones based on their redox cycle. Application to the determination of doxorubicin in lyophilized powder and human serum. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 329, p. 129226, 2021.

EL-NAJJAR, Nahed et al. The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 353, 2011.

ERGENE, Serap et al. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 48, n. 6, p. 421-429, 2007.

FAIRBAIRN, Daryl W.; OLIVE, Peggy L.; O'NEILL, Kim L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

FALKOWSKI, Michaël et al. Towards the optimization of botanical insecticides research: *Aedes aegypti* larvicidal natural products in French Guiana. **Acta tropica**, v. 201, p. 105179, 2020.

FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FENECH, Michael et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003.

FERGUSON, Lynnette R.; BAGULEY, Bruce C. Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 355, n. 1-2, p. 91-101, 1996.

FERNÁNDEZ-DÍEZ, Cristina et al. Tolerance to paternal genotoxic damage promotes survival during embryo development in zebrafish (*Danio rerio*). **Biology open**, v. 7, n. 5, 2018.

FERREIRA, João Victor Rego et al. Pesticidas aplicados na lavoura e o risco à saúde pública: uma revisão da literatura. **Cadernos UniFOA**, v. 9, n. 24, p. 87-103, 2014.

FERREIRA, S. G. et al. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. **Journal of colloid and interface science**, v. 456, p. 190-196, 2015.

FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice**. Springer Science & Business Media, 1994.

FRASCO, M. F.; GUILHERMINO, L. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 149-156, 2002.

FREIRE, Ingrid De Souza. Avaliação da genotoxicidade, citotoxicidade e da Hematotoxicidade do complexo esporo-cristal de Estirpes recombinantes de *Bacillus thuringiensis* em organismos não-alvo. 2012. 112 f., il. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

FRENZILLI, Giada; NIGRO, Marco; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 681, n. 1, p. 80-92, 2009.

FROELICH-AMMON, Stacie J.; OSHEROFF, Neil. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 37, p. 21429-21432, 1995.

GAO, Minling et al. Oxidative stress and DNA damage in zebrafish liver due to hydroxyapatite nanoparticles-loaded cadmium. **Chemosphere**, v. 202, p. 498-505, 2018.

GARCEZ, Walmir Silva et al. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GEISSEN, Violette et al. Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57-65, 2015.

GHERARDI-GOLDSTEIN, Elenita et al. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. In: **CETESB série manuais**. CETESB, 1990.

GILLIS, Patricia L. Cumulative impacts of urban runoff and municipal wastewater effluents on wild freshwater mussels (*Lasmigona costata*). **Science of the Total Environment**, v. 431, p. 348-356, 2012.

GLISIC, Branka et al. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic toxicology**, v. 158, p. 50-62, 2015.

GONCA, A. L. A. K.; ARZU, U. C. A. R. Effects of Iron Chloride/Zeolite on GST of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)'s Kidney Tissue. **European Journal of Sustainable Development Research**, v. 2, n. 1, p. 66-69, 2017.

GRANATO, Michael; NÜSSLEIN-VOLHARD, Christiane. Fishing for genes controlling development. **Current opinion in genetics & development**, v. 6, n. 4, p. 461-468, 1996.

GRANEY, Robert L. **Aquatic mesocosm studies in ecological risk assessment**. CRC Press, 1993.

GRANT, David F.; HAMMOCK, Bruce D. Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in

*Aedes aegypti*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 234, n. 2, p. 169-176, 1992.

GUARDA, Carin et al. Atividade larvívica de produtos naturais e avaliação da susceptibilidade ao insetívica Temefós no controle do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Interciencia**, v. 41, n. 4, p. 243-247, 2016.

GUILHERMINO, L. et al. Acetylcholinesterase activity in juveniles of *Daphnia magna* Straus. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 57, n. 6, p. 979-985, 1996.

GUILIO RICHARD, T.; HINTON, David E. The toxicology of Fishes. CRC Press. 2008. HABIG, William H.; JAKOBY, William B. Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1981. p. 398-405.

HÄDER, Donat-P. et al. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. **Science of the Total environment**, v. 713, p. 136586, 2020.

HALFELD-VIEIRA, B. de A. et al. Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente-Livro científico (ALICE)**, 2016.

HART, Barry T. et al. A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. **Hydrobiologia**, v. 210, n. 1-2, p. 105-144, 1991.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HE, Jian-Hui et al. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 67, n. 1, p. 25-32, 2013.

HE, Jian-Hui et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicology and teratology**, v. 42, p. 35-42, 2014.

HE, Qiuxia *et al.* Toxicity induced by emodin on zebrafish embryos. **Drug and chemical toxicology**, v. 35, n. 2, p. 149-154, 2012.

HE, Shuaibing et al. Herb-induced liver injury: Phylogenetic relationship, structure-toxicity relationship, and herb-ingredient network analysis. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 15, p. 3633, 2019.

HERRÁEZ, María Paz et al. Paternal contribution to development: sperm genetic damage and repair in fish. **Aquaculture**, v. 472, p. 45-59, 2017.

HIGGS, Stephen; VANLANDINGHAM, Dana. Chikungunya virus and its mosquito vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 231-240, 2015.

HILL, Adrian. Hepatotoxicity testing in larval zebrafish. **Zebrafish: Methods for Assessing Drug Safety and Toxicity**, p. 89-102, 2011.

HILL, Adrian et al. Comparisons between in vitro whole cell imaging and in vivo zebrafish-based approaches for identifying potential human hepatotoxicants earlier in pharmaceutical development. **Drug metabolism reviews**, v. 44, n. 1, p. 127-140, 2012.

HOFFELDER, Diane R. et al. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. **Chromosoma**, v. 112, n. 8, p. 389-397, 2004.

HÖFTE, Herman; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

HOLT, M. S. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. **Food and chemical toxicology**, v. 38, p. S21-S27, 2000.

HOWE, Kerstin et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498, 2013.

HSU, Ju-Chun et al. Alterations of the acetylcholinesterase enzyme in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* are correlated with resistance to the organophosphate insecticide fenitrothion. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 146-154, 2008.

HUSSAIN, Riaz et al. Cellular and biochemical effects induced by atrazine on blood of male Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 103, n. 1, p. 38-42, 2012.

IBAMA. Relatórios de comercialização de Agrotóxicos – Boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-deagrotoxicos#boletinsanuais>. Acessado em 10 de julho de 2019.

IBTISSEM, Ben Amara et al. Oxidative stress and histopathological changes induced by methylthiophanate, a systemic fungicide, in blood, liver and kidney of adult rats. **African health sciences**, v. 17, n. 1, p. 154-163, 2017.

JANKOWSKA, M.; LAPIED, B.; JANKOWSKI, W.; STANKIEWICZ, M. The unusual action of essential oil component, menthol, in potentiating the effect of the carbamate insecticide, bendiocarb. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 158, p. 101–111, 2019.

JIA, Kun et al. Thiophanate-methyl induces severe hepatotoxicity in zebrafish. **Chemosphere**, v. 248, p. 125941, 2020.

JONES, Kevin S. et al. A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. **Nutrition & metabolism**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2008.

KENDALL, Ronald J. et al. Ecotoxicology. **USDA National Wildlife Research Center-Staff Publications**, p. 516, 2001.

KIM, Soon-II; AHN, Young-Joon. Larvicidal activity of lignans and alkaloid identified in *Zanthoxylum piperitum* bark toward insecticide-susceptible and wild *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.

KIMMEL, Charles B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KIRSCH-VOLDERS, Micheline et al. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1-2, p. 137-148, 2002.

KREUZ, Sarah; FISCHLE, Wolfgang. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. **Epigenomics**, v. 8, n. 6, p. 843-862, 2016.

KRYSTON, Thomas B. et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1-2, p. 193-201, 2011.

LAMMER, E. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196-209, 2009.

LERECLUS, D. Génétique et biologie moléculaire de *Bacillus thuringiensis*. Bulletin de l'Institut Pasteur, Paris, v.86, p.337- 371, 1988.

LI, Chunqi et al. Methods for assessing neurotoxicity in zebrafish. **Zebrafish: methods for assessing drug safety and toxicity**, p. 117-134, 2011.

LIONETTO, Maria Giulia et al. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

LIU, Leroy F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. **Annual review of biochemistry**, v. 58, n. 1, p. 351-375, 1989.

LIU, Yitong; MAPA, Mapa ST; SPRANDO, Robert L. Liver toxicity of anthraquinones: A combined in vitro cytotoxicity and in silico reverse dosimetry evaluation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 140, p. 111313, 2020.

LUTINSKI, J. A. et al. Infestação pelo mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na cidade de Chapecó-SC. **Biotemas**, Florianópolis, v. 26, n. 2, p. 143-15, 2013.

MAES, Jan et al. Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e43850, 2012.

MAGALHÃES, Danielly de Paiva et al. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. 2008.

MARINHO, Claudiane S. et al. Characterization and kinetic study of the brain and muscle acetylcholinesterase from *Danio rerio*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 222, p. 11-18, 2019.

MCGRATH, Patricia; LI, Chun-Qi. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug discovery today**, v. 13, n. 9-10, p. 394-401, 2008.

MENDES, Benilde Simões; SANTOS, JF Oliveira. **Qualidade da água para consumo humano**. Lidel, 2004.

MEYERS, Jason R. Zebrafish: development of a vertebrate model organism. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 16, n. 1, p. e19, 2018.

MIHALJEVIĆ, Ivan et al. Interaction of organotin compounds with three major glutathione S-transferases in zebrafish. **Toxicology in Vitro**, v. 62, p. 104713, 2020.

MIONE, Marina C.; TREDE, Nikolaus S. The zebrafish as a model for cancer. **Disease models & mechanisms**, v. 3, n. 9-10, p. 517-523, 2010.

MOHAMED, Wafaa AM et al. Palliative effects of zinc sulfate against the immunosuppressive, hepato-and nephrotoxic impacts of nonylphenol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 504, p. 227-238, 2019.

MONKS, Terrence J. et al. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 112, n. 1, p. 2-16, 1992.

MONTELLA, Isabela Reis et al. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.

MOYES, Catherine L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005625, 2017.

MÜLLER, Stefan O. et al. Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloemodin and danthron in mammalian cells: topoisomerase II mediated?. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 371, n. 3-4, p. 165-173, 1996.

MÜLLER, Stefan O. et al. Occurrence of emodin, chrysophanol and physcion in vegetables, herbs and liquors. Genotoxicity and anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants. **Food and chemical toxicology**, v. 37, n. 5, p. 481-491, 1999.

MUTHULAKSHMI, Sellamani et al. Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. **Chemosphere**, v. 198, p. 111-121, 2018.

NEVES, Iizenayde de A. et al. Composition and Larvicidal Activity of Essential Oil of *Eugenia candolleana* DC.(MYRTACEAE) against *Aedes aegypti*. **Revis Virtual Quim**, v. 6, p. 2305-2315, 2017.

NI, Han et al. Effects of maduramicin on adult zebrafish (*Danio rerio*): Acute toxicity, tissue damage and oxidative stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 168, p. 249-259, 2019.

NITA, Małgorzata; GRZYBOWSKI, Andrzej. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

NORDBORG, Maria et al. Freshwater ecotoxicity impacts from pesticide use in animal and vegetable foods produced in Sweden. **Science of the Total Environment**, v. 581, p. 448-459, 2017.

OECD, 2013. Test No. 236: Fis horas Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, **OECD Publishing**. doi:10.1787/9789264203709-en

OECD, Test Guideline No. 203. Fish, Acute Toxicity Testing. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, p. 23, 2019.

OLIVEIRA, R. L de. Biologia e Comportamento do Vetor. In: VALLE, D. (Org.) **Dengue: Teorias e Práticas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. P. 458, 2015.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test**. OECD Publishing, 2016.

ORUC, E. Ozcan; SEVGILER, Y.; UNER, Nl. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2, 4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 137, n. 1, p. 43-51, 2004.

OSMAN, Alaa GM et al. Effects of lead nitrate on the activity of metabolic enzymes during early developmental stages of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 1-13, 2007.

PALMA, Patrícia et al. Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 74, n. 5, p. 676-681, 2009.

PEI, De-Sheng; STRAUSS, Phyllis R. Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 743, p. 151-159, 2013.

PEREIRA, Aryelle Canedo et al. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: From morphological to molecular approach. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1841-1853, 2019.

PEREIRA, W. L. et al. Ação antiproliferativa do flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea L.*) contra a linhagem de célula H460. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 4, p. 798-806, 2015.

PÉREZ-PARADA, Andrés et al. Recent advances and open questions around pesticide dynamics and effects on freshwater fishes. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 4, p. 38-44, 2018.

PFEIFER, Simone; SCHIEDEK, Doris; DIPPNER, Joachim W. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 320, n. 1, p. 93-103, 2005.

PIZZINO, Gabriele et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

PLAHUTA, Maja et al. Toxic and endocrine disrupting effects of wastewater treatment plant influents and effluents on a freshwater isopod *Asellus aquaticus* (Isopoda, Crustacea). **Chemosphere**, v. 174, p. 342-353, 2017.

PORTO, KARLA R. et al. Screening of plant extracts and fractions on *Aedes aegypti* larvae found in the state of Mato Grosso do Sul (Linnaeus, 1762) (Culicidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p. 895-906, 2017.

PRETTO, Alexandra et al. Commercial formulation containing quinclorac and metsulfuron-methyl herbicides inhibit acetylcholinesterase and induce biochemical alterations in tissues of *Leporinus obtusidens*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 3, p. 336-341, 2011.

QIU, Lingyu et al. Hepatotoxicity of tricyclazole in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 232, p. 171-179, 2019.

QUEIROZ, Lucas Gonçalves; SILVA, Daniel CVR. Mesocosmos como modelo experimental na avaliação da ecotoxicidade aquática. **RECURSO ÁGUA**, p. 35.

RAI, Prashant et al. Streptococcus pneumoniae secretes hydrogen peroxide leading to DNA damage and apoptosis in lung cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 26, p. E3421-E3430, 2015.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**; Rand, G. M., ed.; 2<sup>nd</sup> ed., Taylor & Francis: Washington, 1995, cap. 1.

RAO, Xiaotang et al. Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa cells: direct evidence from long-term live cell imaging. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 646, n. 1-2, p. 41-49, 2008.

RAMESH, Mathan et al. Organophosphorus flame retardant induced hepatotoxicity and brain AChE inhibition on zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology**, v. 82, p. 106919, 2020.

RASMUSSEN, Jes J. et al. The legacy of pesticide pollution: an overlooked factor in current risk assessments of freshwater systems. **Water Research**, v. 84, p. 25-32, 2015.

RIBO, Juan M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, v. 12, n. 4, p. 283-294, 1997.

RICO, Eduardo Pacheco. Influência do metanol e do etanol sobre a atividade e a expressão gênica das ectonucleotidases e acetilcolinestrases em cérebro de zebrafish (*Danio rerio*). 2007.

ROMBOUGH, Peter. Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O<sub>2</sub> uptake in developing zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 12, p. 1787-1794, 2002.

RUZICKA, Leyla et al. The Zebrafish Information Network: new support for non-coding genes, richer Gene Ontology annotations and the Alliance of Genome Resources. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D867-D873, 2019.

SADIQUL, Islam M. et al. Acute exposure to a quinalphos containing insecticide (convoy) causes genetic damage and nuclear changes in peripheral erythrocytes of silver barb, *Barbonymus gonionotus*. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 949-956, 2016.

SÁNCHEZ-BAIN, Andrés et al. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. 2004.

SANTA CATARINA. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle do *Aedes aegypti*. Orientações Técnicas para Pessoal de Campo, 2018.

SANTISTEBAN, Angélica María Jiménez. **Caracterização do ácido húmico extraído de vermicomposto e estudo de adsorção/dessorção deste e outras matrizes com o herbicida atrazina**. 1999. Tese de Doutorado.

SAOUDI, Abdessattar et al. Serum levels of organochlorine pesticides in the French adult population: the French National Nutrition and Health Study (ENNS), 2006–2007. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 1089- 1099, 2014.

SARAVANAN, Manoharan et al. Ecotoxicological impacts of clofibric acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. **Journal of hazardous materials**, v. 195, p. 188-194, 2011.

SCHLENK, Daniel et al. Biotransformation in fishes. **The toxicology of fishes**, p. 153-234, 2008.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: **Chemical mutagens**. Springer, Boston, MA, 1976. p. 31-53.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 26 de 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/15/af-informe-arboviroses-se26-11jul19.pdf> Acessado em: 20 de julho de 2019.

SEITBAYEV, K. Zh; YESSIMSITTOVA, Z.; BAZARBAYEVA, M. Zh. Histological study of the gills and gastrointestinal organs of the fishes, inhabiting the lake Bilikol. **World Applied Sciences Journal**, v. 25, n. 7, p. 1053-1056, 2013.

SILVA, Raquel L. et al. Residual larvicidal activity of quinones against *Aedes aegypti*. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3978, 2020.

SILVA, S.R. Quantificação de substâncias com atividade estrogênica e caracterização da toxicidade embrionarval em zebrafish (*Danio rerio*) nos efluentes das Estações de tratamento de esgotos Sul e Norte e no Lago Paranoá, Brasília-DF. 2015.

SILVÉRIO, Maíra Rosato Silveiral et al. Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: The main vector of important arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3484, 2020.

SINGH, Narendra P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SOARES-DA-SILVA, J. et al. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and 335 screening. **Revista Brasileira de Entomologia**. v.5, n.1, 2015.

SOARES, Alexandra Fátima Saraiva; SOUZA, Luís Paulo Souza. Contaminação das águas de abastecimento público por poluentes emergentes e o direito à saúde. **Revista De Direito Sanitário**, v. 20, n. 2, p. 100-133, 2020.

SOLOMON, Leera; DAMINABO, Victoria; UZOR, Chinedu Azubuike. A synoptic review on ecological toxicology and environmental sustainability. **Researcher**, v. 8, n. 12, p. 6-10, 2016.

SPRAGUE, Judy et al. The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 1, p. 87-90, 2001.

STEENBERGEN, Peter J.; RICHARDSON, Michael K.; CHAMPAGNE, Danielle L. The use of the zebrafish model in stress research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1432-1451, 2011.

STENERSEN, Jorgen. **Chemical pesticides mode of action and toxicology**. CRC press, 2004.

STRODE, Clare et al. Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector, *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e39439, 2012.

SULUKAN, Ekrem et al. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 77-85, 2017.

TAHER, M.; CUTKOMP, L. K. Effects of sublethals of DDT and three other insecticides on *Tribolium confusum* J. DU V.(Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 19, n. 1, p. 43-50, 1983.

TANAKA, T. et al. Colitis-related rat colon carcinogenesis induced by 1-hydroxy-anthraquinone and methylazoxymethanol acetate. **Oncology reports**, v. 7, n. 3, p. 501-509, 2000.

TERRA, M. R. et al. *Aedes aegypti* e as arboviroses emergentes no Brasil. **Revista UNINGÁ**. V. 30, n.3, p. 52- 60, 2017.

TIKKANEN, Leena; MATSUSHIMA, Taijiro; NATORI, Shinsaku. Mutagenicity of anthraquinones in the Salmonella preincubation test. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 116, n. 3-4, p. 297-304, 1983.

TONI, Cândida et al. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. **Chemosphere**, v. 83, n. 4, p. 579-584, 2011.

TRIGUEIRO, Nicholas Silvestre de Souza et al. Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research in Brazil. **Zebrafish**, v. 17, n. 6, p. 412-425, 2020.

TRUHAUT, René. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 1, n. 2, p. 151-173, 1977.

UDROIU, I. et al. Micronucleus test on *T. riturus carnifex* as a tool for environmental biomonitoring. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 56, n. 4, p. 412-417, 2015.

ULLAH, Sana et al. Malathion induced oxidative stress leads to histopathological and biochemical toxicity in the liver of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton) at acute concentration. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 161, p. 270-280, 2018.

VALLE, Denise; BELINATO, Thiago Affonso; MARTINS, A. J. Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. **Dengue: teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 93-126, 2015.

VASCOTTO, Sandy G.; BECKHAM, Y.; KELLY, Gregory M. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. **Biochemistry and cell biology**, v. 75, n. 5, p. 479-485, 1997.

VASSAULT, A. Lactate dehydrogenase. *Methods of enzymatic analysis, enzymes: oxireductases, transferase*. 1983.

VIEIRA, André A. et al. Hybrid compounds with two redox centres: modular synthesis of chalcogen-containing lapachones and studies on their antitumor activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 101, p. 254-265, 2015.

VILCHES, Melissa. Análise genotóxica do Rio Cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores. **Novo Hamburgo: Centro universitário Feevale**, 2009.

VRAL, Anne; FENECH, Michael; THIERENS, Hubert. The micronucleus assay as a biological dosimeter of *in vivo* ionising radiation exposure. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 11-17, 2011.

WALKER, Colin Harold et al. **Principles of ecotoxicology**. CRC press, 2012.

WARE, George W.; WHITACRE, David M. An introduction to insecticides. **The Pesticide Book**. Willoughby, Ohio: Meister Pub, 2004.

WESTENDORF, Johannes et al. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 240, n. 1, p. 1-12, 1990.

WESTERFIELD, Monte. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish. [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/zfbk.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html), 2000.

WITESKA, Malgorzata et al. The effects of cadmium and copper on embryonic and larval development of the *Leuciscus idus* L. **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 151-163, 2014.

WU, Lili et al. Gender differences in the hepatotoxicity and toxicokinetics of emodin: the potential mechanisms mediated by UGT2B7 and MRP2. **Molecular pharmaceutics**, v. 15, n. 9, p. 3931-3945, 2018.

XAVIER, André Felipe de Almeida et al. Análise eletroquímica de quinonas bioativas: o caso das selenoquinonas. 2021.

XU, Hai et al. Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in zebrafish embryos. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 93, p. 39-44, 2013.

YAN, Saihong et al. Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 122, p. 54-60, 2015.

YANG, Young-Cheol; LIM, Mi-Youn; LEE, Hoi-Seon. Emodin isolated from *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) seed shows larvicidal activity against three mosquito species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7629-7631, 2003.

YANG, Heng et al. Urban closed lakes: Nutrient sources, assimilative capacity and pollutant reduction under different precipitation frequencies. **Science of The Total Environment**, v. 700, p. 134531, 2020.

YEN, Jerry et al. Differential acetylcholinesterase inhibition of chlorpyrifos, diazinon and parathion in larval zebrafish. **Neurotoxicology and teratology**, v. 33, n. 6, p. 735-741, 2011.

ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

ŽEGURA, Bojana; FILIPIČ, Metka. The application of the Comet assay in fish cell lines. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, p. 72-84, 2019.

ZHANG, Bin et al. Performance and enzyme activity of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) under various nutritional conditions. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 5, p. 737-746, 2011.

ZHANG, Jinghua et al. Combined effects of polyethylene and organic contaminant on zebrafish (*Danio rerio*): Accumulation of 9-Nitroanthracene, biomarkers and intestinal microbiota. **Environmental Pollution**, v. 277, p. 116767, 2021.

ZHANG, WenJun. Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1, 2018.

ZOU, Jiajie et al. Olaquinox-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in human hepatoma G2 (HepG2) cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 676, n. 1-2, p. 27-33, 2009.

## ANEXOS

### 4.1. ANEXO A – Declaração do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

  
**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 13 de novembro de 2019.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "**USO DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE EFEITOS DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL LARVICIDA PARA *Aedes aegypti***", Protocolo n.º 113/2019, sob responsabilidade do Professor Cesar Koppe Grisolia, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Danio rerio* (8.640 embriões, 360 juvenis e 120 adultos). A presente declaração é válida pelo período de:

15/12/2019 a 15/12/2021.



Dr. José Luiz Jívago de Paula Rôlo  
Coordenador da CEUA – UnB





\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

## 4.2. ANEXO B – Artigos publicados ao longo do mestrado, através de colaborações e parceiras com outros pesquisadores em outros laboratórios.

 **NEGLECTED TROPICAL DISEASES**

RESEARCH ARTICLE

### Prolonged mosquitocidal activity of *Siparuna guianensis* essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles

Taciano P. Ferreira<sup>1</sup>, Khalid Haddi<sup>2\*</sup>, Roberto F. T. Corrêa<sup>3</sup>, Viviana L. B. Zapata<sup>2</sup>, Tathyana B. Piau<sup>4</sup>, Luis F. N. Souza<sup>5†</sup>, Swel-Marks G. Santos<sup>5†</sup>, Eugenio E. Oliveira<sup>6</sup>, Luis O. V. Jumbo<sup>2</sup>, Bergmann M. Ribeiro<sup>3</sup>, Cesar K. Grisolia<sup>4</sup>, Rodrigo R. Fidelis<sup>6</sup>, Ana M. S. Maia<sup>5\*\*</sup>, Raimundo W. S. Aguiar<sup>5</sup>

**1** Departamento de Química Ambiental, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, Tocantins, Brazil, **2** Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, **3** Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil, **4** Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil, **5** Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, Tocantins, Brazil, **6** Departamento de Produção Vegetal, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, Tocantins, Brazil

\* These authors contributed equally to this work.  
 † Current address: Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.  
 ‡ LFNS and SMGS also contributed equally to this work.  
 \* [anamaila@uft.edu.br](mailto:anamaila@uft.edu.br)

 Check for updates

**OPEN ACCESS**

**Citation:** P. Ferreira T, Haddi K, F. T. Corrêa R, Zapata VLB, Piau TB, Souza LFN, et al. (2019) Prolonged mosquitocidal activity of *Siparuna guianensis* essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles. PLoS Negl Trop Dis 13(8): e0007624. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007624>

**Editor:** Pattamaporn Kittayapong, Faculty of Science, Mahidol University, THAILAND

**Received:** August 10, 2018

**Accepted:** July 10, 2019

**Published:** August 9, 2019

**Copyright:** © 2019 P. Ferreira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** This investigation was supported by National Council of Scientific and Technological Development – CNPq CHAMADA PÚBLICA MCTI/CNPQ/CAPES/FAPS Nº 16/2014 - PROGRAMA INCT ([www.cnpq.br](http://www.cnpq.br)) and State Tocantins Foundation for Research FAPT/TO - IIº Processo – 2014203000034 (<http://uedon.to.gov.br/>)

### Abstract

#### Background

The use of synthetic insecticides is one of the most common strategies for controlling disease vectors such as mosquitos. However, their overuse can result in serious risks to human health, to the environment, as well as to the selection of insecticidal resistant insect strains. The development of efficient and eco-friendly insect control is urgent, and essential oils have been presented as potential alternatives to synthetic insecticides. Moreover, nanoencapsulation techniques can enhance their efficiency by protecting from degradation and providing a controlled release rate.

#### Results

We assessed the potential of chitosan nanoparticles in encapsulating *Siparuna guianensis* essential oil, and maintaining its efficiency and prolonging its activity for the control of *Aedes aegypti* larvae. The encapsulation was characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and thermogravimetric analysis (TGA), with an encapsulation efficiency ranging from 84.8% to 88.0%. Toxicity studies have demonstrated efficacy against mosquito larvae over 50% for 19 days with 100% mortality during the first week. This persistent action is presumably due to the enhanced contact and slow and maintained release conferred by chitosan nanoparticles. Furthermore, the

PLOS Neglected Tropical Diseases | <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007624> August 9, 2019 1 / 23



## Buccal micronucleus cytome assay: Inter-laboratory scoring exercise and micronucleus and nuclear abnormalities frequencies in different populations from Brazil



Paula Rohr<sup>a,\*</sup>, Gabrieli Flesch da Silva<sup>a</sup>, Veronica Elisa Pimenta Vicentini<sup>b</sup>,  
Igor Vivian de Almeida<sup>b</sup>, Raquel Alves dos Santos<sup>c</sup>, Catarina Satté Takahashi<sup>d,e</sup>,  
Mirtan Oliveira Goulart<sup>c</sup>, Glenda Nicotoli da Silva<sup>f</sup>, Luiza Barbosa de Oliveira<sup>f</sup>, Cesar K. Grisolia<sup>g</sup>,  
Tathyana B. Piou<sup>h</sup>, Carmen Lucia Bassi Branco<sup>b</sup>, Érica de Melo Reis<sup>b</sup>,  
Marcos Felipe de Oliveira Galvão<sup>i</sup>, Sílvia R. Battistuzzo de Medeiros<sup>j</sup>, Magaly Sales Montenegro<sup>k</sup>,  
Reynaldo Assis de Vasconcelos Lopes<sup>l</sup>, Sabrina Fuziger Inácio Brandão<sup>l</sup>,  
Nelson Jorge Carvalho Batista<sup>k</sup>, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz<sup>l</sup>, Juliana da Silva<sup>a,m,n,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Genética Toxicológica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaúde), Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental, Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, PR, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Universidade de Franca, UNIFRAN, Franca, SP, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>f</sup> Laboratório de Práticas Clínicas, Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto, MG, Brazil

<sup>g</sup> Laboratório de Genética Toxicológica Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brazil

<sup>h</sup> Laboratório de Mutagênese, Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, MT, Brazil

<sup>i</sup> Laboratório de Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, RN, Brazil

<sup>j</sup> Núcleo Biotecnológico e Experimentação Molecular NUBEM, Centro Universitário NITA UNINITA, Sobrad, CE, Brazil

<sup>k</sup> Laboratório de Genética Toxicológica, Centro Universitário São Agustinho, Teresina, PI, Brazil

<sup>l</sup> Laboratório de Práticas em Genética Toxicológica, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brazil

<sup>m</sup> Laboratório de Genética Toxicológica, Programa de Pós-Graduação Profissional em Saúde e Desenvolvimento Humano (PPGSDH), Universidade La Salle, Unilasalle, Canoas, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Buccal micronucleus cytome assay  
BMCyt  
DNA damage  
Biomonitoring  
Exfoliated cells

### ABSTRACT

The Buccal Micronucleus Cytome Assay (BMCyt) has become an important biomonitoring tool for assessing cytogenetic damage in many studied populations. Each laboratory applies protocols that vary according to the method of collecting and preparing samples. Besides, Brazil is a country of great territorial extensions that received immigrants from various parts of the world with different genetic backgrounds. Therefore, the present study aimed to evaluate the inter-laboratory variation in scoring the same set of slides using the more comprehensive scoring criteria, to standardize the BMCyt protocol, to observe the basal alterations in populations of different Brazilian regions and to compare it with other places around the world. Our results showed that a valuable number of laboratories participated, ten laboratories from different regions of the country, for the validation of the BMCyt in human biomonitoring studies, resulting in the 804 healthy individuals. This was possible because we observed: a range of measures needs to be considered, such as the baseline frequency of DNA damage and cell death in non-exposed individuals; age when grouped showed an influence on DNA damage, although when evaluated by group we did not see an influence; association between smoking habit and all endpoints of the BMCyt (except karyolytic cells) was evident; the basal MN frequency, in the majority of groups, follows those around the world; and the BMCyt was confirmed as a good health status biomarker. We emphasize the need for constant discussions on the parameters of cell death due to greater difficulty among the analyzers.

\* Corresponding authors at: Laboratório de Genética Toxicológica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaúde), Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS, Brazil.

E-mail addresses: [psalarohr@gmail.com](mailto:psalarohr@gmail.com) (P. Rohr), [juliana.silva@unilasalle.edu.br](mailto:juliana.silva@unilasalle.edu.br), [juliana.silva@ulbra.br](mailto:juliana.silva@ulbra.br) (J. da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.08.011>

Received 29 May 2020; Received in revised form 14 August 2020; Accepted 20 August 2020

Available online 22 August 2020

0378-4274/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops &amp; Products

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)

## Cassava starch-based essential oil microparticles preparations: Functionalities in mosquito control and selectivity against non-target organisms

Wellington S. Moura<sup>a</sup>, Eugênio E. Oliveira<sup>b,c</sup>, Khalid Haddi<sup>b,d</sup>, Roberto F.T. Corrêa<sup>b</sup>, Tathiana B. Piau<sup>f</sup>, Diego S. Moura<sup>f</sup>, Suetônio F. Santos<sup>g</sup>, Cesar K. Grisolia<sup>f</sup>, Bergmann M. Ribeiro<sup>e</sup>, Raimundo Wagner S. Aguiar<sup>a,b,g,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi, TO, 77402-970, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi, TO, 77402-970, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, 36570-900, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG 37200-000, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil

<sup>g</sup> Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi, TO, 77402-970, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Food-based carriers  
*Siparuna guianensis*  
 Plant-based biorational insecticides  
 Mosquito control  
 Non-target toxicity

### ABSTRACT

Due to the production facilities and great functionalities, the starch extracted from Cassava plants' (*Manihot esculenta* Crantz) roots is one of the most abundant and inexpensive raw materials used in food- and non-food industries. The utilization of starches to encapsulate plant essential oils is a relevant advance in the control of insect pests, including mosquitoes that transmit human diseases. The starch-based microencapsulation of essential oils reduces the degradation and volatilization of active components, providing more sustainable and environmentally friendly activities. Here, we investigated the potential of cassava-based starch microparticle preparations containing the essential oil of a Neotropical plant (*Siparuna guianensis* Aublet) to control larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Moreover, the selectivity of the most efficient microparticles preparation was evaluated on zebrafish embryos (*Danio rerio*), an aquatic non-target organism. The characterisation of encapsulated microparticles was achieved by using scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR), and thermogravimetric analysis (TGA). Our results revealed an encapsulation efficiency of 82.8 % to 95.3 %, with an average particle diameter of 8.56 µm. Cassava starch microencapsulation reduced the essential oil degradation and enhanced (up to 8 days) the persistent lethal activities (over 50 %) against both species' mosquito larvae compared to the pure essential oil. Furthermore, the exposure of aquatic non-target organisms (embryos of *D. rerio*) revealed these microparticles' adequate selectivity. Collectively, our findings demonstrate that cassava starch-based microparticles exhibit promising functionality as carriers for essential oils with mosquitocidal activities.