

Avaliação do potencial de toxicidade da Cipermetrina em *Daphnia magna*

Evaluation of the toxicity potential of Cypermethrin in *Daphnia magna*

Yorrannys Mannes

yorrannysmannes@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Wanessa Algarte Ramsdorf

wanessa6@yahoo.com.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

RESUMO

A Cipermetrina é um inseticida classificado como piretróide sintético. Desde sua comercialização em 1977, sempre foi muito utilizada em aplicações na agricultura, devido a sua atividade contra uma ampla gama de pestes. É facilmente degradada em contato com radiação solar, água e oxigênio. Estudos recentes mostram efeitos deletérios para diversos seres aquáticos, muitos deles relacionados ao sistema nervoso central e capacidade reprodutiva. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de toxicidade da Cipermetrina no organismo, representante aquático, *Daphnia magna* através do teste agudo e ensaio cometa. Foi utilizado o inseticida comercial Insetmaster[®] constituído por cipermetrina (50 g·L⁻¹) e inertes (950 g·L⁻¹). Primeiramente fez-se o teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* de acordo com a norma ABNT 12713:2016, em que se determinou a CE50 (8,14±1,45 µg·L⁻¹) e as concentrações subletais que foram empregadas para análise do biomarcador de genotoxicidade ensaio cometa, inferiores a 0,7 µg·L⁻¹. O ensaio cometa foi realizado utilizando as baixas concentrações determinadas no teste de ecotoxicidade aguda, que são valores encontrados em ambientes aquáticos de acordo com a literatura, concentrações que variam entre 1,7 (mais alta) a 0,1 µg·L⁻¹. Foi possível visualizar alguns danos genéticos após a corrida eletroforética, mas não em quantidades suficientes para se fazer um tratamento estatístico, não sendo possível avaliar a genotoxicidade causados por essas concentrações.

PALAVRAS-CHAVE: *Daphnia magna*. Cipermetrina. Ensaio cometa. Ecotoxicidade aguda.

Recebido: 31 Ago. 2018.

Aprovado: 04 Out. 2018.

Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Cypermethrin is an insecticide classified as a synthetic pyrethroid. It was commercialized in 1977 and has been widely used in agricultural applications because of its activity against a wide range of pests. It is easily degraded in contact with solar radiation, water and oxygen. Recent studies show deleterious effects on several aquatic beings, many of them related to the central nervous system and reproductive capacity. This work aimed to evaluate the potential toxicity of cypermethrin in aquatic representative organ *Daphnia magna* through the acute test and comet assay. In this work was used a commercial insecticide named Insetmaster[®] consisting of cypermethrin (50 g/L) and inert (950 g/L). First, the acute toxicity test was performed with *Daphnia magna* according to ABNT 12713:2016, in which the EC50 (8.14 ± 1.45 µg·L⁻¹) was determined and the sublethal concentrations that were used for biomarker analysis genotoxicity, less than 0.7 µg·L⁻¹. The comet assay was performed using the low concentrations determined in the acute ecotoxicity test, which are values found in aquatic environments according to the literature, concentrations ranging from 1.7 (highest) to 0.1 µg·L⁻¹. It was possible to visualize some genetic damage after the electrophoretic run, but unfortunately it was not in sufficient quantities to make a statistical treatment, and it is not possible to evaluate genotoxicity caused by these concentrations.

KEYWORDS: *Daphnia magna*. Cypermethrin. Comet assay. Acute ecotoxicity.

INTRODUÇÃO

Com os avanços tecnológicos das últimas décadas, observou-se um aumento significativo da população mundial. Este aumento exige uma intensa atividade agrícola que utiliza maiores quantidades de produtos químicos. Consequentemente há um aumento dos resíduos que vão para os cursos d'água, reduzindo a diversidade de espécies. 1 Apenas nas últimas décadas passou a se ter uma preocupação com as questões ambientais, devido a desastres com produtos químicos. Iniciou-se em vários países o monitoramento desses ambientes, sendo indispensáveis as análises ecotoxicológicas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 1990, 2008).

A Cipermetrina é um inseticida classificado como Piretróide, foi sintetizada em 1974 e comercializada em 1977. Tem sido amplamente utilizada em aplicações na agricultura até hoje devido sua eficiência contra uma ampla gama de pestes. A Cipermetrina está entre os mais utilizados Piretróides sintéticos. Na Coreia mais de uma tonelada de cipermetrina é utilizada na agricultura por ano e mais de 8 kg é usado em lares domésticos. Não se tinha uma preocupação com o uso da Cipermetrina devido sua fácil degradação em contato com a radiação solar, água e oxigênio. Porém, recentes descobertas mostram que estes compostos afetam a capacidade neural (WORLD..., 1989; KOREIA...,2004).

Os Piretróides, em geral, são tóxicos ao sistema nervoso central, pois interagem com os canais de sódio da membrana dos axônios diminuindo a condutância do sódio para o interior da célula suprimindo o fluxo de potássio. Resultando em uma redução do potencial de ação e a geração de impulsos nervosos repetitivos, provocando tremores, hiperagitação salivação e paralisia (KIM; JUNG; OH; CHOI 2007).

A Cipermetrina não tem tendência em bioacumular, porque tem baixa persistência na água. Geralmente sua entrada em corpos hídricos é através da parte aérea logo após a aplicação, com escoamento depois da chuva. Os bioensaios toxicológicos auxiliam cientistas a terem um parâmetro de quanto algumas espécies conseguem tolerar desses poluentes, possibilitando tomar as medidas certas para a recuperação desses corpos hídricos. Alguns artigos trazem que a Cipermetrina causou danos na saúde e na reprodução de daphnideos em exposições crônicas (WORLD..., 1989; NATIONAL..., 2004).

A amostra analisada foi o inseticida comercial insetmaster[®] constituído por 5% de Cipermetrina e 95% de inertes (compostos que aumentam a solubilidade do inseticida). O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de toxicidade da Cipermetrina em *Daphnia magna* e, para isto, executou-se o teste agudo e o ensaio cometa.

METODOLOGIA

CULTIVO

O cultivo e os testes foram feitos de acordo com a norma ABNT NBR 12713:2016. Para a confiabilidade e precisão dos testes realizam-se regularmente

os testes de sensibilidade com uma substância padrão (sulfato de Zinco). Estes testes visam avaliar como está a sensibilidade ou a resistência desses organismos. A *Daphnia magna* é um microcrustáceo de água doce que se alimenta da suspensão celular da microalga fotossintetizante *Desmodesmus subspicatus* também cultivada no laboratório de ecotoxicologia da UTFPR/Curitiba (KNIE, 2004).

Os organismos são cultivados em um meio com todos os sais, nutrientes, pH, dureza, elementos traço, etc, que ela necessita para o seu desenvolvimento. As soluções para os testes são feitas com água de diluição, que dá condições para que os organismos sobrevivam ao teste.

TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

O teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* consiste na exposição dos neonatos a diferentes concentrações da amostra, de forma que se tenha uma faixa de concentrações que englobe as concentrações em que se observa a imobilidade e mobilidade de 100% dos organismos. Assim é possível determinar a concentração efetiva, que é a concentração em que se observa a imobilidade de 50% dos organismos. Para a validação dos testes sempre se faz um controle contendo apenas água de diluição. Para o cálculo da CE50 utiliza-se o programa estatístico BioStat®.

As concentrações utilizadas no teste foram de 0,7; 2,1; 6,2; 9,1; 12,5 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo que na primeira não se observou imobilidade e na última teve imobilidade de 100% dos organismos. Para o preparo dessas soluções foi feita uma solução mãe de 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, para diminuir o erro, pelo fato de se estar lidando com volumes muito pequenos do inseticida. Os testes foram realizados em triplicata para um menor erro estatístico e uma melhor precisão dos resultados. Para cada concentração testada, dez neonatos eram expostos em 20 mL de solução (água de diluição + Cipermetrina). Todos os testes possuem um controle que contem apenas água de diluição, utilizado para validar o teste. O bioensaio era armazenado em incubadora B.O.D. por 48 horas na ausência de luz, com temperatura próxima de 20° C. Após a exposição se analisava o número de organismos imóveis por concentração.

ENSAIO COMETA

A ideia do ensaio cometa é de expor os organismos em concentrações subletais, de preferência as encontradas em corpos hídricos e nos testes de toxicidade aguda, para a análise da genotoxicidade causada por essas concentrações que não afetam a mobilidade dos organismos. Para Cipermetrina selecionamos as concentrações subletais de 0,71 e 0,35 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para a montagem das lâminas, que foram previamente cobertas com agarose, 30 organismos foram homogeneizados em tampão PBS com o auxílio de um desagregador de tecidos, em microtubos. Posteriormente adicionou-se 30 μL da suspensão celular em 80 μL de agarose de baixo ponto de fusão e cobriram-se as lâminas com lamínulas. Após a solidificação da agarose retirou-se a lamínula e colocou-se as lâminas em uma solução de lise durante 24 horas em baixa temperatura para exposição do material genético. Posteriormente as lâminas



foram submetidas a uma corrida de eletroforese para a migração do DNA. Depois as lâminas foram neutralizadas com banhos de solução Tris e fixadas com etanol (PALRRELLA et al, 2015; SINGH et al, 1988; COLLINS et al, 1997).

As lâminas foram analisadas em um microscópio de epifluorescência com aumento de 400x após adição do corante brometo de etídeo (20 µL). Para a quantificação dos danos é necessário à visualização de 100 nucleóides por lâmina. São atribuídos 4 tipos de classe de danos, de acordo com o tamanho da fragmentação do nucleóide (COLLINS et al, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

No teste de toxicidade aguda obteve-se a E50 média de $8,11 \pm 1,45 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, valor indicativo de que a substância é tóxica. Esta informação já era esperada porque trabalhos recentes relatam a alta toxicidade da Cipermetrina em outros organismos. Para a determinação da CE₅₀ primeiro foi necessário descobrir a faixa de concentrações que tivesse a concentração máxima que não apresentasse imobilidade alguma e a concentração mínima que tivesse 100% de imobilidade. O teste foi realizado várias vezes para a confirmação. O resultado do teste é analisado pelo programa estatístico BioStat® que calcula CE50 com base na dose-resposta, ou seja, concentrações da exposição por porcentagem de imobilidade, resultando em uma curva de efeito.

ENSAIO COMETA

O ensaio do cometa se baseia no comportamento do DNA na célula individual, levando em consideração sua organização dentro do núcleo. Uma substância genotóxica induz modificações no DNA. Este ensaio é capaz de detectar danos e quebras na molécula de DNA causados pela substância teste. É analisada a intensidade em que o material fragmentado migrou durante a eletroforese (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; PALRRELLA et al, 2015; COLLINS et al, 1997; MORENO, 2011).

O ensaio cometa com *Daphnia magna* foi realizado seguindo a metodologia recentemente implementada no laboratório de ecotoxicologia, em que foi possível observar nucleóides com seus respectivos danos, mas não em quantidades suficientes para aplicar um cálculo estatístico. Porém, foi possível observar que as lâminas que continham o material genético oriundos do controle tinham menores danos que nas lâminas com material genético dos organismos expostos nas concentrações subletais. Esta técnica não é convencional e está em processo de padronização.

CONCLUSÃO

Confirmando os dados encontrados na literatura, a Cipermetrina se mostrou tóxica, apresentando uma CE50 média de $8,11 \pm 1,45 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, parâmetro indicativo de que os organismos expostos foram altamente sensíveis ao composto. As



concentrações subletais possuem valores semelhantes aos encontrados na literatura, que são $0,71 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,49 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (KIM; JUNG; OH; CHOI 2007).

Na análise do biomarcador de genotoxicidade ensaio cometa foi possível visualizar alguns nucleóides, porém não em quantidade suficientes para o tratamento estatístico. Isto deve-se ao fato da técnica estar em processo de padronização no laboratório de ecotoxicologia. O ensaio cometa com *Daphnia magna* não é convencional e na literatura encontram-se variações nas metodologias.

REFERÊNCIAS

ZAGATTO, Pedro A.; BERTOLETTI, Eduardo. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. 2. ed. São Carlos, SP: RiMa, 2008.

BERTOLETTI, E. 1990 Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais na grande São Paulo. Ciência e Cultura.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1989). Environmental Health Criteria 82. Cypermethrin. 1989.

Korea Crop Production Association. Agrochemical Year Book; Moonsun Printing: Seoul, Korea, 2004; 236–323.

KIM, Younghee; JUNG, Jinyong; OH, Sorin; CHOI, Kyungho. Aquatic toxicity of certap and cipermethrin to diferente life stages of *Daphnia magna* and *Oryzias latipes*. Journal of environmental Science and health, Seoul, Korea. 2007; 56-64.

National Institute of Environmental Research. Survey on Amount of Chemical Discharge from Non-point Sources (Pesticides, Vehicles, etc) in Year of 2002; Korea Ministry of Environment: Seoul, Korea, 2004; Appendix.

KNIE, Joachim L. W.; LOPES, Ester W. B. (Autora). Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis (SC): FATMA/GTZ, 2004.

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

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



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

MORENO, N. C. Efeitos Genotóxicos e Citotóxicos do Herbicida Glifosato e do Produto Formulado Roundup Transorb® para um peixe Neotropical: Testes In Vivo e In Vitro. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, 2011. 129p.

AGRADECIMENTOS

A orientação da professora Wanessa Algarte Ramsdorf. A ajuda dos integrantes do laboratório de ecotoxicologia da UTFPR. A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Capes, CNPQ e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.