

PARTE II

AVALIAÇÃO DE IMPACTOS E GESTÃO AMBIENTAL DA AGRICULTURA

*"A melhor maneira de
prever o futuro é criá-lo"*
Peter Drucker

ORGANISMOS-TESTE E BIOMARCADORES COMO FERRAMENTAS NA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM DIFERENTES ECOSISTEMAS

Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro, Claudio Martín Jonsson e Mariana Silveira Guerra Moura e Silva

INTRODUÇÃO

A proteção do meio ambiente e de seus compartimentos (ar, água e solo) é uma questão importante para a saúde humana, pois quantidades crescentes de compostos químicos são produzidas e liberadas no ambiente. A ecotoxicologia estuda os efeitos de produtos químicos nos seres vivos, populações e comunidades dentro de ecossistemas definidos, bem como as características desses agentes e suas rotas de transferência e interações com outros compartimentos ambientais. Portanto, a ecotoxicologia estuda como um agente tóxico pode afetar as características e funções do ambiente quanto a seus aspectos físicos, químicos, biológicos e sociais, além dos mecanismos que determinam o nível de exposição e os efeitos sobre os organismos vivos. Também avalia as transformações e a bioacumulação dos poluentes dentro dos organismos e a biomagnificação trófica nos ecossistemas e em toda a biosfera. Com base nesses estudos, a ecotoxicologia visa formular ações preventivas úteis para prevenir ou mitigar efeitos prejudiciais à saúde ambiental (Lopes et al., 2021). Nesse cenário, a pesquisa ecotoxicológica deve ser vista como a base da identificação e caracterização dos perigos.

Os estudos ecotoxicológicos recentes se concentram em um grande número de biomarcadores e organismos de diferentes níveis da cadeia trófica, populações, comunidades e ecossistema. Os ensaios em escala de laboratório e de campo apresentam vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas durante a fase de projeto experimental. Enquanto ensaios de laboratório podem ter melhor custo-benefício e permitir melhor controle de variáveis em comparação a estudos em escala de campo, estes últimos ensaios, por sua vez, são mais realistas, mas mais custosos e têm problemas logísticos frequentes (Salomão et al., 2020).

Dessa forma, os testes de ecotoxicidade são instrumentos usados na avaliação de risco ambiental para responder a perguntas sobre potenciais perigos intrínsecos nas avaliações de exposição. Consequentemente, o melhor entendimento das interações entre o ambiente e o composto químico ajudará no estudo desses efeitos e perigos devido à exposição tanto aos contaminantes tradicionais, quanto aos nanomateriais (NMs).

Neste cenário, este capítulo examina os resultados de ensaios em organismos expostos a compostos formulados de forma tradicional ou através da nanotecnologia, visando contribuir para a implementação de práticas eficazes de governança de risco na agricultura moderna. A seguir, serão abordados os organismos usados na avaliação ecotoxicológica (modelos padrão); os biomarcadores passíveis de uso, como alterações bioquímicas (atividade enzimática), físicas, reprodutivas e comportamentais; além de aspectos de bioacumulação desses compostos nos organismos. Por fim, serão discutidas algumas perspectivas futuras relativas ao tema.

INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS AMBIENTAIS E BIOLÓGICOS NA TOXICIDADE

As características do contaminante e do ambiente, bem como do organismo afetado, influenciam a toxicidade. Várias dessas características afetam as respostas dos organismos, tais como biodisponibilidade (quantidade de uma determinada substância que entra no corpo e é capaz de apresentar um efeito), taxas de absorção, acúmulo de tecido, biodegradabilidade (capacidade de degradação biológica de materiais orgânicos por organismos vivos), vias bioquímicas de metabolização, características físico-químicas (volatilização, polaridade, solubilidade, partição hidrofílica-lipofílica, fotólise, oxidação, temperatura, salinidade, cinética de sorção – medida da adsorção ou dessorção em relação ao tempo em um determinado compartimento ambiental), entre outros. Os efeitos do contaminante no organismo-alvo podem ainda produzir efeitos reversíveis, irreversíveis, aditivos ou cumulativos na dependência da concentração, duração, frequência, taxa de captação, depuração e acúmulo do poluente e estágio de desenvolvimento do organismo.

As características dos compostos podem ser usadas em modelos matemáticos para contribuir com programas de monitoramento da saúde. Assim, foram avaliados 39 inseticidas na distribuição e acúmulo nos tecidos, utilizando suas características físico-químicas e os teores lipídicos nos tecidos para calcular a distribuição dos compostos entre os tecidos. Os inseticidas avaliados foram selecionados entre os registrados no Brasil para uso agrícola. O modelo de fugacidade nível I foi utilizado para os cálculos da distribuição do inseticida entre os tecidos dos músculos, vísceras, pele, gordura, sangue, fígado, rins e intestinos, considerando o coeficiente de partição octanol-água, a solubilidade em água e os teores de lipídios nos tecidos. A análise de agrupamento

dos compostos, realizada visando a identificação e separação de grupos de inseticidas com base em suas características físico-químicas, mostrou três diferentes classes de distribuição e acúmulo nos tecidos: 70 (86%), 44 (58%) e 9 (19%) (Paraíba et al., 2009).

Os poluentes ou contaminantes podem sofrer bioacumulação na cadeia alimentar. No caso dos NMs, a transferência trófica para o próximo nível depende da sua estabilidade e das propriedades da superfície. No entanto, outros possíveis efeitos co-existent de contaminantes também podem interferir na nanotoxicidade: ele pode absorver, servir como transportador ou ligar-se a outros contaminantes; facilitar a formação de metabólitos mais reativos; e causar danos celulares.

Os produtos agrícolas que contêm NM prometem benefícios em relação aos produtos convencionais, como melhor direcionamento a espécies de pragas, maior eficácia e maior segurança ambiental, além de diminuição de perdas e outros. Nesse sentido, espera-se que, em um futuro próximo, a liberação controlada de pesticidas formulados com a ajuda da nanotecnologia se transforme em ferramenta importante para melhorar a produtividade e proteção das atividades agrícolas com menor impacto ao meio ambiente e à saúde dos agricultores (Albuquerque et al., 2020). Além disso, o refinamento das ferramentas de pesquisa *in silico* nos próximos anos pode favorecer o equilíbrio entre o rigor analítico e a facilidade operacional para a avaliação do risco ambiental.

O ambiente aquático é de particular interesse, uma vez que tende a ser o sumidouro final de contaminantes. Os NMs metálicos, em especial, quando entram em contato com o ecossistema aquático, sofrem dissolução de íons e sua cinética de liberação na água depende de muitos fatores (Pradhan; Mailapalli, 2017). Além disso, deve-se observar que as propriedades dos diversos nanocompostos, como as nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2 NPs), devem ser consideradas a fim de estabelecer modelos experimentais – especialmente de ecotoxicologia aquática – para estudar sua toxicidade sobre espécies ambientalmente relevantes (Clemente et al., 2012, 2014a). Entre elas, a irradiação por luz ultravioleta (UV) é um fator de particular preocupação para óxidos de metal fotocataliticamente ativos, como TiO_2 NPs e nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs). Nessas condições, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Assim, a iluminação desses NMs em águas superficiais resulta na formação de intermediários reativos, consequentemente alterando o potencial ecotoxicológico de micropoluentes orgânicos, incluindo pesticidas, devido à degradação catalítica. Clemente et al. (2013, 2014b) mostraram a importância de se considerarem as condições experimentais em testes ecotoxicológicos. Eles avaliaram os efeitos em peixes expostos a diferentes concentrações de TiO_2 NPs e condições de iluminação, observando a sobrevivência dos organismos juntamente com biomarcadores de alterações bioquímicas e genéticas. Além disso, a exposição prolongada de peixes (21 dias) a duas fases de cristal de TiO_2 NPs diferentes (anatase e uma mistura de 80% de anatase e 20% de rutilo) foram avaliadas nas mesmas condições de luz. Da mesma forma,

a ocorrência de efeitos subletais foi influenciada pela fase do cristal de TiO_2 NP e pela condição de iluminação. A anatase pura causou mais dano oxidativo sem coexposição ao UV, enquanto a mistura anatase-rutilo causou mais efeitos subletais quando a exposição ocorreu sob UV (Clemente et al., 2015).

As características químicas do óxido de grafeno (OG) também podem afetar a toxicidade nos organismos. Clemente et al. (2017) observaram que o OG com debris era mais estável do que OG do qual foram retiradas as impurezas, como também na presença de ácido húmico (HA). O OG causou também maiores efeitos tóxicos em zebrafish (*Danio rerio*), peixe ornamental usado como modelo biológico. A concentração real no ambiente do NM pode ser então afetada pela influência ambiental em seu destino e transporte. Castro et al. (2018) observaram que o cenário mais seguro no compartimento aquático associado aos valores de concentração sem efeitos previstos para o OG foi estimado em 20 a 100 mg L^{-1} (na ausência de HA) e 5 a 23 mg L^{-1} (na presença de HA). Por sua vez, o HA que compõe a matéria orgânica natural (MON) melhorou significativamente a estabilidade do OG na água. Recentemente, Clemente et al. (2019) mostraram que a presença de MON alterou os efeitos tóxicos do OG em organismos aquáticos.

Em adição, Côa et al. (2017) observaram que os nanotubos de carbono de múltiplas camadas (*multi wall carbon nanotubes* – MWCNTs), revestidos com HA por um processo de moagem, apresentaram baixa toxicidade para organismos-modelo de testes de ecotoxicidade aquática como *Hydra attenuata*, *Daphnia magna* e *D. rerio*. O revestimento com HA foi responsável por favorecer a dispersão de MWCNTs em água ultrapura e por melhorar sua capacidade de remoção de cobre. O material híbrido HA-MWCNTs adsorveu 2,5 vezes mais íons de cobre (II) (Cu^{2+}) do que MWCNTs oxidados com ácido nítrico (HNO_3), evidenciando que é um material adsorvente muito eficiente na remoção de íons Cu^{2+} da água reconstituída.

Portanto, para definir os riscos ambientais e identificar novas direções de teste, é importante realizar bioensaios em diferentes organismos expostos às diferentes condições experimentais.

ORGANISMOS-TESTE USADOS NA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA

Os testes ecotoxicológicos requerem a utilização de organismos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos. A utilização de animais deve ser avaliada criteriosamente no que diz respeito à adequação da experimentação em relação aos resultados esperados também por razões éticas. Tais questões levaram à elaboração de diversas normas e esforços legais que orientam a forma mais adequada de manuseá-los.

Nos bioensaios de laboratório, é importante incluir diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar para que os resultados observados possam representar de maneira mais realista os efeitos dos contaminantes no ecossistema natural. Assim, por exemplo, para avaliação da toxicidade em ambientes aquáticos, podem ser usados microalgas, peixes, microcrustáceos e insetos.

ORGANISMOS PARA A AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE

Microalgas

As algas são muito utilizadas em testes ecotoxicológicos por serem produtores primários, o que significa que alterações em suas comunidades podem afetar níveis tróficos superiores. As algas possuem grande sensibilidade às alterações ocorridas no ambiente, com ciclo de vida curto, o que possibilita a observação de efeitos tóxicos em várias gerações. Nos testes com algas, avalia-se o crescimento algáceo, que pode ser determinado pela contagem celular e pelo conteúdo de clorofila. As algas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* e *Pseudokirchneriella subcapitata* são muito utilizadas nos testes de toxicidade devido à facilidade de seu cultivo (Figura 14.1).

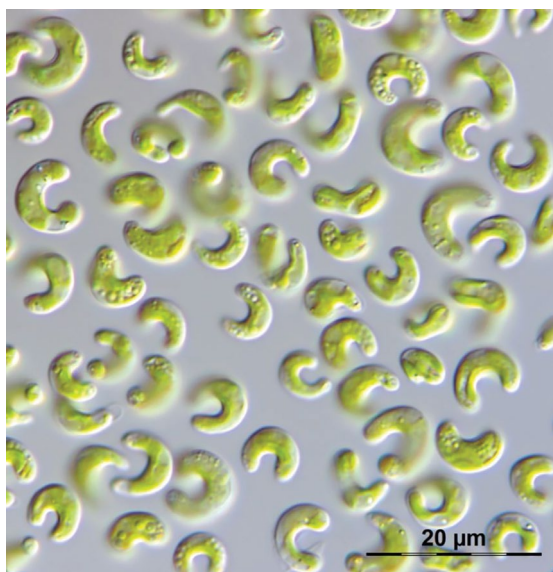


Figura 14.1. SAG 61.81 *Raphidocelis subcapitata*. Formerly called: *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) – Microalga.

Fonte: Lorenz (2016).

Foi estudada a toxicidade, através da inibição do crescimento algáceo, de formulações fungicidas à base de piraclostrobin e epoxiconazol (Prestes et al., 2011). Os compostos foram avaliados isoladamente e em formulação conjugada por 72 horas sobre a alga *P. subcapitata* mediante determinação da concentração efetiva média (CE_{50} ; causa efeito inibitório em 50% da amostra, referente ao crescimento, peso úmido ou teor de clorofila) dos princípios ativos de cada uma das formulações.

Os valores de CE_{50} -72h obtidos para a formulação à base de piraclostrobin foram de $5,57 \text{ mg L}^{-1}$; para a formulação à base de epoxiconazol, de $1,14 \text{ mg L}^{-1}$; e para a formulação conjugada, de $0,20 \text{ mg L}^{-1}$. Foi determinado o Índice de Aditividade (IA), sendo que os resultados sugeriram um forte sinergismo da mistura ($IA = 12,6$) quanto a sua ação tóxica sobre o organismo-teste. Assim, estimou-se um fator de magnificação de toxicidade de 13,6 vezes em relação à toxicidade individual de cada composto. Este fato realça a necessidade de revisão dos padrões limitantes desses fungicidas em corpos d'água, os quais tendem a subestimar os efeitos adversos resultantes da combinação dos agentes tóxicos.

Macrófitas

As lemnas, populamente denominadas lentilhas-d'água, comumente se referem a um grupo de plantas flutuantes da família Lemnaceae. Estas macrófitas possuem crescimento rápido, são amplamente distribuídas e relativamente fáceis de cultivar, além de serem utilizadas em testes como representantes de produtores primários. As lemnas são tão sensíveis à toxicidade quanto outras espécies aquáticas, sendo bastante adequadas para uso em bioensaios de efluentes complexos e para testar a poluição por herbicidas no ambiente aquático, seja em águas superficiais, subterrâneas ou em sedimentos. As lemnas e as algas se complementam como organismos-teste em ensaios de fitotoxicidade, juntamente com as sementes de alfaca. Muitas espécies do gênero *Lemna* foram estudadas, principalmente *Lemna minor* e *Lemna gibba*, que foram recomendadas como espécies-teste padrão (Wang, 1990).

Realizou-se um estudo no qual se avaliou o efeito do OG na alteração do crescimento, peso úmido e teor de clorofila da *L. minor* (Castro et al., 2018). As plântulas foram expostas em placas de poliestireno de 12 poços, sendo dois frondes em 5 mL de solução-teste por poço, com 24 repetições para cada concentração-teste: 0,0; 0,1; 1; 10; e 100 mg L^{-1} de OG. Para avaliar o crescimento, foram feitas contagens diárias do número de frondes após exposição a 0, 0,1, 1, 10 e 100 mg L^{-1} de OG. Ao final do período de exposição, cada fronde foi pesada e determinou-se o efeito sobre a alteração na biomassa (peso úmido). Após a pesagem, foi feita extração da clorofila (Zhang, 2018), permitindo a quantificação das clorofilas a e b por equações descritas por Brain e Solomon (2007). O teor de clorofila foi calculado a partir da soma dos dois parâmetros. Após o período de

exposição, foram determinados os valores de CE_{50} -168h. Estes foram, respectivamente, > 100, 14,84 e 2,39 mg L⁻¹, sendo o último parâmetro o mais sensível (Castro et al., 2018).

Sementes de Alface

O bioensaio de toxicidade com sementes de *Lactuca sativa* é um teste em que se avaliam os efeitos fitotóxicos de compostos puros ou misturas complexas no processo de germinação de sementes e no desenvolvimento de mudas durante os primeiros dias de crescimento. Embora *L. sativa* não seja uma espécie representativa de ecossistemas aquáticos, as informações geradas a partir deste teste de toxicidade fornecem dados sobre o possível efeito de poluentes nas comunidades de plantas próximas às margens de corpos d'água contaminados.

O período de germinação e os primeiros dias de desenvolvimento da muda representam um estágio de grande sensibilidade a fatores externos adversos devido à ocorrência de numerosos processos fisiológicos, que podem sofrer interferência pela presença de uma substância tóxica, alterando a sobrevivência e o desenvolvimento normal da planta. Por outro lado, muitas das reações e processos envolvidos são gerais para a grande maioria das sementes; portanto, a resposta desta espécie e os dados obtidos a partir da aplicação do teste são amplamente representativos dos efeitos sobre as sementes em geral. Quanto à incorporação do teste em uma bateria de bioensaios, é importante considerar a sensibilidade da espécie *L. sativa*, o curto tempo de exposição do teste e os baixos custos associados, visto que os testes não requerem equipamentos sofisticados. O bioensaio tem aplicação na análise de amostras ambientais e no monitoramento de processos de desintoxicação, saneamento, controle de efluentes ou reutilização de biossólidos (Sobrero; Ronco, 2004).

A respeito do uso deste ensaio na avaliação de risco de NMs, foi realizado um estudo sobre o efeito do OG (Castro et al., 2018) no qual sementes de alface foram obtidas comercialmente e os ensaios foram realizados de acordo com Bautista et al. (2013). No final do período de exposição, avaliou-se a porcentagem de germinação e a taxa de crescimento das raízes. Esta última foi determinada calculando os coeficientes angulares da regressão linear de curvas do tamanho da raiz em função do tempo (Basu; Pal, 2011). Para ambos os parâmetros avaliados, os valores de CE_{50} foram superiores a 100 mg L⁻¹, correspondendo à maior concentração testada (Castro et al, 2018).

Invertebrados Aquáticos

Microcrustáceos

Os crustáceos do gênero *Daphnia* são bastante utilizados em testes de toxicidade por sua ampla distribuição em corpos de água doce; sua grande importância em mui-

tas cadeias alimentares, constituindo uma fonte significativa de alimento para peixes; seu ciclo de vida relativamente curto; fácil cultivo em laboratório; e sensibilidade a vários contaminantes do ambiente aquático. O efeito tóxico frequentemente avaliado em testes de toxicidade com microcrustáceos é a letalidade ou imobilidade em testes agudos ou crônicos. Nos testes de toxicidade crônica, os resultados podem ser expressos também como concentração de efeito não observado (Ceno). A espécie de *Daphnia* mais utilizada é a *D. magna* (Figura 14.2), cujo cultivo é bem conhecido, seguida da *Daphnia similis*. Por sua vez, o crustáceo de água salgada *Artemia salina* também constitui uma espécie bastante utilizada em testes de toxicidade para a estimativa da CE_{50} , 1 ou 2 dias após a eclosão de seus ovos.



Figura 14.2. Neonato de *Daphnia magna*.

Fonte: Hannas et. al. (2010).

Avaliou-se o efeito toxicológico (inibição da mobilidade) de formulações fungicidas à base de piraclostrobin e epoxiconazol, isoladamente e em formulação conjugada sobre *D. similis*, mediante determinação da CE_{50} -48h de cada uma das formulações (Prestes et al., 2012). Além disso, foi avaliado o possível efeito sinérgico ou antagônico dos dois fungicidas quando usados simultaneamente, obtendo-se uma CE_{50} -48h de $18,36 \mu\text{g L}^{-1}$ para a formulação à base de piraclostrobin; de $89,98 \mu\text{g L}^{-1}$, para a formulação à base de epoxiconazol; e de $23,50 \mu\text{g L}^{-1}$, para a formulação com ambos os compostos. Portanto, das três formulações estudadas, o piraclostrobin mostrou-se o mais tóxico para os organismos em estudo. A determinação do IA (Índice de Aditividade)

aponta que a mistura dos princípios ativos exerceu efeito toxicológico aditivo apenas sobre o organismo-alvo, diferentemente do ocorrido com as microalgas.

Em um estudo com exposição aos mesmos fungicidas por 21 dias, foi avaliada a toxicidade crônica relacionada à mortalidade e à produção de neonatos por indivíduo adulto (Prestes et al., 2013). Em relação à primeira, foram encontrados valores de Ceno de 0,098 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a formulação à base de piraclostrobin, enquanto o valor foi de 1,324 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a formulação à base de epoxiconazol, e de 0,341 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a formulação com os dois fungicidas. Quanto à alteração na relação neonatos por adulto, foram encontrados valores Ceno de 0,579, 3,599 e 0,623 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para piraclostrobin, epoxiconazol e formulação conjugada. Das três formulações utilizadas, o piraclostrobin isolado mostrou-se o mais tóxico para os organismos estudados. O parâmetro mais sensível às ações tóxicas foi a mortalidade comparada aos efeitos sobre a reprodução.

O uso indiscriminado de agroquímicos na aquicultura para combater doenças pode ter resultados negativos, com impactos sobre a saúde humana e o meio ambiente, levando ao aparecimento de microrganismos resistentes em fluxos de águas residuais que podem ser absorvidos no cultivo de alimentos ou passarem às águas superficiais. Nesse contexto, os polímeros naturais têm atraído grande interesse para o desenvolvimento de sistemas de liberação de agentes ativos. Óleos essenciais de eugenol e de alho foram encapsulados em nanopartículas (NPs) de zeína, formando NPs biodegradáveis. As formulações de NPs contendo os compostos botânicos apresentaram menor toxicidade em testes realizados com *A. salina* em comparação aos compostos não-encapsulados (Luis et al., 2020).

Hidras

A hidra, um cnidário de água doce, pode ser usada como um organismo-modelo alternativo em testes de toxicidade de produtos químicos ambientais devido a sua alta sensibilidade e grande potencial de regeneração (Blaise et al., 2018; Murphy; Quinn, 2018). A hidra possui uma coluna de corpo tubular cilíndrica, hipóstomo apical rodeado por tentáculos que permitem capturar a presa e um disco basal com o qual se liga ao substrato. Todas as células estão em contato com o meio aquoso, o que facilita a penetração de substâncias tóxicas no animal. Ela tem sido usada como organismo-modelo em testes ecotoxicológicos por meio da avaliação de parâmetros como regeneração, reprodução e alterações morfológicas (Figura 14.3).

Foto: J.H. Vallim



Figura 14.3. Cultivo de *Hydra attenuata*.

Também pode ser usada como modelo útil na avaliação de ecotoxicidade de NMs. Nesse sentido, o carvão ativado do bagaço de cana-de-açúcar pirolisado (ACPB) carregado com AgNP pode ser útil na absorção de poluentes ambientais. O ACPB-AgNP inibiu o crescimento de bactérias (*Escherichia coli*), o que é uma vantagem promissora para a utilização desses materiais em processos de tratamento de efluentes e purificação de água. No entanto, o ACPB-AgNP também apresentou riscos ambientais, com efeito tóxico para a *H. attenuata* (concentração letal média – CL₅₀ – de 1,94 mg L⁻¹), e suprimiu o desenvolvimento da raiz do tomate. Estes resultados chamam a atenção para as implicações ambientais de materiais de carvão ativado modificados com AgNP (Gonçalves et al., 2016). Ademais, apesar de não causar sinais de toxicidade aguda em concentrações variando de 0,1 a 100 µg mL⁻¹ de OG em *Caenorhabditis elegans* e em *D. similis*, a exposição ao grafeno levou à morte e desintegração de *H. attenuata* após exposição a 100 µg mL⁻¹ por 72 horas (Durán et al., 2015).

Insetos Aquáticos

Os sedimentos são componentes essenciais dos ecossistemas aquáticos por constituírem locais fundamentais para o ciclo biogeoquímico e a cadeia alimentar (Burton

Junior et al., 2001). Nos ambientes fluviais, exercem um papel importante na dispersão e na reciclagem de metais contaminantes (Macklin et al., 2006) e podem armazenar e imobilizar os elementos potencialmente tóxicos de forma temporária (Förstner, 2003). O tamanho de seus grãos também desempenha importante papel, já que as partículas finas acumulam mais contaminantes do que as partículas grosseiras (Förstner, 2004). Assim, os sedimentos registram a memória do local principalmente em suas camadas mais profundas (Salomons; Brils, 2004), representando os diferentes níveis de poluição em uma bacia hidrográfica ao longo do tempo (Förstner, 2004).

A fauna bentônica (associada ao sedimento aquático) é bastante usada em estudos de biomonitoramento da qualidade da água, bem como em estudos ecotoxicológicos. Este grupo de animais apresenta grande riqueza de espécies com diferentes níveis de tolerância a impactos antrópicos e poluentes orgânicos e inorgânicos. No caso de estudos em ecotoxicologia, uma das espécies mais usadas como bioindicadora é a larva de inseto aquático do gênero *Chironomus* (família Chironomidae, ordem Diptera). Este organismo apresenta algumas vantagens no uso em laboratório como: ciclo de vida relativamente curto (cerca de 21 dias a 25 °C), ampla distribuição e sensibilidade a inúmeros poluentes (Park; Choi, 2009) (Figura 14.4).



Foto: MJ Hatfield

Figura 14.4. Larva de Chironomidae (Diptera: Chironomidae).

Fonte: Iowa State University (2011)

No Brasil, a espécie *Chironomus sancticaroli* é usada regularmente em pesquisas de contaminação de sedimentos pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb, 2012) e para avaliação da toxicidade de herbicidas, NPs e outros po-

luentes. Nesses estudos, pode ou não ser usado o sedimento original, tendo como substituintes água ou sedimento reconstituído (Barbosa, 2008; Pusceddu, 2009; Sales, 2009; Bonani, 2010). A vantagem do uso desta espécie é que ela é de ocorrência natural no Brasil e, por isso, é mais recomendada, pois, teoricamente, responde melhor aos contaminantes estudados em nosso país, sob nossas condições climáticas, de solo e de água.

Ao final do período de exposição, podem ser avaliados diferentes parâmetros, como percentual de mortalidade e medição do comprimento do corpo para avaliação do crescimento. Assim, Jonsson et al. (2015) investigaram a toxicidade do diflubenzuron para espécies aquáticas não-alvo, calculando a concentração de risco para 5% das espécies (HC5). Para larvas de *C. sancticaroli*, foi atribuído um valor $EC_{50-48h} > 100 \text{ mg L}^{-1}$, verificando-se a presença de mobilidade da larva durante todo o período de exposição. Também pode ser calculada a frequência de deformidade do mento (peça do aparelho bucal), que pode sofrer alterações em sua estrutura como consequência de impactos por poluentes inorgânicos, principalmente metais pesados e pesticidas (Kuhlmann et al., 2000; Sanseverino; Nessimian, 2008), além de NMs (Albuquerque et al., 2021).

Castro et al. (2018) avaliaram o efeito do OG associado a HAs em nove organismos aquáticos, entre eles, o inseto aquático *C. sancticaroli*. Observou-se que, para este organismo, a CE_{50} foi maior do que 100 mg L^{-1} , a concentração mais alta testada e recomendada pela Organisation for Economic Co-operation and Development (1992, 2013). Já em relação à avaliação de AgNPs, obteve-se a CL_{50} de 186 mg L^{-1} após exposição aguda de 48 horas, enquanto para a exposição crônica foram calculadas CL_{50} de 95 mg L^{-1} e CL_{10} de 35 mg L^{-1} (Silva et al., 2019).

Invertebrados do Solo

Nematoides

Os nematoides são invertebrados diversificados e abundantes em sedimentos e solos com muitas espécies ocorrendo não apenas em habitats terrestres, mas também em águas superficiais. Diante da presença de compostos tóxicos no solo e em ambientes aquáticos, os testes de toxicidade com nematoides constituem uma alternativa adequada para a identificação de possíveis efeitos nos organismos. O *C. elegans* é um nematoide de vida livre no solo que se alimenta de bactérias, sendo encontrado também em grande número em ambientes aquáticos (Politz; Philipp, 1992). Tem sido amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos devido a sua facilidade de cultura, tempo curto de reprodução e transparência corporal, além do conhecimento acumulado a respeito de sua fisiologia, desenvolvimento e genética do organismo. O seu uso permite a avaliação de parâmetros de nanotoxicidade tais como reduções no

comprimento do corpo, progênie e comportamento de locomoção, além dos efeitos na sobrevivência. Testes com este nematoide já foram desenvolvidos para avaliar a toxicidade de amostras aquosas, sedimentares e de solo utilizando parâmetros de toxicidade, alterações de crescimento e de reprodução, como em estudos com NPs (Jacques et al., 2017). Outro nematoide, *Panagrolaimus*, é criado em meio de aveia e pode ser usado em testes ecotoxicológicos, como, por exemplo, para avaliar os possíveis efeitos do OG (Castro et al., 2018).

Minhocas

As minhocas, enquanto invertebrados do solo, constituem um importante grupo da fauna edáfica. São sensíveis a alterações no seu habitat e têm sido utilizadas como organismos-teste e indicadoras da qualidade do solo. Os ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas incluem parâmetros de mortalidade, reprodução, comportamento de fuga e bioacumulação. Também têm sido utilizados para testar o efeito de NPs inorgânicas e orgânicas (Heckman et al., 2011; Castro et al., 2018).

Vertebrados

Muitas abordagens dos testes de toxicidade dependem de um conjunto de estudos que avaliam resultados observáveis em animais, como sinais clínicos ou alterações patológicas. Desta forma, a pesquisa científica tradicionalmente utiliza modelos animais criados em biotérios a fim de facilitar a manipulação e manter os animais em número, idade e sexo adequados ao estudo em andamento. A partir do início do século XX, os roedores ganharam destaque. Isso ocorreu graças a uma série de características inerentes aos animais usados, como tamanho reduzido, ciclo reprodutivo curto e prole numerosa. Em consequência, devido ao volume de conhecimento obtido sobre os roedores, foram desenvolvidos vários modelos experimentais.

Devido às questões éticas, o uso de animais na pesquisa tem sido motivo de discussão. As questões levantadas levaram ao desenvolvimento e à validação de novos métodos, bem como a implementação regulatória de testes alternativos em diversos países visando a sua harmonização. Estas ações foram iniciadas a partir do conceito de 3Rs (*reduction, refinement, replacement*), que objetiva, além de diminuir o número de animais utilizados na pesquisa, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes in vivo (Fenwick et al., 2009). Contudo, mesmo com o progresso de métodos alternativos nos últimos anos (estudos in vitro, culturas de células etc.), os modelos animais ainda são importantes para o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo.

As implicações éticas dos testes ecotoxicológicos devem ser cuidadosamente consideradas no caso de vertebrados de acordo com a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, conhecida como “Lei Arouca” que regulamenta o uso de animais em pesqui-

sas científicas no país. O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) é uma instância colegiada multidisciplinar de caráter normativo, consultivo, deliberativo e recursal que tem como competências a formulação de normas relativas à utilização humanitária de animais em ensino e pesquisa científica, além de estabelecer condutas para instalação e funcionamento adequado de biotérios e de laboratórios que usam a experimentação animal. O conselho é responsável também pelo credenciamento das instituições que desenvolvem atividades nesta área (Castro, 2013b).

O Concea, por meio da Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016, publicou o capítulo “Procedimentos – Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica” e a Resolução nº 35, de 11 de agosto de 2017, que altera a redação da Resolução Normativa nº 33. Ambos os capítulos fazem parte do *Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica*.

Vertebrados Aquáticos (Peixes)

Os peixes têm sido muito utilizados na pesquisa ecotoxicológica a fim de verificar potenciais danos pela exposição a diversos poluentes, bem como para estabelecer biomarcadores de exposição e pelo fato de pertencerem a uma importante cadeia trófica. O Concea publicou a Resolução Normativa nº 34, de 27 de julho de 2017, que institui o capítulo “Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica para fins de estudo biológico ou biomédico I – Lambari (*Astyanax*), Tilápia (*Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*) e Zebrafish (*Danio rerio*)”, além do anexo “Guia de peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica para fins de estudo biológico ou biomédico I – Lambari (*Astyanax*), Tilápia (*Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*) e Zebrafish (*Danio rerio*)” da Resolução Normativa nº 34/2017, ambos pertencentes ao Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica.

Zebrafish

O zebrafish (*D. rerio*) tem se tornado um dos modelos alternativos aos roedores mais frequentemente utilizado. Ele emergiu rapidamente como um importante organismo-modelo na toxicologia aquática. O zebrafish, enquanto modelo experimental, é considerado robusto, pois tem baixo custo, porte pequeno, alta taxa de fecundidade, alto grau de homologia com genomas humanos, função conservada de áreas cerebrais e sistema de neurotransmissores. Estas características, em conjunto, permitem melhor entendimento dos efeitos de poluentes sobre as populações aquáticas. O modelo ainda pode substituir o uso de modelos clássicos com mamíferos (Parker, 2016). Este organismo-modelo tem sido utilizado em ecotoxicologia e outras áreas para medir os efeitos dos poluentes sobre a comunidade de peixes e a biodiversidade, uma

vez que ele geralmente reage com grande sensibilidade às mudanças no ambiente e seu comportamento pode ser influenciado por fatores ambientais (Kopp et al., 2018).

O teste de toxicidade aguda de embriões de peixe (*Fish Embryo Acute Toxicity* – FET) é usado como uma alternativa ao teste de toxicidade aguda em animais e em peixes juvenis e adultos. Este teste destina-se a determinar a toxicidade aguda de substâncias químicas em estágios embrionários de peixes (Organisation for Economic Co-operation and Development, 236, 2013), no qual, devido ao estágio primordial do desenvolvimento do sistema nervoso, considera-se que nem dor nem desconforto possam ser percebidos, podendo o organismo ser considerado como um substituto a organismos juvenis e adultos para estes testes. Estudos mostram que há efeitos toxicológicos semelhantes em embriões de zebrafish e em humanos (Yao et al., 2018).

Os testes com zebrafish fornecem importantes informações sobre a mortalidade e outros efeitos, como diminuição do comprimento padrão devido à exposição a compostos químicos. O zebrafish tem córion transparente, o que permite a observação atenta de seu desenvolvimento, motivo pelo qual é frequentemente usado em testes que investigam os efeitos diretos ou indiretos da substância no desenvolvimento embrionário. O desenvolvimento do zebrafish é rápido, com a embriogênese completa em 72 horas pós-fertilização (hpf) e a maioria dos órgãos totalmente desenvolvidos em 96 hpf, permitindo que atinjam a idade adulta em torno de 3 meses. Alguns produtos químicos podem afetar o desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish. Parâmetros usados em teste de toxicidade embrionária incluem mortalidade, taxa de eclosão, frequência cardíaca, presença de edema, entre outros (Clemente et al., 2019).

Os testes de toxicidade e sobrevivência de peixes são ferramentas importantes para o monitoramento da poluição ambiental. Dessa forma, são feitos testes durante os estágios iniciais de vida do peixe, seu crescimento e reprodução. Devido à barreira imposta pelo córion na penetração do composto em estudo, o teste FET é por vezes conduzido em embriões cujo córion foi removido. A remoção da membrana do córion garante a exposição direta dos embriões, reduzindo as fontes de variabilidade e contribuindo para a padronização dos testes de toxicidade embrionária em peixes (Medeiros et al., 2021).

A adsorção e a absorção de poluentes pelos peixes podem ocorrer através da superfície branquial. Após a absorção, os efeitos tóxicos dependem essencialmente de vários fatores tais como via de exposição, relação dose-resposta, tempo de exposição e interações nos mecanismos envolvidos no processo de absorção. Na dependência da espécie e dos estágios da vida, a sensibilidade dos organismos ao composto pode variar. Dada a possibilidade de exposição prolongada aos compostos presentes no ambiente, como os NMs, torna-se importante a aplicação de um conjunto de bioensaios na avaliação do perigo potencial, levando em consideração esses fatores. Em consequência, bioensaios como taxas de sobrevivência, malformação, tamanho, eclosão e

biomarcadores bioquímicos podem ser realizados em diferentes organismos expostos em diferentes condições experimentais (Pereira et al., 2021).

O efeito combinado da mistura dos herbicidas ametrina (500 g L^{-1}) e diuron (468 g kg^{-1}) + hexazinona (132 g kg^{-1}) foi avaliado sobre o peixe *D. rerio* (Tesolin et al., 2014). O ensaio foi baseado no teste FET da Organisation for Economic Co-operation and Development (2006), com duração de 96 horas. A partir dos testes agudos individuais, foi possível determinar a $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ para os peixes expostos à ametrina, registrando-se um valor de $53,23 \text{ mg L}^{-1}$. No caso do diuron + hexazinona, a $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ foi determinada em $37,45 \text{ mg L}^{-1}$. Quando em mistura, tanto a ametrina quanto o diuron + hexazinona tornaram-se mais tóxicos para o peixe, em comparação com a exposição individual a cada componente da mistura.

Observou-se ocorrência de edemas, atraso no desenvolvimento embrionário, absorção do saco vitelínico e diminuição na frequência cardíaca a partir das concentrações mais baixas da mistura. Pelos dados obtidos, concluiu-se que a mistura de ametrina e diuron + hexazinona é medianamente tóxica para o zebrafish e que os resultados seriam úteis na determinação de sua toxicidade no estabelecimento de concentrações máximas permissíveis desses herbicidas nos mananciais de água doce, com vistas à preservação de sua biota aquática associada.

Biomarcadores na Avaliação Ecotoxicológica

A importância do uso dos biomarcadores como parâmetros biológicos de exposição às substâncias químicas deve-se ao fato de eles estarem diretamente relacionados aos efeitos na saúde. Assim, um biomarcador que indica a ocorrência de uma dose biologicamente eficaz ou de um dano inicial à saúde pode ser útil na identificação de perigos por meio da associação do composto com o efeito adverso e, em consequência, na determinação das relações dose-resposta e na estimativa do risco dos produtos químicos presentes no ambiente. Além dos organismos não-alvo dos diferentes níveis tróficos, os biomarcadores também podem ser utilizados como parâmetros de exposição dos agricultores aos agroquímicos, em uma proposta interdisciplinar, objetivando subsidiar a sustentabilidade de sistemas produtivos em quatro fases consecutivas, desde o diagnóstico da situação de saúde, até ações de desenvolvimento na área de estudo (Castro et al., 1999a).

Os biomarcadores devem ser de fácil utilização e de baixo custo de obtenção para permitir seu amplo uso. Eles devem mostrar facilidade de levantamento, de compreensão e de comparação, e o nível de detalhamento da medida deve ser adequado. Devem ainda facilitar o relacionamento de causa a efeito e envolver a medida de respostas biológicas, além de trazer informações quanto ao seu mecanismo de ação (Castro, 2004).

Atualmente, uma ampla gama de biomarcadores está disponível, como as mudanças genéticas e moleculares, que tendem a ocorrer primeiro, seguidas por respostas celulares (por exemplo, padrões de expressão gênica, níveis hormonais, atividades de enzimas específicas, estrutura e função de organelas) em tecidos e órgãos, até o nível biológico em que os danos podem se manifestar como prejuízo no crescimento, reprodução, anormalidades de desenvolvimento ou diminuição da sobrevivência (Shugart et al., 1992). Assim, com o monitoramento destas alterações, pode ser avaliado o dano potencial de um agente antes que ocorram perturbações e consequências mais graves. Os biomarcadores podem também ser usados para desenvolver ensaios de triagem rápidos, que podem complementar outras técnicas de teste, reduzindo o número de amostras. Nesse contexto, as técnicas baseadas em biomarcadores têm um papel importante a desempenhar no monitoramento e proteção ambiental (Zucchi et al., 2004).

Em geral, os biomarcadores usados no monitoramento ambiental são classificados em duas categorias principais: exposição e efeito. O biomarcador de exposição é avaliado pela presença de uma substância exógena ou de seu metabólito em um organismo, enquanto um biomarcador de efeito constitui uma alteração (bioquímica, fisiológica, comportamental ou outra) mensurável dentro de um organismo, que pode ser associada a um dano à saúde. De acordo com o documento, o uso dos biomarcadores deve levar em conta também questões éticas e sociais (Organização Mundial da Saúde, 1993). Há também o biomarcador de suscetibilidade ou genético que avalia os mecanismos relacionados à ação tóxica e ao grau de resposta dos indivíduos mas não é muito utilizado no monitoramento ambiental.

Em relação à toxicologia aquática, McCarty e Munkittrick (1996) estabeleceram quatro classes reconhecíveis de biomarcadores: 1) bioquímicos (enzimas, hormônios, metalotioneínas); 2) fisiológicos (crescimento, reprodução); 3) toxicológicos (comportamento, letalidade, teratogenicidade, carcinogenicidade); e 4) ecológicos/comunitários (alterações em estruturas e relações do ecossistema). Essas classes correspondem a diferentes funções e diferentes níveis de organização biológica.

A sensibilidade de um organismo a um poluente pode variar não só na dependência da qualidade ambiental, como luminosidade e temperatura, mas também no nível nutricional, idade, sexo, fase de desenvolvimento, características genéticas do organismo, competição entre indivíduos ou espécies, etc. Várias espécies vêm sendo empregadas internacionalmente em ensaios laboratoriais de testes de toxicidade, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos. No entanto, não existe uma única espécie de organismo que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema. Em consequência, são usados organismos que são fáceis de reproduzir, adaptam-se facilmente às condições do laboratório e são representativos do ambiente em consideração (Castro; Jonsson, 2012).

A seguir, será exemplificado o uso de alguns biomarcadores comumente estudados.

Biomarcadores Bioquímicos (Atividade Enzimática)

Os biomarcadores bioquímicos podem ser utilizados em grande variedade de organismos. Em estudos ecotoxicológicos, geralmente, são avaliadas várias enzimas. Dentre os biomarcadores mais usados, destacam-se as alterações das enzimas de biotransformação, cuja atividade nos organismos pode ser induzida ou inibida após a exposição aos compostos; e as do estresse oxidativo, uma vez que diversos compostos tóxicos ambientais ou seus metabólitos podem levar a efeitos tóxicos desta forma.

A toxicidade do herbicida ametrina para embriões de *D. rerio* foi avaliada usando parâmetros bioquímicos (Moura et al., 2018). Neste estudo, a enzima lactato desidrogenase mostrou resposta satisfatória na menor concentração-teste ($4 \mu\text{g L}^{-1}$), indicando uma alta demanda de energia necessária para lidar com a condição de estresse. Níveis de enzimas antioxidantes foram alterados em concentrações intermediárias e altas, enquanto o dano oxidativo (peroxidação lipídica) foi observado na maior concentração testada (10 mg L^{-1}). As correlações mais importantes foram entre a peroxidação lipídica (LPO) e enzimas do sistema antioxidante, como a glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST). Os resultados sugerem que, assim como para outros herbicidas do grupo das triazinas, o estresse oxidativo é uma das principais vias de toxicidade para ametrina. Concluiu-se que os efeitos subletais foram observados para concentrações na mesma faixa daquelas encontradas no meio ambiente, e, portanto, dado que a ametrina é amplamente usada na cultura canavieira, uma avaliação detalhada de risco deve ser realizada com base no monitoramento de parâmetros subletais e de longo prazo que também devem considerar as misturas como cenários.

Clemente et al. (2014b, 2017, 2019) avaliaram diferentes enzimas de biotransformação, estresse oxidativo e/ou acetilcolinesterase (AChE) como biomarcadores em relação aos possíveis efeitos na atividade de enzimas causadas por diferentes NMs, como TiO_2 NP e OG. Em ambos os casos, as enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e a AChE, em especial, mostraram-se sensíveis à exposição ao NM. Uma vez que a acetilcolina (ACh) desempenha um papel crucial nas sinapses do sistema colinérgico, a inibição da AChE pode afetar o equilíbrio e a locomoção dos animais expostos. Clemente et al. (2019) observaram um aumento na atividade locomotora de larvas de zebrafish aos 5 dias de vida expostas ao OG, mas, aos 7 dias de vida, as larvas não apresentaram diferenças significativas na atividade locomotora. Estas observações evidenciam que alguns mecanismos de homeostase compensatória podem estar envolvidos nos efeitos de desenvolvimento observados no zebrafish. A atividade da AChE pode estar relacionada a problemas no desenvolvimento da larva de peixe no tocante à velocidade e à distância percorrida durante os testes (Clemente et al., 2019) ou, ainda, quanto a alterações morfológicas como a cauda encurvada (Luis et al., 2021). O siste-

ma colinérgico pode estar envolvido em alterações morfológicas como a curvatura da cauda de peixe, devido ao desenvolvimento muscular anormal causado pela inibição de atividade da AChE (Pamanji et al., 2015).

Biomarcadores Fisiológicos (Reprodução, Teratogenicidade, Desenvolvimento)

Muitos biomarcadores diferentes podem ser usados para avaliar o desenvolvimento de um organismo, como danos genéticos, aspectos do desenvolvimento físico, maturação de reflexos etc. A exposição materna a agroquímicos durante a fase reprodutiva pode levar a alterações no desenvolvimento de roedores (Castro, 2013a). Consequentemente, é importante realizar a avaliação dos possíveis efeitos da exposição aos agroquímicos em diferentes períodos de desenvolvimento (Castro et al., 1992).

Além de estudos sobre a fertilidade da mãe e a viabilidade do filhote, podem ser realizados testes para avaliação da cito- e genotoxicidade pela exposição ao produto tanto por meio de testes *in vitro* quanto *in vivo* (Castro; Poli, 2013). Assim, a análise cromossômica com ratas expostas a diferentes concentrações do fungicida mancozeb, nos períodos inicial e de organogênese da gestação, mostrou que o dano cromossômico observado em mães e filhotes aumenta com a concentração do fungicida e pode estar relacionado a dano genético e risco teratogênico para a população exposta (Castro et al., 1999b). Ademais, resultados obtidos *in vitro* com leucócitos de duas espécies diferentes de roedores (rato e camundongo) mostram que o fungicida fenarimol afeta o DNA, conforme detectado pelo ensaio de eletroforese em gel de célula única (*single cell gel electrophoresis* – SCGE, ou ensaio Cometa) de forma dose-dependente. Mais ainda, a exposição simultânea de leucócitos de rato ao fenarimol e a um composto genotóxico modelo (bleomicina) produziu um efeito cito- e genotóxico (Poli et al., 2003). Já ratas expostas ao fenarimol durante o início da gestação (1-6 dias), o final da gestação (últimos 6 dias) ou nos primeiros 6 dias de lactação mostraram um efeito genotóxico, detectado pelo ensaio Cometa, tanto em mães quanto em filhotes. A sensibilidade dos animais ao fenarimol parece ser maior durante o período pós-natal. Como o dano ao DNA aumenta durante o tempo de exposição (2 horas a 6 dias após o nascimento), os dados em filhotes sugerem que o fenarimol pode atuar principalmente no DNA celular por meio da exposição direta da ninhada via lactação (Castro et al., 2005).

Outras questões relacionadas à exposição perinatal devem ser consideradas. Assim, foram estudados os efeitos da exposição pré-natal de AgNP sobre os possíveis efeitos e consequências na prenhez de ratas e no desenvolvimento pós-natal da prole. Atualmente, uma possível abordagem para minimizar a perda de alimentos é a utili-

zação de embalagens microbicidas contendo AgNP, por causa de suas propriedades antimicrobianas. A eficácia inibitória microbiana de embalagens contendo NMs é determinada pelo contato do agente antimicrobiano contido na superfície da embalagem com as bactérias. Porém, é importante avaliar se o nível de migração do NM do conteúdo da embalagem para o alimento pode causar toxicidade. No estudo, foram avaliados a duração da gestação (dias), tamanho da ninhada no nascimento, número de filhotes natimortos, número de filhotes mortos durante o período de lactação, peso do embrião e o ganho médio de peso corporal das mães durante o período gestacional. Os resultados não mostraram efeito sobre a duração da gestação, tamanho da ninhada ao nascimento e número de natimortos, tampouco sobre os parâmetros de desenvolvimento físico avaliados nos filhotes. Contudo, os resultados do estudo indicaram que a exposição materna às NPs pode induzir alterações sutis nos parâmetros reprodutivos da prole, como descida dos testículos e abertura vaginal, mesmo em concentrações que não causam mudanças nos parâmetros de desenvolvimento dos filhotes e reprodução materna (Becaro et al., 2021).

Nos últimos anos, em adição aos roedores, o zebrafish (*D. rerio*) tornou-se um organismo modelo popular para estudos toxicológicos com o uso padronizado de fases iniciais da vida na Diretriz 236 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (teste FET). Nesse contexto, a fim de compreender o papel do dióxido de titânio com MWCNT no meio ambiente, Silva et al. (2018) avaliaram a exposição de embriões de *D. rerio* já que os NMs híbridos podem aumentar a eficácia dos NMs com um único composto. Os resultados não mostraram toxicidade aguda nem efeitos subletais em embriões de *D. rerio* até 100 mg L⁻¹, quando a taxa de eclosão e crescimento foram observados.

A taxa de crescimento algáceo, parâmetro associado à reprodução celular, também pode ser avaliada. A reprodução algácea pode ser tomada como marcador biológico satisfatório na avaliação de risco e monitoramento de áreas degradadas, especialmente por herbicidas. Em um estudo realizado com a microalga *P. subcapitata*, foi realizada a avaliação da toxicidade de NPs poliméricas de quitosana/tripolifosfato contendo ou não o herbicida paraquat, como também a influência de substâncias húmicas na estabilidade do sistema nanopartícula-herbicida (Grillo et al., 2015). Os resultados demonstraram que substâncias húmicas decrescem os efeitos tóxicos das nanopartículas contendo paraquat. Também foi observado que o valor de CE₅₀-96h do herbicida incluído na nanopartícula (CE₅₀-96h = 1,15 mg L⁻¹) foi significativamente superior ao do herbicida isolado (CE₅₀-96h = 0,48 mg L⁻¹), o que corresponde a uma menor toxicidade na primeira situação. Estes resultados são importantes para a compreensão da interação de nanoestruturados com as espécies presentes em ecossistemas aquáticos e com as substâncias húmicas que influenciam os efeitos adversos de agroquímicos.

Biomarcadores Fisiológicos (Comportamento)

O uso de indicadores específicos pode verificar a validade de um modelo utilizado na correlação entre sua medida e a exposição real. Na maioria das vezes, a toxicidade e, em especial, a neurotoxicidade ocasionadas pela exposição a substâncias tóxicas são avaliadas de acordo com algumas baterias de testes. Estes podem ser realizados pela avaliação de alterações de funções cognitivas – como aprendizagem e memória – e comportamentais, com a realização de protocolos experimentais em animais de laboratório. As respostas que envolvem atividade e comportamento são estudadas no contexto de exploração e aprendizagem, memória, novidade e ansiedade. Na dependência do estágio de desenvolvimento do organismo, a utilização de um protocolo experimental contendo índices relacionados à reprodução e ao desenvolvimento animal pode identificar danos comportamentais iniciais devido à exposição a poluentes ambientais. Contudo, o conhecimento da qualidade dos dados auxilia na correta interpretação dos efeitos potenciais da exposição a um poluente químico e abre perspectivas de seu uso na saúde pública (Castro; Silva, 2009).

Um crescente número de evidências sugere que as habilidades de aprendizagem motora são indicadores confiáveis de aquisição comportamental e distúrbios cognitivos e contribuem para estabelecer a extensão potencial desses efeitos cognitivos no neurodesenvolvimento. Nesse sentido, os modelos animais são essenciais para melhorar a compreensão dos mecanismos neuronais subjacentes à exposição aos poluentes. De fato, numerosos estudos demonstraram que os efeitos neurotóxicos agudos observados em modelos pré-clínicos de intoxicação aguda com organofosforados (OP) (Guignet et al., 2020) são amplamente replicados em modelos de intoxicação aguda com roedores.

De fato, a exposição a agroquímicos pode levar a possíveis alterações comportamentais inclusive durante a exposição materna. Por conseguinte, a avaliação dos possíveis efeitos decorrentes da exposição aos agroquímicos é importante de ser realizada em diferentes períodos do desenvolvimento, especialmente naqueles considerados críticos devido à possível influência na morfologia e na fisiologia do sistema nervoso (Castro et al., 2000a, 2000b; Castro; Maia, 2012). Assim, por exemplo, foram observados alguns déficits neuromusculares e comportamentais em filhotes devido à exposição materna ao fungicida fenarimol. As alterações nos filhotes podem ocorrer principalmente durante o último período gestacional e a lactação (Castro et al., 2007a). Além disso, o sulfentrazone pode causar alterações no sistema nervoso do filhote de rato em diferentes estágios de desenvolvimento pós-natal, como evidenciado por alguns atrasos no desenvolvimento de reflexos e coordenação motora (Castro et al., 2007b). Mais ainda, os efeitos da exposição a misturas de agroquímicos podem ser investigados por biomarcadores comportamentais (Castro; Chiorato, 2007).

Assim, a avaliação de efeitos adversos do paclobutrazol – utilizado como fungicida e regulador de crescimento vegetal – na reprodução e no desenvolvimento da ninhada mostrou que ocorreram algumas diferenças nos animais expostos quanto ao estado funcional do sistema nervoso de filhotes de ratos em diferentes estágios do desenvolvimento, mesmo em doses que não causaram toxicidade materna. Nesse sentido, foram observados danos nos filhotes na expressão do reflexo de sobressalto, além de alteração da locomoção observada em uma arena de campo aberto. Contudo, não foram observadas alterações no comportamento de natação. Estes dados fornecem subsídios para estudos adicionais sobre os efeitos potencialmente tóxicos que a exposição das mães a esse pesticida pode ocasionar em suas ninhadas (Castro et al., 2004).

Os biomarcadores comportamentais ainda podem ser usados em uma grande variedade de objetivos experimentais. Dessa forma, alterações comportamentais, como aquelas observadas em testes de tarefas motoras e exploratórias, podem ser observadas devido à subnutrição, refletindo a maturação atrasada de estruturas responsáveis pelas respostas sensorio-motoras, como o cerebelo, pois grande parte da maturação cerebelar ocorre após o nascimento (Barbosa et al., 2016).

Alguns ensaios comportamentais também permitem a análise e caracterização de paralelos entre espécies, gerando achados valiosos para estudos evolutivos e comparativos. Essas ferramentas avaliam comportamentos que são conservados em modelos animais como zebrafish e roedores. O zebrafish (*D. rerio*) pode ser usado para estudar e modelar a toxicidade de eventos, desde modificações em nível celular até mudanças no fenótipo, incluindo alterações no crescimento e desenvolvimento ou comportamento. O aumento da utilização e padronização de ensaios comportamentais em peixes adultos fornece resultados de alta qualidade e demonstra possíveis alterações funcionais da exposição aos xenobióticos (Figura 14.5).

Estes biomarcadores comportamentais podem ser usados também para auxiliar a avaliação do emprego de polímeros naturais na nanoencapsulação de nutrientes para uso na aquicultura (Luis et al., 2021).

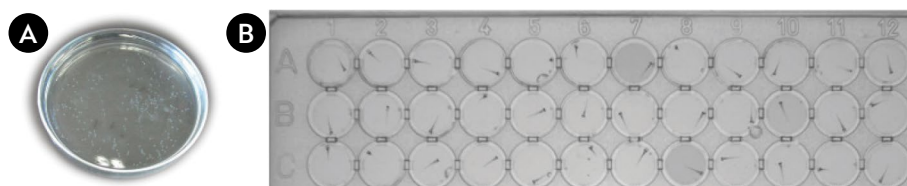


Figura 14.5. (A) Larvas de zebrafish; (B) Avaliação comportamental da larva de forma individual.

Em termos de neurotoxicidade, o zebrafish fornece um modelo poderoso para investigar mudanças no sistema nervoso devido à exposição a vários compostos, oferecendo a capacidade de estudar seus mecanismos de ação (Fitzgerald et al., 2021). Nesse contexto, a exposição a NMs, como o OG, foi capaz de induzir alterações não só bioquímicas e morfológicas, mas também comportamentais, em larvas de zebrafish (Clemente et al., 2019).

ASPECTOS DE BIOACUMULAÇÃO NOS ORGANISMOS

Bioacumulação é um processo frequente em compartimentos aquáticos pelo qual compostos químicos são absorvidos pelos organismos de forma direta a partir do ambiente (solo, sedimento, água), ou de forma indireta, pela ingestão de alimentos que contêm esses compostos. Estes devem possuir uma certa lipossolubilidade para serem retidos nos tecidos do organismo e permitir que a sua taxa de absorção e armazenamento seja mais elevada que a de excreção.

A bioacumulação ocorre quando a velocidade de absorção de um composto excede sua velocidade de eliminação, resultando em acúmulo no organismo. Enquanto a bioacumulação é a ingestão de uma substância química e sua concentração no organismo por todos os meios possíveis, incluindo contato, respiração e ingestão, a bioconcentração é a ingestão e retenção de uma substância em um organismo inteiro pela respiração através da água (em ecossistemas aquáticos), ou do ar (em ecossistemas terrestres). Por outro lado, a biomagnificação ocorre quando o produto químico passa pela cadeia alimentar para níveis tróficos mais elevados, de modo que, em predadores, excede a concentração esperada para o equilíbrio entre um organismo e seu ambiente (Alexander, 1999).

A bioconcentração é a forma mais direta de avaliar o acúmulo de substâncias em organismos aquáticos. É um fenômeno importante para observar a manifestação de efeitos subletais do composto em organismos não-alvo e para prevenir a contaminação de organismos aquáticos utilizados como alimentos para o consumo humano. É estimada pelo fator de bioconcentração (FBC), que é a relação entre a concentração da substância no tecido do organismo (C_o) e a concentração na água (C_a), quando for atingido o equilíbrio aparente durante a fase de acúmulo do composto. Entretanto, este fator pode também ser calculado pela relação da constante de assimilação pela constante de eliminação. A avaliação da bioconcentração é importante para calcular parâmetros da cinética do produto e compará-los com outros compostos e outras espécies, além de contrastar seu acúmulo no organismo com os valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) propostos pela Organização Mundial da Saúde. Por meio dos ensaios de avaliação da bioconcentração, pode-se também estudar a redução do composto nos tecidos do organismo quando cessa a exposição e calcular o tempo de de-

pleção de resíduos para atingir níveis no produto alimentar que estejam de acordo com a legislação vigente.

Em um estudo com o fungicida e regulador de crescimento vegetal paclobutrazol, estudou-se sua bioconcentração no peixe pacu prata (*Metynnis argenteus*) (Jonsson et al., 2002). Ao final da exposição (28º dia), a concentração de paclobutrazol determinada em músculo atingiu níveis residuais de 166 mg kg⁻¹ para a concentração média de 2,7 mg L⁻¹ determinada na água. O FBC estimado para o paclobutrazol na situação de equilíbrio foi equivalente a 73, classificando-o como “medianamente bioconcentrável”. De acordo com valor estimado de FBC, e com o valor da IDA para o paclobutrazol de 0,1 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, a concentração máxima permitida do ingrediente ativo em corpos d’água para evitar efeitos adversos quanto ao consumo do peixe seria equivalente a 0,2 mg L⁻¹. Este valor foi estimado com base na concentração na água que seria atingida pela aplicação direta da dose máxima recomendada do paclobutrazol (3,0 kg i.a. ha⁻¹) sobre uma lâmina de água de 150 cm e considerando-se o consumo diário de 500 g de peixe por um indivíduo adulto de 70 kg.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos ecotoxicológicos estão focados no aprimoramento e desenvolvimento de novos métodos para avaliar o impacto da toxicidade dos poluentes em organismos vivos e ecossistemas. A toxicidade dos xenobióticos e dos contaminantes emergentes tem estimulado o desenvolvimento de métodos e o aprimoramento de procedimentos analíticos capazes de avaliar seus efeitos biológicos. Embora as respostas dos biomarcadores possam ser difíceis de interpretar, a integração de suas várias medidas pode sinalizar inequivocamente um dano.

Nesse contexto, a qualidade ambiental poderá ser melhor avaliada através do biomonitoramento com o uso de animais-sentinela em conjunto com o desenvolvimento de biomarcadores moleculares. Para tanto, os métodos de proteômica oferecem uma abordagem atraente para o estudo das respostas moleculares iniciais dos organismos aos estressores ambientais. Esta abordagem poderá ser usada para identificar as vias de toxicidade, quantificar mais precisamente os novos biomarcadores e traçar as possíveis vias de resultados adversos (Gouveia et al., 2019).

Levando em consideração a necessidade de realizar esforços para melhor compreender as propriedades toxicológicas e ecotoxicológicas dos poluentes ambientais e o papel dos organismos nos processos de transferência de poluentes, o fornecimento de dados sob uma perspectiva abrangente e integrada torna-se uma importante contribuição para a promulgação de normas de proteção ao meio ambiente. Portanto, terá importância crescente a cooperação interdisciplinar de pesquisadores e profissionais atuantes (físicos, químicos, biólogos, farmacêuticos etc.) com o objetivo de alcançar

uma melhor compreensão dos complexos mecanismos que regulam a transferência e atividade de poluentes e seus efeitos sobre diferentes organismos-alvo.

Uma vez que os testes ecotoxicológicos permitem avaliar a atividade de substâncias em diferentes níveis, seus resultados têm o potencial de direcionar controles, regulamentos, leis e outras atividades destinadas a preservar o ambiente, além de possibilitar a articulação dos diversos setores públicos e privados relacionados à saúde ambiental. Os resultados obtidos com o uso de bioindicadores podem contribuir para o estabelecimento de limites máximos permissíveis de xenobióticos no compartimento aquático e, em consequência, para políticas públicas no Brasil.

Assim, espera-se que as ações geradas pelos resultados obtidos a partir de novos estudos contribuam para a produção e compilação de um conjunto de dados que servirá para auxiliar futuramente a análise dos possíveis efeitos tóxicos causados pelos agroquímicos junto aos órgãos reguladores.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. P. de; OLIVEIRA, J. L. de; MACHADO, L. dos S.; RICHARDI, V. S.; SILVA, M. A. N. da; POMPEO, M. L. M.; FRACETO, L. F.; CARLOS, V. M. Use of nontarget organism *Chironomus sancticaroli* to study the toxic effects of nanoatrazine. *Ecotoxicology*, v. 30, p. 733-750, 2021.
- ALBUQUERQUE, F. P. de; PREISLER, A. C.; FRACETO, L. F.; OLIVEIRA, H. C.; CASTRO, V. L. S. S. de. Overview of nanopesticide environmental safety aspects and regulatory issues: the case of nanoatrazine. In: FRACETO, L. F.; CASTRO, V. L. S. S. de; GRILLO, R.; ÁVILA, D.; OLIVEIRA, H. C.; LIMA, R. de (ed.). **Nanopesticides: from research and development to mechanisms of action and sustainable use in agriculture**. Cham: Springer, 2020. p. 281-298.
- ALEXANDER, D. E. Bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification. In: **ENVIRONMENTAL Geology**: Encyclopedia of Earth Science. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999. p. 43-44.
- BARBOSA, D. S. **Análise da interação entre substâncias húmicas e xenobióticos através de estudos ecotoxicológicos**: proposta para a geração de tecnologias de detoxificação aquática. 2008. 109 f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- BARBOSA, E. H.; VALLIM, J. H.; LACHAT, J. J.; CASTRO, V. L. S. S. de. Assessments of motor abnormalities on the grid-walking and foot-fault tests from undernutrition in wistar rats. *Journal of Motor Behavior*, v. 48, n. 1, p. 5-12, 2016.
- BASU, P.; PAL, A. Spatio-temporal analysis of development of basal roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Signaling and Behavior*, v. 6, n. 7, p. 982-985, 2011.
- BAUTISTA, O. V.; FISCHER, G.; CARDENAS, J. F. Cadmium and chromium effects on seed germination and root elongation in lettuce, spinach and Swiss chard. *Agronomía Colombiana*, v. 31, p. 48-57, 2013.
- BECARO, A. A.; OLIVEIRA, L. P. de; CASTRO, V. L. S. S. de; SIQUEIRA, M. C.; BRANDAO, H. de M.; CORREA, D. S.; FERREIRA, M. D. Effects of silver nanoparticles prenatal exposure on rat offspring development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 81, article 103546, 2021.
- BLAISE, C.; GAGNÉ, F.; HARWOOD, M.; QUINN, B.; HANANA, H. Ecotoxicity responses of the freshwater cnidarian *Hydra attenuata* to 11 rare earth elements. *Ecotoxicology. And Environmental Safety*, v. 163, p. 486-491, 2018.
- BONANI, F. **Avaliação de deformidades morfológicas em larvas de *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) na bacia do rio Piracicaba e sua aplicação no biomonitoramento**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- BRAIN, R. A.; SOLOMON K. R. A protocol for conducting 7-day daily renewal tests with *Lemna gibba*. *Nature Protocols*, v. 2, n. 4, p. 979-987, 2007.
- BURTON JUNIOR, A. G.; BAUDO, R.; BELTRAMI, M.; ROWLAND, K. Assessing sediment contamination using six toxicity assays. *Journal of Limnology*, v. 60, n. 2, p. 263-267, 2001.
- CASTRO, V. L. S. S. de. Aspectos da exposição ambiental aos agroquímicos e a avaliação de seus efeitos no desenvolvimento animal. *Cadernos de Ciência e Tecnologia*, v. 21, n. 3, p. 469-497, 2004.

CASTRO, V. L. S. S. de. Neurotoxicants: developmental experimental testing. In: JORGENSEN S. E. (ed.). **Encyclopedia of Environmental Management**. New York: Taylor & Francis: 2013a. v. III, p. 1777-1782.

CASTRO, V. L. S. S. de. **Uso de animais de experimentação e legislação correlata: orientações sobre estudos com peixes e roedores**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2013b. 27 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 94).

CASTRO, V. L. S. S. de; BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Evaluation of prenatal aldrin intoxication in rats. **Archives of Toxicology**, v. 66, p. 149-152, 1992.

CASTRO, V. L. S. S. de; CHIORATO, S. Evaluation of pesticides mixtures effects on the development of suckling rats. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, n. 2, p. 169-176, 2007.

CASTRO, V. L. S. S. de; CHIORATO, S.; PINTO, N. Biological monitoring of embryo-fetal exposure to methamidophos or chlorothalonil on rat development. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 6, p. 361-365, 2000b.

CASTRO, V. L. S. S. de; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**, v. 118, n. 1-2, p. 93-102, 2000a.

CASTRO, V. L. S. S. de; CLEMENTE, Z.; JONSSON, C. M.; SILVA, M. S. G. M. e; VALLIM, J. H.; MEDEIROS, A. M. Z. de; MARTINEZ, D. S. T. Nanoecotoxicity assessment of graphene oxide and its relationship with humic acid. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, W 7, p. 1998-2012, 2018.

CASTRO, V. L. S. S. de; DESTEFANI, C. R.; DINIZ, C. A. R.; POLI, P. Evaluation of neurodevelopmental effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 6, p. 1249-1259, 2007b.

CASTRO, V. L. S. S. de; GOES, K. P.; CHIORATO, S. H. Developmental toxicity potential of paclobutrazol in the rat. **International Journal of Environmental Health Research**, London, v. 14, n. 5, p. 371-380, out. 2004.

CASTRO, V. L.; JONSSON, C. M. Proposta conceitual de estudo para a integração e gerenciamento do uso de marcadores bioquímicos de contaminação ambiental. **Biotemas**, v. 25, n. 1, p. 159-170, 2012

CASTRO, V. L. S. S. de; MAIA, A. de H. N. Prenatal epoxiconazole exposure effects on rat postnatal development. **Birth Defects Research. Part B. Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 95, p. 123-129, 2012.

CASTRO, V. L. S. S. de; MELLO, M. A. de; DINIZ, C. A. R.; MORITA, L. H. M.; ZUCCHI, T.; POLI, P. Neurodevelopmental effects of perinatal fenarimol exposure on rats. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 98-105, 2007a.

CASTRO, V. L. S. S. de; MELLO, M. A. de; POLI, P.; ZUCCHI, T. M. A. D. Prenatal and perinatal fenarimol-induced genotoxicity in leukocytes of in vivo treated rats. **Mutation Research**, v. 583, v. 1, p. 95-104, 2005.

CASTRO, V. L. S. S. de; POLI, P. Pollution: genotoxicity of agrotoxic compounds. In: JORGENSEN S. E. (ed.). **Encyclopedia of Environmental Management**. New York: Taylor & Francis, 2013. v. III, p. 2147-2159.

CASTRO, V. L. S. S. de; SILVA, P. A. Validation of neurobehavioral studies for evaluating the perinatal effects of single and mixture exposure to pesticides. In: KANZANTZAKIS, C. M. (ed.). **Progress in pesticides research**. New York: Nova Science Publishers, 2009. p. 371-395

CASTRO, V. L. S. S. de; SILVEIRA, M.; PEREZ, M. Application of clinical indicators of exposition in the evaluation of family agriculture health: the Sumaré case – Brazil. **The International Journal of Sustainable Development and World Ecology**, v. 6, n. 3, p. 172-184, 1999a.

CASTRO, V. L. S. S. de; TAMBASCO, A. J.; PARAIBA, L. C.; TAMBASCO, D. D. Cytogenetic and teratological effects of mancozeb pre natal exposure on rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 2, p. 127-134, 1999b.

CETESB. KUHLMANN, M. L.; FORNASARO, G. J.; OGURA, L. L.; IMBIMBO, H. R. V. Protocolo para o bio-monitoramento com as comunidades bentônicas de rios e reservatórios do estado de São Paulo. São Paulo: CETESB, 2012. 113 p. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2013/11/protocolo-biomonitoramento-2012.pdf>. Acesso em: 3 ago. 2021.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L. S. S. de; FEITOSA, L. O.; LIMA, R.; JONSSON, C. M.; MAIA, A. de H. N.; FRACETO, L. F. Fish exposure to nano-TiO₂ under different experimental conditions: methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. **Science of the Total Environment**, v. 463-464, p. 647-656, 2013.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L. S. S. de; FEITOSA, L. O.; LIMA, R.; JONSSON, C. M.; MAIA, A. de H. N.; FRACETO, L. F. Biomarker evaluation in fish after prolonged exposure to nano-TiO₂: influence of illumination conditions and crystal phase. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 7, p. 5424-5433, 2015.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L. S. S. de; JONSSON, C. M.; FRACETO, L. F. Minimal levels of ultraviolet light enhance the toxicity of TiO₂ nanoparticles to two representative organisms of aquatic systems. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 8, article 2259, 2014a.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L. S. S. de; MOURA, M. A. M.; JONSSON, C. M.; FRACETO, L. F. Toxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 147, p. 129-139, 2014b.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L. S. S. de; JONSSON, C. M.; FRACETO, L. F. Ecotoxicology of nano-TiO₂: an evaluation of its toxicity to organisms of aquatic ecosystems. **International Journal of Environmental Research**, v. 6, n. 1, p. 33-50, 2012.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L. S. S. de; FRANQUI, L.; SILVA, C. A.; MARTINEZ, D. S. T. Nanotoxicity of graphene oxide: assessing the influence of oxidation debris in the presence of humic acid. **Environmental Pollution**, v. 225, p. 118-128, 2017.

CLEMENTE, Z.; SILVA, G. H. da; NUNES, M. C. S.; MARTINEZ, D. S. T.; MAURER-MORELLI, C. V.; THOMAZ, A. A.; CASTRO, V. L. S. S. de. Exploring the mechanisms of graphene oxide behavioral and morphological changes in zebrafish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 29, p. 30508-30523, 2019.

CÔA, F.; STRAUSS, M.; CLEMENTE, Z.; RODRIGUES NETO, L. L.; LOPES, J. R.; ALENCAR, R. S.; SOUZA FILHO, A. G.; ALVES, O. L.; CASTRO, V. L. S. S. de; BARBIERI, E.; MARTINEZ, D. S. T. Coating carbon nanotubes with humic acid using an eco-friendly mechanochemical method: Application for Cu(II) ions removal from water and aquatic ecotoxicity. **Science of the Total Environment**, v. 607-608, p. 1479-1486, 2017.

DURÁN, N.; MARTINEZ, D. S. T.; JUSTO, G. Z.; LIMA, R. de; CASTRO, V. L. S. S. de; UMBUZEIRO, G. de A.; BARBIERI, E.; DURÁN, M.; MELO, P. da S.; ALVES, O. L.; FÁVARO, W. J. Interlab study on nanotoxicology of representative graphene oxide. **Journal of Physics**, v. 617, p. 1-9, 2015. Edition of the

proceedings 4th International Conference on Safe Production and Use Nanomaterials (Nanosafe 2014) 18-20 November 2014, held a Grenoble, France.

FENWICK, N.; GRIFFIN, G.; GAUTHIER, C. The welfare of animals used in science: ow the “Three Rs” ethic guides improvements. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 50, n. 5, p. 523-530, 2009.

FITZGERALD, J. A.; KÖNEMANN S.; KRÜMPELMANN, L.; ŽUPANIC, A.; VOM BERG, C. Approaches to test the neurotoxicity of environmental contaminants in the Zebrafish model: from behavior to molecular mechanisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 40, n. 4, p. 989-1006, 2021

FÖRSTNER, U. Geochemical techniques on contaminated sediments-river basin view. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 10, p. 58-68, 2003.

FÖRSTNER, U. Traceability of sediment analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 3, p. 217-236, 2004.

GONÇALVES, S. P. C.; STRAUSS, M.; DELITE, F. S.; CLEMENTE Z.; CASTRO, V. L. S. S. de; MARTINEZ D. S. T. Activated carbon from pyrolysed sugarcane bagasse: Silver nanoparticle modification and ecotoxicity assessment. *Science of the Total Environment* v. 565, p. 833-840, 2016

GOUVEIA, D.; ALMUNIA, C.; COGNE, Y.; PIBLE, O.; DEGLI-ESPOSTI, D.; SALVADOR, A.; CRISTOBAL, S.; SHEEHAN, D.; CHAUMOT, A.; GEFFARD, O.; ARMENGAUD, J.; Ecotoxicoproteomics: a decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment, *Journal of Proteomics*, v. 198, p. 66-77, 2019.

GRILLO, R.; CLEMENTE, Z.; OLIVEIRA, J. L. de; CAMPOS, E. V. R.; CHALUPE, V. C.; JONSSON, C. M.; LIMA, R.; SANCHES, G.; NISHISAKA, C. S.; ROSA, A. H.; OEHLKE, K. Chitosan nanoparticles loaded the herbicide paraquat: the influence of the aquatic humic substances on the colloidal stability and toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, v. 286, p. 562-572, 2015.

GUIGNET, M.; DHAKAL, K.; FLANNERY, B. M.; HOBSON, B. A.; ZOLKOWSKA, D.; DHIR, A.; BRUUN, D. A.; LI, S.; WAHAB, A.; HARVEY, D. J.; SILVERMAN, J. L.; ROGAWSKI, M. A.; LEIN, P. J. Persistent behavior deficits, neuroinflammation, and oxidative stress in a rat model of acute organophosphate intoxication. *Neurobiology of Disease*, v. 133, article 104431, 2020.

HANNAS, B. R.; DAS, P. C.; LI, H.; LeBLANC, G. A. Intracellular conversion of environmental nitrate and nitrite to nitric oxide with resulting developmental toxicity to the crustacean *Daphnia magna*. *PLOS One*, v. 5, n. 8, el2453, 2010.

HECKMAN, L.; SUTHERLAND, D. S.; BESENBACHER, F.; HOVGGAARD, M. B.; AUTRUP, H.; SCOTT-FORDSMAN, J. J. Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology*, v. 20, p. 226-233, 2011.

IOWA STATE UNIVERSITY. Departament of Plant Pathology, Entomology, and Microbiology. **BugGuide**. Plymouth Rock, 2011. Disponível em: <https://bugguide.net/node/view/546717>. Acesso em: 12 maio 2023.

JACQUES, M. T.; OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; FRACETO, L. F.; ÁVILA, D. S. Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 139, p. 245-253, 2017.

- JONSSON, C. M.; SILVA, M. S. G. M. e; MACEDO, V. S. de; DANTZGER, D. D.; VALLIM, J. H.; MARIGO, A. L. S.; AOYAMA, H. Prediction of a low-risk concentration of diflubenzuron to aquatic organisms and evaluation of clay and gravel in reducing the toxicity. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 10, n. 4, p. 259-272, 2015.
- JONSSON, C. M.; FERRACINI, V. L.; PARAIBA, L. C.; RANGEL, M.; AGUIAR, S. R. Alterações bioquímicas e acúmulo em pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 441-446, 2002
- KOPP, R.; LEGLER, J.; LEGRADI, J. Alterations in locomotor activity of feeding zebrafish larvae as a consequence of exposure to different environmental factors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 5, p. 4085-4093, 2018.
- KUHLMANN, M. L.; HAYASHIDA C. Y.; ARAÚJO, R. P. A. Using Chironomus (Chironomidae: Diptera) mentum deformities in environmental assessment. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 12, n. 1, p. 55-61, 2000.
- LORENZ, M. **SAG 61.81 *Raphidocelis subcapitata***. Göttingen: Georg August Universität, Department Experimental Phycology and Culture Collection of Algae, 2016. Disponível em: https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=61.81. Acesso em: 12 maio 2023.
- LUIS, A. I. S.; CAMPOS, E. V. R.; OLIVEIRA, J. L. de; GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R. de; CASTANHA, R. F.; CASTRO, V. L. S. S. de; FRACETO, L. F. Zein nanoparticles impregnated with eugenol and garlic essential oils for treating fish pathogens. **ACS Omega**, v. 5, n. 25, p. 15557-15566, 2020.
- LUIS, A. I. S.; CAMPOS, E. V. R.; OLIVEIRA, J. L. de; VALLIM, J. H.; PROENÇA, P. L. de F.; CASTANHA, R. F.; CASTRO, V. L. S. S. de; FRACETO, L. F. Ecotoxicity evaluation of polymeric nanoparticles loaded with ascorbic acid for fish nutrition in aquaculture. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, article 163, 2021. p. 1-22.
- MACKLIN, M. G.; BREWER P. A.; HUDSON-EDWARDS, K. A.; BIRD, G.; COULTHARD, T. J.; DENNIS, I. A.; LECHLER, P. J.; MILLER, J. R.; TURNER, J. N. A geomorphological approach to the management. **Geomorphology**, v. 79, n. 3-4, p. 423-447, 2006.
- MCCARTY, L. S.; MUNKITTRICK, K. R. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: fiction, fantasy, or functional? **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 2, n. 2, p. 268-274, 1996.
- MEDEIROS, A.; KHAN, L. U.; SILVA, G. H. da; OSPINA, C. A.; ALVES, O. L.; CASTRO, V. L. S. S. de; MARTINEZ, D. S. T. Graphene oxide-silver nanoparticles hybrid material: an integrated nanosafety study in zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, article 111776, 2021.
- MOURA, M. A. M.; OLIVEIRA, R.; JONSSON, C. M.; DOMINGUES, I.; SOARES, A. M. V. M.; NOGUEIRA, A. J. A. The sugarcane herbicide ametryn induces oxidative stress and developmental abnormalities in zebrafish embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 13416-13425, 2018.
- MURPHY, F.; QUINN, B. The effects of microplastic on freshwater *Hydra attenuata* feeding, morphology and reproduction. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 487-494, 2018.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guideline for Testing of Chemicals. Fish Embryo Toxicity (FET) Test**. Paris, 2006.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No.203: fish, acute toxicity test**. Paris, 1992. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals).

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No.236:** Fish embryo acute toxicity (FET) test. Paris, 2013. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.** Vammala, 1993. 82 p.

PAMANJI, R.; YASHWANTH, B.; BETHU, M. S.; LEELAVATHI, S.; RAVINDER, K.; VENKATESWARA, R. J. Toxicity effects of profenofos on embryonic and larval development of Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 887-897, 2015.

PARAIBA, L.; CASTRO, V.; MAIA, A. Insecticide distribution model in human tissues viewing worker's health monitoring programs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 875-882, 2009

PARK, S.; CHOI, J. Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol A exposure in aquatic biomonitoring species: Freshwater crustacean, *Daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 463-468. 2009.

PARKER, M. O. Adult vertebrate behavioural aquatic toxicology: reliability and validity. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 323-329, 2016.

PEREIRA, F. F.; FERREIRA, M. D.; JONSSON, C. M.; JESUS K. R. E. de; CASTRO, V. L. S. S. de; CORREA, D. S. Toxicity of engineered nanostructures in aquatic environments. In: KUMAR, V.; GULERIA, P.; RANJAN, S.; DASGUPTA, N.; LICHTFOUSE, E. (ed.). **Nanotoxicology and nanoecotoxicology: vol. I: environmental chemistry for a sustainable world.** Cham: Springer, 2021. p. 171-202.

POLI, P.; MELLO, M. A.; BUSCHINI, A.; CASTRO, V. L. S. S. de; RESTIVO, F.; ROSSI, C.; ZUCCHI, T. Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 540, p. 57-66, 2003.

POLITZ, S. M.; PHILIPP, M. *Caenorhabditis elegans* as model for parasitic nematodes: A focus on the cuticle. **Parasitology Today**, v. 8, n. 1, p. 6-12, 1992.

PRADHAN, S.; MAILAPALLI, D. R. Interaction of engineered nanoparticles with the agri-environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 38, p. 8279-8294, 2017.

PRESTES, E. B.; JONSSON, C. M.; CASTRO, V. L. S. S. de. Avaliação da toxicidade de piraclostrobin, epoxiconazol e sua mistura em alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Pesticidas**, v. 21, p. 39-46, 2011.

PRESTES, E. B.; JONSSON, C. M.; CASTRO, V. L. S. S. de. Avaliação da toxicidade aguda de piraclostrobin, epoxiconazol e sua mistura em *Daphnia similis*. **Pesticidas**, v. 22, p. 43-50, 2012.

PRESTES, E. B.; JONSSON, C. M.; CASTRO, V. L. S. S. de.; PARAIBA, C. C. M. Avaliação da toxicidade crônica de piraclostrobin, epoxiconazol e sua mistura em *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, p. 113-117, 2013.

PUSCEDDU, F. H. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados de água doce com ênfase em ensaios com sedimento marcado ("spiked sediment")**. 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SALES, S. C. M. **Reavaliação ecotoxicológica da qualidade da água e do sedimento do reservatório da Pampulha (MG) e seus principais tributários**. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SALOMÃO, A. L. S.; HAUSER-DAVIS, R.A.; MARQUES, M. Critical knowledge gaps and relevant variables requiring consideration when performing aquatic ecotoxicity assays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, article 110941, 2020.

SALOMONS, W.; BRILS, J. **Contaminated sediments in european river basins, Netherlands**: European Sediment Research Network (SedNet). 2004. 80 p.

SANSEVERINO, A. M.; NESSIMIAN, J. L. Assimetria flutuante em organismos aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 382-405. 2008.

SHUGART, L. R.; MCCARTHY, J. F.; HALBROOK, R. S. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. **Risk Analysis**, v. 12, n. 3, p. 353-360, 1992.

SILVA, G. H.; CLEMENTE, Z.; KHAN, L. U.; COA, F.; NETO, L.; CARVALHO, H.; CASTRO, V. L. S. S. de; MARTINEZ, D. S. T.; MONTEIRO, R. Toxicity assessment of TiO₂-MWCNT nanohybrid material with enhanced photocatalytic activity on *Danio rerio* (Zebrafish) embryos, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 165, p. 136-143, 2018.

SILVA, L. A. G. A. da; JONSSON, C. M.; SILVA, M. S. G. M. e. Estudos preliminares sobre o efeito toxicológico de nanopartículas de prata sobre *Chironomus sancticaroli*. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13.; 2019, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico, 2019. Artigo 19416.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: CASTILLO MORALES, G. (ed.) **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**. Jiutepec: IMTA, p. 71-79. 2004.

TESOLIN, G. A. S.; MARSON, M. M.; JONSSON, C. M.; NOGUEIRA, A. J. A.; FRANCO, D. A. S.; ALMEIDA, S. D. B.; MATALLO, M. B.; MOURA, M. A. M. Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*). **O Mundo da Saúde (Online)**, v. 38, p. 86, 2014.

WANG, W. Literature review on duckweed toxicity testing. **Environmental Research**, v. 52, n. 1, p. 7-2, 1990.

YAO, H.; XU, X.; ZHOU, Y.; XU, C. Impacts of isoprazam exposure on the development of early-life zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 24, p. 23799-23808, 2018.

ZHANG, Y.; MENG, T.; GUO, X.; YANG, R.; SI, X.; ZHOU, J. Humic acid alleviates the ecotoxicity of graphene-family materials on the freshwater microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Chemosphere**, v. 197, p. 749-775, 2018.

ZUCCHI, T. M.; POLI, P.; MELO, M. A.; ZUCCHI, F. D.; ZUCCHI, T. D.; CASTRO, V. L. S. S. de. **Biomarcadores: Sentinelas ambientais**. In: BINSFELD, P. C. (org.). **Biossegurança em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciências, 2004. p. 171-184.