



Universidade Federal do Maranhão

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação

**GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO BIOCIDA
ANTI-INCRUSTANTE CLOROTALONIL NA ESPÉCIE
Micropogonias furnieri, Desmarest, 1823**

MURYLLO SANTOS CASTRO

SÃO LUÍS

2017

MURYLLO SANTOS CASTRO

**GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO BIOCIDA
ANTI-INCRUSTANTE CLOROTALONIL NA ESPÉCIE
Micropogonias furnieri, Desmarest, 1823**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientador (a): Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos

Co-orientador (a): Prof. Dr. Luis Fernando Carvalho
Costa

SÃO LUÍS

2017

Muryllo Santos Castro

Genotoxicidade e mutagenicidade do biocida anti-incrustante clorotalonil na espécie *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823/ Muryllo Santos Castro – São Luís, MA, 2017

Orientador: Ricardo Luvizotto Santos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, 2017.

MURYLLO SANTOS CASTRO

**GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO BIOCIDA
ANTI-INCRUSTANTE CLOROTALONIL NA ESPÉCIE
Micropogonias furnieri, Desmarest, 1823**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dra. Marianna Basso Jorge
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta
Universidade Estadual do Maranhão

“Não está morto quem peleia!”

Esta dissertação é dedicada à minha família

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Maranhão, Campus Dom Delgado, por ter sido um ambiente de constante formação pessoal e profissional.

Aos laboratórios de Genética e Biologia Molecular e Ecotoxicologia, que se fizeram não só ambiente de trabalho, mas, também foram casa durante o mestrado.

Ao Laboratório de Aquicultura (AquaLab), na pessoa do professor Walter Muedas.

Ao meu orientador Ricardo Luvizotto Santos, minha total admiração. Agradeço pela oportunidade de poder trabalhar em seu grupo de pesquisa, pela confiança depositada em mim, pela sua amizade, ajuda, por dividir experiências, ensinamentos, e estar sempre disposto a tirar minhas dúvidas com total paciência.

Ao meu co-orientador Luis Fernando Carvalho Costa por ter me acompanhado desde a graduação com seus ensinamentos e por continuar contribuindo também nessa etapa da minha vida acadêmica.

À professora Marianna Basso Jorge, pela participação direta nesse trabalho, pelas dúvidas tiradas, por sempre ser tão solícita e paciente em compartilhar seus conhecimentos. Você é uma grande referência para mim.

Às amigas que fortaleci durante esses dois anos.

Meus companheiros de turma: Ana Cassia, Beldo, Francisco, Leandro, Gustavo, Nathalia, Keila, Jardeani, Ingrid, Carlos, Susane e Luciana.

Aos amigos do LabGeM em especial à professora Silma, professora Vera, Vanessa, Hugo, Israel (meu brother), Raissa, Meydson, Natalia, Gustavo, Augusto, Elidy e minha grande amiga Patricia Valéria.

Li uma vez algo que me chamou atenção e de fato é uma verdade: “São poucas as conquistas em que há apenas um vencedor”. Esse trabalho foi realizado com o apoio de vários amigos, então expresso aqui minha gratidão pela ajuda dos meus companheiros do Laboratório de Ecotoxicologia que de uma forma ou outra sempre estavam dispostos a contribuir, em especial à Ana Paula (sempre solícita), Lis Maria, Alaine, Jacyara, Thamires, Igor Hamid e minha querida Daniela Boaes (Danny)

Ao amigo Paulo Victor por ter compartilhado comigo seus conhecimentos em aquicultura e ter sido um grande parceiro durante o processo mais difícil da execução desse trabalho, o período de aclimatação e coletas. Valeu pela ajuda!

À Larissa Penha pela amizade, companheirismo, dúvidas tiradas, pelas discussões sobre ecotoxicologia que tanto amamos, por aguentar minhas reclamações e desesperos quando

as coisas apertavam, por ter se doado e se esforçado para que esse trabalho fosse concluído.

Às mulheres da minha vida (Mãe, tias e irmã) por todo o apoio emocional e financeiro, por depositarem confiança em mim e me ajudarem a dar cada passo rumo aos meus objetivos.

À CAPES pelo financiamento dessa pesquisa.

E por último e não menos importante, à Deus.

RESUMO

O processo de bioincrustação consiste na instalação e crescimento de organismos marinhos em superfícies submersas ou semi submersas na água, e é considerado um dos grandes problemas relacionados à navegação e manutenção de estruturas portuárias. O uso das pinturas anti-incrustantes é a principal forma de combater estas bioincrustações, entretanto, alguns dos princípios ativos das formulações atuais causam efeitos adversos aos organismos não-alvo. O estudo de biomarcadores em organismos expostos aos agentes xenobióticos é de grande importância para a Ecotoxicologia, sobretudo na identificação de substâncias com potencial genotóxico. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do anti-incrustante clorotalonil sobre o DNA de peixes, utilizando como organismo-teste a espécie estuarina *M. furnieri*. Os juvenis foram coletados no município de Raposa – Ma e mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia (LabEcotox) da Universidade Federal do Maranhão, onde foram aclimatados por 11 dias em tanques de PVC com sistema de recirculação (filtração mecânica e biológica) temperatura $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C, salinidade 20 g/kg e fotoperíodo (12/12h), recebendo alimentação (camarões frescos) *ad libitum*. Ao final do período de aclimação, os peixes foram separados em quatro grupos experimentais, sendo que em cada grupo, 20 indivíduos foram injetados intraperitonealmente com 1µL/g de solução contendo: 1) Controle negativo - o veículo constituído por solução fisiológica e DMSO (90:1, v:v); 2) Controle Positivo - ciclofosfamida (50 mg/kg); 3) 0,35 µg/µL e 4) 3,5 µg/µL de clorotalonil. Após 96h das injeções, os indivíduos de cada tratamento foram anestesiados com eugenol e tiveram o sangue coletado por punção da artéria branquial para os testes do cometa, do micronúcleo e de anomalias nucleares. No geral, ambas as doses de clorotalonil foram capazes de aumentar as frequências de danos no DNA, micronúcleos e anomalias nucleares (brotamento, fragmentos apoptóticos e bilobadas), indicando que as doses de 0,35 e 3,5 µg/µL tem um alto potencial genotóxico e mutagênico para a espécie *M. furnieri*.

Palavras-chave: biomarcadores, corvina, tintas anti-incrustantes, clorotalonil genotoxicidade.

ABSTRACT

The biofouling process consists of the installation and growth of marine organisms on submerged or semi submerged surfaces in the water, and is considered one of the great problems related to navigation and maintenance of port structures. The use of antifouling paints is the main way to combat these fouling, however, some of the active principles of current formulations cause adverse effects to non-target organisms. The study of biomarkers in organisms exposed to xenobiotic agents is of great importance for Ecotoxicology, especially in the identification of substances with genotoxic potential. The objective of this work was to evaluate the effects of the anti-fouling chlorothalonil on the DNA of fish, using as a test organism the *M. furnieri* estuarine species. The juveniles were collected in the municipality of Raposa - Ma and kept in the Laboratory of Ecotoxicology (LabEcotox) of the Federal University of Maranhão, where they were acclimated for 11 days in PVC tanks with recirculation system (mechanical and biological filtration) temperature $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, salinity 20 g/kg and photoperiod (12 / 12h), receiving feed (fresh prawns) ad libitum. At the end of the acclimation period, the fish were separated into four experimental groups. In each group, 20 individuals were injected intraperitoneally with $1\mu\text{L} / \text{g}$ solution containing: 1) Negative control - the vehicle consisting of physiological solution and DMSO (90 : 1, v: v); 2) Positive Control - cyclophosphamide (50 mg / kg); 3) $0.35 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ and 4) $3.5 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ chlorothalonil. After 96 hours of injections, subjects from each treatment were anesthetized with eugenol and had blood collected by gill artery puncture for the tests of comet, micronucleus and nuclear anomalies. In general, both doses of chlorothalonil were able to increase the frequencies of DNA damage, micronuclei and nuclear abnormalities (budding, apoptotic and bilobed fragments), indicating that the doses of 0.35 and $3.5 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ have a high potential genotoxic and mutagenic to *M. furnieri* species

Keywords: biomarkers, white mouth croacker, antifouling paints, chlorothalonil, genotoxicity.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANs – Anomalias nucleares

CEUA – Comitê de Ética para uso de animais

DCOIT - 4,5-Dichloro-2-octyl-4-isothiazolin-3-one

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilodiamino tetra-acético

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

EUA – *United States of America*

IMO – Organização Marítima Internacional

MA – Maranhão

MN – Micronúcleo

M. furnieri – *Micropogonias furnieri*

pH – Potencial hidrogeniônico

PBS – *Phosphate Buffered Saline* – Tampão Salino Fosfato

PPIS – Produto de pesticidas dos Estados Unidos

RS – Rio Grande do Sul

TCMTB – 2 (*Thiocyanomethylthio*) *benzothiazole*

TBT – Tributilestanho

TPT – Trifenilestanho

TCIN – Clorotalonil

USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

WHO – *World Health Organization* – Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Teste do Cometa. Classes de danos de DNA: 0 - Classe 0 ; 1 - Classe 1; 2 - Classe 2; 3 - Classe 3; 4 - Classe 4. Fonte: Sponchiado, 2008	19
Figura 2 - Micronúcleo (seta) em eritrócito de peixe. Fonte: DA SILVA, 2014.	20
Figura 3 – a) Brotamento, b) Fragmentos apoptóticos, c) Célula binucleada, d) Núcleo bilobado.	21
Figura 4 – Fórmula estrutural do Clorotalonil. Fonte: Castro et al., 2011.	23
Figura 5 – <i>Micropogonias furnieri</i> . Fonte: próprio autor.	24

Sumário

1	
1.	INTRODUÇÃO..... 15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 17
2.1.	Bioindicadores e organismos-teste..... 17
2.2.	Peixes como indicadores ambientais 17
2.3.	Biomarcadores..... 18
2.4.	Teste do cometa..... 19
2.6.	Bioincrustação e tintas anti-incrustantes..... 22
2.7.	Clorotalonil 23
2.8.	<i>Micropogonias furnieri</i> , Desmarest (1823)..... 24
3.	OBJETIVOS..... 25
3.1.	Objetivo geral..... 26
3.2.	Objetivos Específicos..... 26
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 27

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a qualidade dos ecossistemas aquáticos vem crescendo e se tornou objeto de estudo da comunidade científica, uma vez que estes ambientes vêm sofrendo cada vez mais com ações antrópicas gerando problemas, como a poluição decorrente da introdução de substâncias tóxicas no ambiente aquático, provocando efeitos deletérios em algumas espécies (PIANCINI, 2008). É o caso das tintas anti-incrustantes, utilizadas para pintura de embarcações com o propósito de combater as bioincrustações.

O processo de bioincrustação consiste na instalação e crescimento de organismos marinhos como bactérias, algas, crustáceos, entre outros, em superfícies que estão submersas ou semi submersas (DAFFORN; LEWIS; JOHNSTON, 2011). É considerado um dos grandes problemas relacionados às atividades de navegação pois acabam ocasionando prejuízos às embarcações, como danos estruturais, aumento no consumo de combustível, perda da velocidade devido à irregularidade nos cascos, entre outros (MARTINS; VARGAS, 2013).

Para tentar solucionar este problema, tintas à base de vários compostos como cobre, clorotalonil, irgarol, diuron, tributilestanho entre outros foram fabricadas. Essas tintas foram consideradas muito eficazes, porém, acabaram afetando organismos não-alvo, trazendo riscos para os ecossistemas aquáticos (KARLSSON; EKLUND, 2004).

Ressalta-se que os biocidas utilizados como princípio ativo na fabricação destas tintas fazem parte de um grupo de compostos orgânicos que podem ser prejudiciais aos ecossistemas aquáticos (MARTINS e VARGAS, 2013) podendo causar efeitos deletérios aos organismos presentes em áreas de portos e marinas (KARLSSON; EKLUND, 2004; TURNER, 2010; DINIZ; FRANCO; DE JESUS, 2012).

Várias metodologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de avaliar os impactos ambientais causados por determinadas substâncias químicas ao meio aquático, e têm sido empregadas no monitoramento desses ecossistemas. Essas análises ecotoxicológicas fazem parte de uma vertente da toxicologia, denominada de ecotoxicologia aquática que investiga os efeitos de substâncias químicas e de outros materiais, de origem antropogênica ou natural, em organismos aquáticos (PIMENTEL et al., 2011).

A ecotoxicologia nasceu como ferramenta de monitoramento ambiental, e tem como princípio verificar a resposta de organismos frente à exposição a estressores químicos. A partir da década de 80, vários protocolos padronizados de ensaios de

toxicidade começaram a ser desenvolvidos aumentando o grau de confiabilidade dos resultados, além disso, também foi estabelecido o uso de organismos para fins de biomonitoramento da qualidade da água (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

O uso de biomarcadores é muito importante para a ecotoxicologia. Um biomarcador é definido como uma resposta fisiológica ou um padrão morfológico alterado em organismos expostos aos agentes xenobióticos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Entre os anos de 1950 e 1960 surgiram os primeiros testes que utilizavam alterações genéticas como biomarcadores para avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade dos compostos químicos, com destaque para o ensaio cometa e medição da frequência de micronúcleos e de outras anomalias nucleares (PIANCINI, 2008).

A escolha de um organismo-teste é de fundamental importância a esses estudos e a presença de algumas características tais como, elevada disponibilidade e abundância, representatividade de seu nível trófico, significado ambiental em relação à área de estudo, ampla distribuição e importância comercial e, facilidades de cultivo e de aclimação às condições de laboratório são essenciais para a escolha do mesmo (COSTA et al., 2008).

No presente estudo, será utilizado como organismo-teste a espécie *Micropogonias furnieri*, uma espécie nativa de grande abundância e distribuição nas áreas estuarinas. Conhecida popularmente como corvina no Sul e Sudeste e cururuca no Maranhão, tem importância comercial e alguns (poucos) estudos vêm empregando a espécie como bioindicadora e organismo-teste para ensaios laboratoriais (AMADO et al., 2006).

Desta forma, através de biomarcadores genéticos (teste do cometa, micronúcleo e anomalias nucleares) iremos testar a hipótese de que o biocida clorotalonil utilizado na fabricação de tintas anti-incrustantes pode ser considerado genotóxico e/ou mutagênico e que a espécie *M. furnieri* pode ser empregada como um modelo biológico para a realização de testes ecotoxicológicos, considerando sua ampla distribuição na costa brasileira. O uso de uma espécie nativa também se torna relevante, uma vez que, a maioria dos protocolos de testes ecotoxicológicos são desenvolvidos com animais exóticos.

Não há estudos realizados sobre os efeitos desta substância ao nível molecular dos organismos, o que seria de grande relevância, uma vez que, dentre as consequências para os organismos aquáticos que sofrem lesões em seu DNA, estão problemas como o desenvolvimento anormal, redução no crescimento e redução da sobrevivência de embriões, larvas e adultos (SOUSA; FONTANETI, 2006). Além disso, esses efeitos podem levar a problemas como distúrbios na dinâmica da população e comunidade (NACCI; CAYULA; JACKIN, 1996).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bioindicadores e organismos-teste

A qualidade de um sistema biológico pode ser demonstrada através da saúde dos organismos que o habitam. A ecotoxicologia aquática permite que determinadas espécies sejam utilizadas em testes para avaliar os efeitos provocados por contaminantes, através de respostas fisiológicas e comportamentais (MOZETO E ZAGATTO, 2008).

Diferentes organismos são utilizados para avaliar os efeitos tóxicos de compostos químicos no ambiente aquático. A escolha de uma espécie para a utilização em testes ecotoxicológicos deve obedecer alguns critérios, como:

- a) Sensibilidade; o organismo utilizado deve ser sensível a uma diversidade de agentes químicos.
- b) Facilidade de manutenção no laboratório.
- c) Espécies de pequeno porte e ciclo de vida não muito longo.
- d) Disponibilidade de organismos.
- e) Deve-se dar preferência à espécies autóctones ou representativas no ecossistema estudado.
- f) Importância comercial.
- g) Ampla distribuição geográfica.

Esses organismos utilizados podem ser classificados como bioindicadores e/ou organismos-testes, sendo que os bioindicadores são organismos ou comunidades de organismos cujas reações são observadas para avaliar a situação do ambiente em que estas se encontram (GERHARDT, 2002). No caso de organismos-teste, as espécies são mantidas em laboratórios e o conhecimento de sua biologia é suficiente para que possam ser utilizadas como indicadores de toxicidade do ambiente (COSTA et al., 2008). O uso de organismos aquáticos (algas, anfíbios, peixes, moluscos, entre outros) como bioindicadores tem sido bastante válido para a realização de testes de biomonitoramento (VIARENGO et al., 2007)

2.2. Peixes como indicadores ambientais

Os peixes são organismos bastante utilizados como bioindicadores e/ou organismos testes de contaminação dos recursos hídricos por substâncias potencialmente

tóxicas (SUCMAN et al., 2006). Por serem organismos que ocupam diferentes níveis da cadeia alimentar acabam sendo diretamente afetados por organismos que fazem parte dos níveis inferiores, através do processo de bioacumulação (biomagnificação), demonstrando de certa forma, o que está acontecendo no ecossistema em função dos agentes tóxicos de acumula de forma direta e indireta (GADZALA-KOPCIUCH et al., 2004).

Algumas características dos peixes, como, tamanho adequado para a realização de diversos procedimentos analíticos, longevidade, ampla distribuição entre os níveis tróficos, facilidade de captura, manutenção laboratorial, além de algumas espécies possuírem ampla distribuição geográfica contribuem para a escolha destes organismos para a realização de testes ecotoxicológicos (POWERS, 1989; CHOVANEC et al., 2003).

2.3. Biomarcadores

Uma das maneiras de quantificar a exposição aos xenobióticos e seu potencial impacto sobre os organismos vivos é a utilização de biomarcadores, considerados eficientes para determinar a qualidade do ambiente e a saúde da biota local, identificando os possíveis estressores ou poluentes que podem estar causando efeito (FREIRE et al., 2008). Biomarcadores podem ser definidos como qualquer mudança de resposta a uma substância ou elemento no ambiente que seja detectável em alterações moleculares, fisiológicas e comportamentais nos organismos (PEAKALL, 1994). Segundo AMORIM (2003), os biomarcadores podem ser classificados em:

a) Biomarcadores de exposição: usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo para uma substância, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna.

b) Biomarcadores de efeito: usados para identificar as alterações ou efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição e absorção da substância química. Está ligada à relação dose-resposta.

c) Biomarcadores de susceptibilidade: mostram o grau de resposta da exposição provocada aos indivíduos indicando, por exemplo, o desenvolvimento de resistência ao agente tóxico.

Com o aumento do interesse de diversas áreas, a ecologia e a genética se uniram e desenvolveram os primeiros testes hoje empregados em genotoxicidade e mutagenicidade, tais como o teste do cometa e micronúcleo (RAMSDORF, 2007).

2.4. Teste do cometa

O Teste do Cometa foi desenvolvido por Östling e Johanson (1984), e é usado para detectar danos no DNA em células individuais (SOUZA; FONTANETTI, 2012). Posteriormente, o teste foi modificado e aprimorado por Singh et al. (1988), que introduziram condições alcalinas ($\text{pH} > 13$), desenvolvendo uma eletroforese de células isoladas, aumentando a eficiência da técnica, tornando o teste capaz de detectar quebra de fita simples, quebras de dupla-fita, sítios álcali-lábeis, sítios abásicos, excisão de sítios incompletos de reparo e ligações cruzadas (SOUSA, 2005; RIVERO, 2007).

O Teste do Cometa consiste em realizar a lise celular, relaxamento do DNA e eletroforese, sendo possível observar, após coloração, os fragmentos de DNA oriundos da quebra causada pelo agente xenobiótico. Assim o princípio da técnica consiste em embeber as células em solução de lise e em seguida submetê-las à eletroforese em gel de agarose, de forma que o DNA ao “correr” devido ao campo elétrico forma uma cauda como a de um cometa, o que deu o nome ao teste, e é utilizada para detectar lesões genômicas que, após serem processadas e não reparadas, podem resultar em mutação (PRETTI, 2007) (Figura 01).

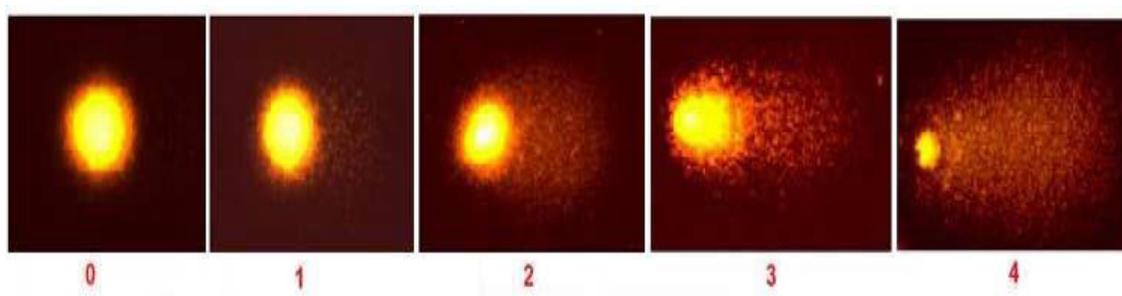


Figura 1 – Teste do Cometa. Classes de danos de DNA: 0 - Classe 0; 1 - Classe 1; 2 - Classe 2; 3 - Classe 3; 4 - Classe 4. Fonte: Sponchiado (2008).

Cabe ressaltar que, diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção (TICE, 1995). As vantagens desse teste são a rapidez, simplicidade, a alta sensibilidade e o baixo custo (SCHERER; STROHSCHOEN, 2013). Em peixes, esse teste tem sido aplicado em eritrócitos, destacando a sensibilidade das células sanguíneas desses animais ao efeito provocado pelos compostos genotóxicos, e seu uso vem aumentando em laboratórios (VILCHES, 2009).

2.5. Teste do Micronúcleo e Anomalias nucleares

O teste do micronúcleo (MN) é bastante utilizado para a avaliação dos efeitos mutagênicos causados por estressores ambientais (VIARENGO et al., 2007). A formação de micronúcleos (Figura 02) tem relação com a poluição causada por vários compostos xenobióticos que podem ocorrer no ecossistema aquático (OBIAKOR; OKONKWO; EZEONYEJIAKU, 2014). Os micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que acabaram não sendo incorporados nas células filhas durante a divisão celular, e aparecem no citoplasma como uma pequena estrutura arredondada e escura idêntica, em aparência, ao núcleo celular (JACOBOWSKI, 2009). É amplamente utilizado para o monitoramento de danos genéticos em populações expostas a substâncias mutagênicas e carcinogênicas, e embora tenha sido descrito, inicialmente, para o uso em mamíferos, foi adaptado com sucesso para o uso laboratorial em peixes, sendo utilizado em muitos estudos que avaliam a exposição deste grupo aos compostos mutagênicos (RIVERO, 2007).

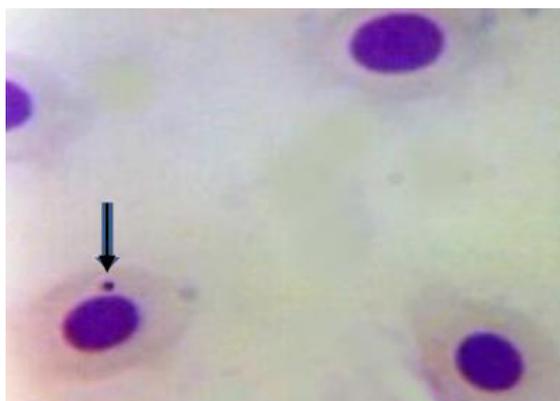


Figura 2 - Micronúcleo (seta) em eritrócito de peixe. Fonte: DA SILVA (2014).

Durante a análise dos micronúcleos, alguns autores têm observado algumas alterações no núcleo e têm sugerido que estas sejam levadas em consideração durante a análise, supondo que as mesmas podem estar relacionadas aos processos como o de morte celular, erros na divisão celular, citotoxicidade e genotoxicidade e/ou mutagenicidade (FENECH, 2000). Estas alterações morfológicas em eritrócitos de peixes foram descritas e classificadas em outros trabalhos como o de BARSINIÉ et al., (2006) como: brotamento, fragmentos apoptóticos, célula binucleada, núcleo bilobado (Figura 03).

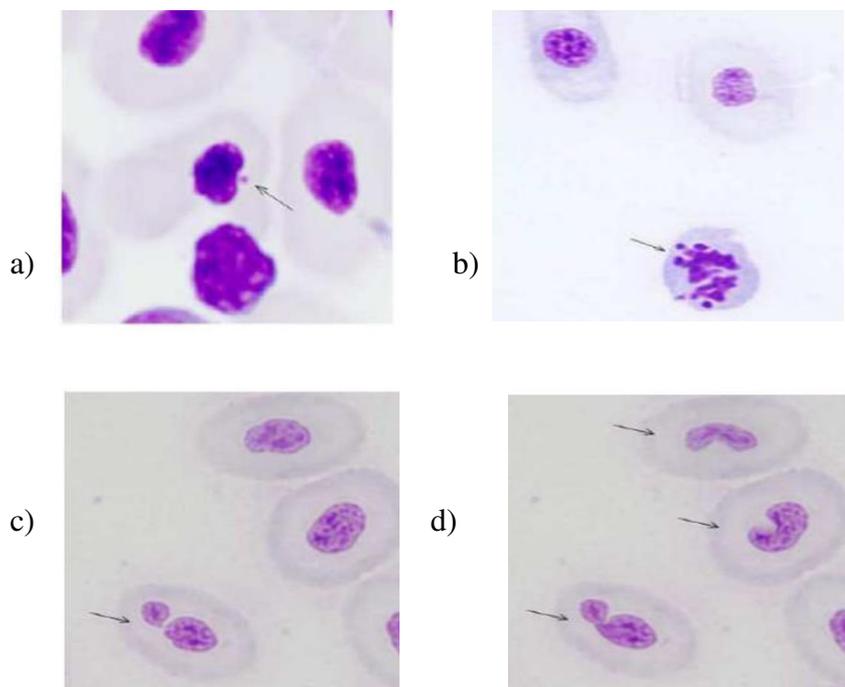


Figura 3 – a) Brotamento, b) Fragmentos apoptóticos, c) Célula binucleada, d) Núcleo bilobado. Fonte: Barsiène et al., 2006

Muitos trabalhos de biomonitoramento já foram realizados através destes testes em peixes. DUARTE et al. (2012) utilizaram os testes do cometa, micronúcleo e anomalias nucleares em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* para avaliar a qualidade da água da lagoa Jacuném (ES). CABANELAS e MOREIRA (2012) utilizaram o teste do micronúcleo para inferir os danos causados pelo esgotamento sanitário no rio Sapato, na Bahia em eritrócitos de *O. niloticus*, obtendo respostas satisfatórias através do teste. Em seus estudos, ZENKNER et al. (2013) usaram o teste do cometa para avaliar o potencial genotóxico do rio Pardinho, usando a espécie *Astyanax fasciatus*, mostrando a poluição do rio por fatores antrópicos. DOMINGOS et al. (2008) também utilizaram os testes do cometa e micronúcleo para avaliar os impactos antrópicos em duas zonas de estuários brasileiros (Piraquê, ES e Paranaguá, PR), usando a espécie de *Cathorops spixii*, quando foram evidenciados os danos no DNA. CANTANHEDE et al., (2016) também utilizaram o teste do micronúcleo e anomalias nucleares para analisar a qualidade de dois estuários na Ilha do Maranhão, Brasil, utilizando a espécie *Centropomus undecimalis*. CASTRO et al., (2019) também utilizaram estes biomarcadores para a avaliação da qualidade das águas do rio Munim-Ma, utilizando eritrócitos de *Oreochromis niloticus*.

2.6. Bioincrustação e tintas anti-incrustantes

A bioincrustação é o acúmulo indesejável de microorganismos, plantas e animais em superfícies imersas na água do mar (YEBRA; KIIL; DAM-JOHANSEM, 2004). É um problema que os usuários de embarcações marítimas já enfrentavam há muito tempo e que acabam provocando diversos prejuízos como:

- (1) O aumento no consumo de combustível devido ao aumento no atrito com a água;
- (2) Aumento na frequência e tempo de docagem, que além dos custos, também gera certa quantidade de resíduos tóxicos;
- (3) Introdução de espécies em locais em que não estavam naturalmente. (YEBRA; KIIL; DAM-JOHANSEM, 2003).

As tintas anti-incrustantes foram desenvolvidas para evitar a formação dessas bioincrustações nos cascos das grandes e pequenas embarcações, como navios de cruzeiros, barcos de passeio, entre outros (YTREBERG et al., 2016). Surgiram em meados do século XIX, fabricadas com elementos como o enxofre, arsênio, mercúrio ou óxidos de cobre e zinco (tintas de primeira geração), porém, devido à sua baixa eficiência, foram sendo substituídas por outros químicos (DINIZ; FRANCO; DE JESUS, 2012).

Por volta de 1950, uma nova geração de tintas foi formulada à base de compostos organometálicos (tintas de segunda geração). A partir daí tintas à base de TBT (tributilestanho) e/ou TPT (trifenilestanho) começaram a ser utilizadas, entretanto, estas substâncias acabaram provocando danos ao ecossistema aquático. Devido à alta toxicidade do TBT, este foi parcialmente proibido em pequenas embarcações (<25 m) no início dos anos 80. Atualmente o uso do TBT na fabricação de tintas anti-incrustantes está proibido pela “Organização Marítima Internacional” (IMO) (KONSTANTINO, 2006).

Como alternativa, a indústria passou a formular tintas à base de compostos orgânicos não metálicos e compostos inorgânicos para substituir as de segunda geração (tintas de terceira geração) (DINIZ; FRANCO; DE JESUS, 2012). Atualmente, 18 componentes são utilizados na fabricação de tintas anti-incrustantes em todo o mundo, como alternativas para substituir os organometálicos, entre eles estão o diuron, irgarol 1051, diclofluanida, clorotalonil, zinco piritona, cobre piritona, maneb, zaneb, trifenilborano, TCMTB e DCOIT (DAFFORN et al., 2011; DINIZ; FRANCO; DE JESUS, 2014; SALEH et al., 2015; BATISTA-ANDRADE et al., 2016).

2.7. Clorotalonil

O Clorotalonil (TCIN) (2, 4, 5, 6-tetracloroisofталонitrila) (Figura 04) é um dos fungicidas mais utilizados na agricultura mundial há mais de 30 anos (WU et al., 2012) de amplo espectro para o controle de doenças foliares fúngicas de vegetais, culturas de campo e culturas ornamentais (USEPA, 1999; TANG et al., 2017). Também é conhecido por vários outros nomes comerciais, como, Bravo, Daconil 2787, DAC-2787, Echo, Vanox, entre outros (CIMA, BRAGADIN, BALLARIN, 2008).

Sua presença na água do mar é em parte devido à lixiviação do solo pelas águas de drenagem das áreas do interior (CIMA, BRAGADIN, BALLARIN, 2008), e também pelo seu uso como biocida principal e/ou de reforço em tintas anti-incrustantes, bastante difundido após o banimento das tintas à base de organoestânicos (CASTRO et al., 2011).

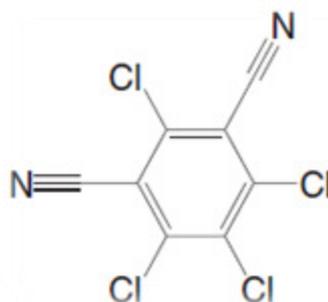


Figura 4 – Fórmula estrutural do Clorotalonil. Fonte: Castro et al. (2011).

Apresenta solubilidade em água de 0,9 mg/L, tendo uma meia vida em água estuarina de 8 a 9 dias, e no solo de aproximadamente 60 dias (CAUX ET AL., 1996). Embora apresente uma meia vida curta em ambiente marinho, é um fungicida capaz de provocar toxicidade aos peixes, podendo concentrar-se nos tecidos desses organismos em níveis bem mais altos do que os encontradas na água (COX, 1997). Além disso, podem afetar a reprodução de algumas espécies de peixes de água doce (CAUX ET AL., 1996).

O clorotalonil foi considerado altamente tóxico para muitas espécies aquáticas como algas, moluscos, crustáceos e peixes (DELORENZO E FULTON, 2012; SÁNCHEZ-GARAYZAR ET AL., 2016). Ernst et al. (1991) observou que esse biocida também causa toxicidade em invertebrados aquáticos como os mexilhões azuis (CL50(96h) = 5,94 mg/L) e alguns outros organismos marinhos como a truta arco-íris (CL50 (96h) = 69 µg/L).

Os mecanismos de ação do clorotalonil sugerem problemas na atividade de várias enzimas, como já demonstrado por Sanchez -Garayzar et al, (2016) que observou a capacidade de inibição da glutatona celular (GSH) e as enzimas ligadas à glicólise na espécie *Danio rerio*. Além de observar que o clorotalonil interrompe a respiração celular e induz o estresse oxidativo.

É considerado altamente tóxico pelo Sistema de Informação de Produto de Pesticidas dos EUA (PPIS) e incluído como “classe B2 - provável cancerígena” na Lista de Produtos Químicos Avaliados por Potencial Carcinogênico pelo Escritório de Programas de Pesticidas dos EUA o que levou alguns países a tomarem atitudes como regular o seu uso, entretanto, apenas a Suécia proibiu o seu uso (CIMA, BRAGADIN, BALLARIN, 2008).

Mesmo sendo um fungicida extensivamente usado e detectado com frequência no ambiente aquático, há poucos estudos sobre os seus efeitos nos organismos aquáticos não-alvo (CIMA, BRAGADIN, BALLARIN, 2008; SÁNCHEZ-GARAYZAR ET AL., 2016)

2.8. *Micropogonias furnieri*, Desmarest (1823)

A espécie *Micropogonias furnieri*, pertence à família Sciaenidae e à ordem Perciformes, foi descrita por Desmarest em 1823 (BARCELLOS, 2015) (Figura 05). Apresentam uma ampla distribuição, ocorrendo desde o Atlântico Ocidental, em grande parte das Antilhas, costa sul do Caribe e costa atlântica da América do Sul, da Costa Rica à Argentina (FAO, 2016).



Figura 5 – *Micropogonias furnieri*. Fonte: próprio autor.

Esta espécie apresenta um comportamento eurialino e hábito demersal obrigatório, sendo encontrada em fundos lamosos e/ou arenosos que podem ir da zona de litoral até 60 metros de profundidade (MORASCHE, TUBINO; MONTEIRO-NETO, 2010). São

encontrados também em regiões estuarinas, principalmente, os juvenis, que utilizam esse ambiente como zona de alimentação e crescimento (FISHER; PEREIRA; VIEIRA, 2011).

Vem sendo usada em alguns estudos de biomonitoramento, nos quais se procura conhecer a qualidade ambiental, e avaliar a presença de compostos que possam estar prejudicando o ecossistema local, como no estudo realizado por MARCHOVECCHIO (2004), que utilizou esta espécie para avaliar o nível de metais pesados em um estuário na Argentina. AMADO et al., (2006) também utilizaram a espécie *M. furnieri* como bioindicador avaliando duas áreas do estuário Lagoa dos Patos, RS, utilizando biomarcadores como o micronúcleo para realizar o biomonitoramento da área.

A espécie ainda possui algumas características que podem torna-la um bom organismo-teste, como: elevada disponibilidade e abundância, representatividade de seu nível trófico, significado ambiental em relação à área de estudo, ampla distribuição, importância comercial, facilidades de cultivo e de aclimação às condições de laboratório (COSTA ET AL. 2008,).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Determinar se o biocida clorotalonil pode ser considerado genotóxico e/ou mutagênico e se o peixe estuarino da espécie *Micropogonias furnieri* pode ser considerado um bom organismo-teste para análise de biomarcadores de genotoxicidade.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se o biocida clorotalonil é capaz de causar lesões ao DNA do organismo-teste.
- Avaliar se o biocida clorotalonil é capaz de causar mutações ao organismo-teste.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amado, L. L. et al. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, n. 2, p. 199–206. 2006.

Amorim, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v. 6, nº 2, p. 158-170.2003

Barcellos, C. C. C. Análise bacteriológica e sensorial de filés de corvina (*Micropogonias furnieri*) (Perciformes: Sciaenidae) refrigerados e irradiados, desembarcados no município de Niterói, Rio de Janeiro. 96 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro. 2015.

Barsiené et al.; Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology*, 78S, S99–S104, 2006.

Batista-Andrade, J.A., et al., Antifouling booster biocides in coastalwaters of Panama: First appraisal in one of the busiest shipping zones, *Marine Pollution Bulletin* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.045>. Acesso em outubro de 2016.

Cabanelas, I. T. D.; Moreira, L. M. A. Danos citogenotóxicos em ecossistema aquático submetido a esgotamento sanitário urbano. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. v. 7, n. 2, p 31- 35. 2012.

Caux, P.Y., Kent, R.A., Fan, G.T., Stephenson, G.L. Environmental fate and effects of chlorothalonil: a Canadian perspective. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* v. 26, p. 45 – 93. 1996.

Castro, I. B; Westphal, E.; Fillmann, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas de ambiente aquático. *Química nova*. v. 34, n. 6, p. 1021-1031. 2011.

Castro et al. River waters near to agricultural sites in the Northeastern Brazil (Maranhão State) cause genetic damage in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian journal of biology*, 2019.

Cantanhede et al.; Evaluation of environmental quality of two estuaries in Ilha do Maranhão, Brazil, using histological and genotoxic biomarkers in *Centropomus undecimalis* (Pisces, Centropomidae). *Environmental Science and Pollution Research*. 2016.

Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F. Fish as bioindicators. In: Markert, B. A.; Breure, A. M.; Zechmeister, H. G. *Bioindicators and Biomonitoring*. Netherlands: Elsevier Science, p. 639-669. 2003.

Cima, F.; Bragadin, M.; Ballarin L. Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes I. Sea-Nine 211TM and chlorothalonil. *Aquatic Toxicology*, v. 86, p. 299-312, 2008.

Costa, C. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química nova*. v. 31, n 7, p.1820-1830. 2008.

Cox C. Chlorothalonil. *Journal of pesticide reform*, v. 17, n 4, p. 14-20, 1997.

Da Silva, J.; Heuser, V.; Andrade, V. Biomonitoramento Ambiental. *Genética Toxicológica*. p. 167-178. 2003.

Da Silva, M. R. L. R; Avaliação da toxicidade do herbicida glifosato em *Astyanax spp.* *Saúde Meio Ambient*. v. 3, n. 2, p. 62-69, 2014.

Da Silva, D. C. V. R.; Pompeo, M.; De Paiva, T. C. B.; A ecotoxicologia no contexto atual do Brasil. In: Pompeo, M. (orgs). *Ecologia de reservatórios e interfaces*. São Paulo : Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 460 p. 2015.

Dafforn, K. A.; Lewis, J. A.; Johnston, E. L. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*. v. 62, p. 453-465. 2011

De Lorenzo, M. E.; Fulton, M. H. Comparative risk assessment of permethrin, chlorothalonil, and diuron to coastal aquatic species. *Marine Pollution Bulletin*, v. 64, p. 1291–1299, 2012.

Diniz, L. G. R.; Franco, T. C. R. D. S.; De Jesus, M. S. First Appraisal of water contamination by antifouling booster biocides of 3rd generation at Itaquí Harbor (São Luiz – Ma – Brazil). *J. Brazilian Chemistry Society*. Vol. 25, No. 2, p. 380-388, 2014

Domingos Valdez, F. X. et al. Anthropic Impact Evaluation of Two Brazilian Estuaries Trough Biomarkers in Fish. *Journal Brazilian of Society of Ecotoxicology*. v. 4, n. 1-3, p. 21-30. 2009.

Duarte, I. D. et a. A qualidade de água da Lagoa de Jacuném (Espírito Santo, Brasil) em relação a aspectos genotóxicos e mutagênicos, mensurados respectivamente pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v.10, n. 2, p. 211-219. 2012.

Ernst, W., Doe, K., Jonah, P., Young, J., Julien, G., Hennigar, P. The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. v, 21, p. 1 – 9, 1991

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Species factsheets. Micropogonias furnieri*. Fisheries and Aquaculture Department. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/2351/en>>. Acesso em: março de 2016.

Fenech, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 455, p. 81-95, 2000.

Freire, M. M., et al. 2008. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecologia brasiliensis*, 12 (3), p. 347-354. 2008.

Fisher, L. G.; Pereira, L. E. D.; Vieira, J. P. Peixes estuarinos e costeiros. 2. ed. - Rio Grande. 2011.

Gerhardt A. Bioindicator species and their use in biomonitoring. In: Environmental Monitoring I. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Developed under the Auspices of the UNESCO. Oxford: Eolss Publishers. 47 pp. 2002.

Gonçalves, A. A.; Passos, M. G. Restructured fish product from White croaker (*Micropogonias furnieri*) minceusing microbial transglutaminase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 53, n. 4, p. 987-995. 2010.

Hooftman, R. N.; Raat, W.K.; Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methane sulphonate. *Mutation Research*, v. 104 p. 147-152. 1982.

Jacobowski, A. C. Avaliação do potencial efeito genotóxico do quelato de cobre nano e microencapsulado. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Saúde). Universidade Católica Dom Bosco. 2009.

Karlsson, J.; Eklund, B. New biocide-free anti-fouling paints are toxic. *Marine Pollution Bulletin*, v. 49, n. 5-6, p. 456-464. 2004.

Konstantinou, I. K.; Albanis, T. A. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International*. v. 30, p. 235 - 248. 2004.

Konstantinou, I. K. *Antifouling Paint Biocides*. [s.l.] Springer Science & Business Media. 2006.

Magalhães, D. P.; Ferrão Filho, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliense*. v. 12, p. 355-381. 2008.

Marcovecchio, J. E. The use of *Micropogonias furnieri* and *Mugilliza* as bioindicators of heavy metals pollution in La Plata river estuary, Argentina. *Science of the total environment*. v. 323, p. 219-226. 2004.

Martins, T. L.; Vargas, V. M. F. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. v. 8, n. 1. 2013.

Mochida, K.; Fujii, K. Further Effects of Alternative Biocides on Aquatic. *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer. Tokyo. p, 383-393. 2009.

Morasche, M. S.; Tubino, R. A.; Monteiro-Neto, C. Dieta da corvine, *Micropogonias furnieri*, (Desmarest, 1823) (Actinopterygii, Sciaenidae) on the coastal region of Itaipu, Niterói – RJ. Arquivo de Ciências do Mar, Fortaleza. v. 43(2), p. 87 – 95. 2010.

Mozeto, A. A.; Zagatto, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: Zagatto, P. A.; Bertolotti, E. (Eds.). 2008. Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações. São Carlos: RiMa Editora, Cap. 2, p. 15-38. 2008.

Nacci, D.; Cayula, S.; Jackim, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. Aquatic Toxicology. v. 35, p. 197-210, 1996.

Obiakor, M. O. ; Okonkwo, J. C.; Ezeonyejiaku, C. D. Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. Mutation research. v. 775-776, p. 20-30. 2014.

Oost, R. V. D.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 13, p p. 57 - 149, 2003.

Ostling, O.; Johanson, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 123, n. 1, p. 291-298. 1984.

Peakall, D.W., 1994. Biomarkers: the way forward in environment assessment. Toxicol. Ecotoxicology. News, v1, p55-60.

Piancini, L. D. T. Biomonitoramento do Rio Iguaçu em dois pontos utilizando como bioindicador peixes do gênero *Astyanax* (Characiforme, Characidae). Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.

Pimentel, M. F. et al. O uso de *Artemia* sp. como organismo-teste para avaliação da toxicidade das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes após tratamento em reator biológico experimental. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology. v.6, n.1, p. 15-22. 2011.

Powers, D. A. Fish as model systems. Science, v. 246, n. 4928, p. 352-358. 1989.

Pretti, E. et al. Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007, Caxambu, MG, 2007. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007.

Ramsdorf, W. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* B e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Canguiri – UFPR). Dissertação (Mestrado em genética). Universidade Federal do Paraná. 2007.

Rivero, C. L. V. Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes no lago Paranoá, Brasília, DF, Brasil. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular). Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília. 2007.

Saleh, A. et al. Antifouling paint booster biocides (Irgarol 1051 and diuron) in marinas and ports of Bushehr, Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin* (article in press). 2015.

Sánchez Garayzar, A.B., Bahamonde, P.P., Martyniuk, C.J., Betancourt, M., Munkittrick, K.R., 2016. Hepatic gene expression profiling in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the fungicide chlorothalonil, *Comp. Biochem. Physiol.*, D. Article in press.

Sponchiado, G.; Avaliação ecotoxicológica de 17 β -estradiol por meio de parâmetros genéticos utilizando como modelo experimental *Oreochromis niloticus*. 2008. Dissertação (Mestrado em Gestão Ambiental) Universidade Positivo. Curitiba. 2008.

Scherer, K.; Strohschoen, A. A. G. Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área de saúde. *Revista Destaques acadêmicos*.v. 5, n.3, p. 49-60. 2013.

Schimid, W. The micronucleus test. *Mutation Research*.v. 31, n. 1, p. 9-15.1975.

Singh, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. v. 1, n. 175, p. 184-191. 1988.

Souza, T. S. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do rio Paraíba do sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo, utilizando *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) como organismo teste. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Rio Claro, SP. 2005.

Souza, T. S.; Fontannetti, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research*. 605, p. 87-93. 2006.

Souza, T. S.; Fontanetti, C. S. DNA damage of erythrocytes of fish *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) after acute exposure to river water receiving effluent from an oil refinery. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. v. 7, n. 2, p. 17- 22. 2012.

Speit, G., Hartmann, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*. v. 10, n. 6, p. 555-559. 1995.

Sucman, E., Vávrová, M., Zlámlová G. H., Mahrová, M. Fish – Useful Bio-Indicators For Evaluation Of Contamination In Water Ecosystems. 2006. Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy: Vol. 11, Article 3.

Tang, L; Dong, J.; Ren, L., Zhu, Q., Huang, W., Liu, Y., Lu, D. Biodegradation of chlorothalonil by *Enterobacter cloacae* HTUA-1. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 121, p. 122-130, 2017.

Tice, R. The Single Cell Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. Environmental mutagenesis. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK; p. 315-339. 1995.

Turner, A. Marine pollution from antifouling paint particles. Marine Pollution Bulletin, v. 60, n. 2, p. 159–171. 2010.

USEPA, 1999. Registration Eligibility Decision (RED): Chlorothalonil. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, p. 337.

Viarengo, A. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. Comparative Biochemistry and Physiology. v. 146, p. 281-300. 2007.

Vilches, M. Análise genotóxica do Rio cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores. Dissertação. (Mestrado em Qualidade Ambiental). Centro Universitário Feevale. Novo Hamburgo. 2009.

Yebra, D. M.; Küll, S.; Dam-Johansen, K. Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. Prog. Org. Coating, v. 50, p. 75-104. 2004.

Ytreberg, E. et al. XRF measurements of tin, copper and zinc in antifouling paints coated on leisure boats. Environmental pollution. v. 213, p. 594-599. 2016.

Wu, X., Cheng, L., Cao, Z., Yu, Y. Accumulation of chlorothalonil successively applied to soil and its effect on microbial activity in soil. Ecotoxicol. Environ. Saf. v. 81, p. 65-69. 2012.

Zenkner, R. F. F. et al. Avaliação da genotoxicidade do rio pardinho utilizando o ensaio cometa em *Astyanax fasciatus*, Cuvier, 1819. Caderno de Pesquisa, série Biologia, v, 25, n. 3, p. 79-93. 2013.

CAPITULO 2

Efeitos genotóxicos e mutagênicos do biocida clorotalonil no peixe estuarino *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823

Muryllo Santos Castro^{a,b,c}, Larissa Carvalho Penha^b, Thamires Alexandra Torres^b, Paulo Victor Miranda Figueiredo^b, Luis Fernando Carvalho Costa^c, Ricardo Luvizotto-Santos^b
Gilberto Fillmann^d

^aPrograma de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão, Campus Bacanga, São Luís, Ma.

^bLaboratório de Ecotoxicologia, Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

^cLaboratório de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

^dInstitute of Oceanography, Federal University of Rio Grande, RIO GRANDE, RS, Brazil

Endereço de e-mail: muryllosc@gmail.com

RESUMO: O fungicida clorotalonil utilizado como biocida em sistemas anti-incrustantes tem demonstrado capacidade de bioacumulação em peixes e toxicidade para alguns organismos aquáticos não-alvo. O presente estudo avaliou através dos testes do cometa, micronúcleo e anomalias nucleares, o efeito genotóxico e mutagênico do clorotalonil no peixe estuarino *Micropogonias furnieri*, uma espécie de interesse pesqueiro com potencial de uso como organismo-teste para avaliação dos efeitos de micropoluentes ambientais. Os juvenis ($18,3 \pm 4,0$ g) foram coletados em igarapés de estuário (Raposa, Maranhão, Brasil) e aclimatados por 11 dias em laboratório. Em seguida, foram testadas duas doses de clorotalonil ($0,35$ e $3,5 \mu\text{g/g}^{-1}$), injetadas intraperitonealmente ($1 \mu\text{L/g}^{-1}$) além dos controles positivo (ciclofosfamida $50,0 \mu\text{g/g}$) e negativo (soro fisiológico e DMSO). Após 96 h das aplicações das doses internas, os peixes foram anestesiados (eugenol) e tiveram o sangue coletado por punção branquial para as análises dos biomarcadores de genotoxicidade. No geral, ambas as doses de clorotalonil foram capazes de aumentar as frequências de danos no DNA, micronúcleos e anomalias nucleares (brotamento nuclear, fragmentos apoptóticos e células bilobadas) indicando alto potencial genotóxico e mutagênico do clorotalonil para a corvina.

Palavras-chave: Anti-incrustantes, biomarcadores genotóxicos, corvina, cururuca, booster biocide

ABSTRACT: The chlorothalonil fungicide used as a biocide in antifouling systems has demonstrated ability to bioaccumulate in fish and toxicity to some non-target aquatic organisms. The present study evaluated the genotoxic and mutagenic effects of chlorothalonil in the estuarine fish *Micropogonias furnieri*, a species of commercial interest with potential for use as a test organism to evaluate the effects of environmental micro-pollutants, through the tests of comet, micronucleus and nuclear anomalies. The juveniles (18.3 ± 4 g) were collected in estuarine streams (Raposa, Maranhão, Brazil) and acclimatized for 11 days in the laboratory. Then, two doses of chlorothalonil (0.35 and 3.5 $\mu\text{g/g}$) were tested in addition to positive (cyclophosphamide 50.0 $\mu\text{g/g}$) and negative (saline and DMSO) controls. After 96 hours of application of the internal doses, fish were anesthetized (eugenol) and the blood was collected by gill puncture for analysis of genotoxicity biomarkers. In general, both doses of chlorothalonil were able to increase DNA damage, micronuclei and nuclear abnormalities (nuclear budding, apoptotic fragments and bilobed cells) frequencies indicating high genotoxic and mutagenic potential of chlorothalonil for whitemouth croaker.

Keywords: Antifouling, genotoxicity biomarkers, whitemouth croaker, booster biocide

1. Introdução

Os ambientes aquáticos têm sido depósito de diferentes tipos de resíduos de origem antropogênica oriundos das mais variadas fontes de contaminantes ambientais (Rajaguru et al., 2001; Ohe et al., 2004). Nas zonas portuárias, destacam-se a presença de biocidas empregados nas tintas anti-incrustantes formuladas para impedir a bioincrustação (Ytreberg et al., 2016). Esse processo consiste no acúmulo e crescimento de organismos aquáticos como bactérias, microalgas, plantas e invertebrados em superfícies submersas ou semi submersas (Dominguez et al., 2014). A bioincrustação gera vários problemas relacionados às atividades de navegação, provocando prejuízos as embarcações como danos estruturais (De Brito et al., 2007) perda da velocidade devido à irregularidade nos cascos, aumento no consumo de combustível e aumento no período de docagem (Lebret, K.; Thabard, M.; Hellio, C., 2009).

Há três gerações de tintas anti-incrustantes, e várias substâncias já foram utilizadas como princípios ativos na fabricação dessas tintas. A primeira geração era formulada à base de óxido de cobre e zinco, porém substituídas devido à sua pouca durabilidade (Castro et al., 2011). Na segunda geração, o composto mais utilizado foi o organoestânico tributilestanho (TBT), capaz de provocar efeitos tóxicos em espécie não-alvo (Horiguchi, et al., 2006; Nakanishi, 2008; Dos Santos, et al., 2013), o que levou à proibição do seu uso na formulação de tintas desde o ano 2008 (Martins e Vargas, 2013). , Novos biocidas (terceira geração) têm sido empregados na formulação de sistemas anti-incrustantes, onde cerca de 23 compostos, como o diuron, irgarol, DCOIT, diclofluanida e clorotalonil (Castro et al., 2011; Soroldoni et al., 2017).

O clorotalonil (2, 4, 5, 6-tetracloro isoftalonitrila) é um fungicida não sistêmico de largo espectro, representante do grupo das isofonitrilas, considerado um dos mais utilizados na agricultura mundial nos últimos 30 anos (Wu et al., 2012). Segundo Gallo e Tosti (2015) o uso do clorotalonil como biocida utilizado na fabricação das tintas anti-incrustantes, tem aumentado sua presença no ambiente aquático. Possui uma meia-vida de até 4 semanas na água do mar (Davies, 1987) e entre 1.8 e 8 dias em água estuarina e interface água sedimento (Walker, 1988). É considerado tóxico para espécies aquáticas como algas, moluscos e crustáceos (De Lorenzo e Fulton, 2012). Além disso, é capaz de provocar toxicidade em peixes, incluindo efeitos sobre a reprodução de algumas espécies de água doce (Caux et al., 1996). Há registros de que mostram que este biocida possui um fator de bioacumulação de até 3.000 vezes em peixes (Cox 1997, US EPA, 1999). Por

outro lado, TSUDA et al (1991) verificaram fatores de bioconcentração de 18 para a espécie *Gnathopogon caeruleus* e 25 para carpa *Cyprinus carpio*, após exposições subletais de 1.1-1.4 µg / L. No entanto, pouco se sabe sobre o potencial genotóxico e mutagênico dos biocidas de terceira geração, como o clorotalonil, para organismos aquáticos não-alvo.

Dentre as ferramentas disponíveis para se estudar a ação dos agentes tóxicos nos organismos, destacam-se os biomarcadores, os quais são definidos como qualquer mudança de resposta a uma substância ou elemento no ambiente que seja detectável em alterações moleculares, fisiológicas e comportamentais nos organismos (Peakall, 1994). Dentre eles podemos citar o teste do cometa, micronúcleo e anomalias nucleares, que visam indicar o potencial dos agentes químicos em causar danos ao DNA, podendo levar a mutações (Da Silva et al., 2003).

Os peixes estão entre os organismos mais amplamente utilizados para a detecção de efeitos nocivos de xenobióticos (Jesus e Carvalho 2008, Dos Santos et al., 2013; Nunes et., al 2015). Devido a sua alta sensibilidade e capacidade de bioacumulação, permitem identificar as respostas mesmo quando expostos às baixas concentrações dos xenobióticos (Zenckner, 2013). Uma das espécies de peixes nativos estuarinos que vem sendo usada para estudos de biomonitoramento é a *Micropogonias furnieri*, popularmente conhecida como cururuca ou corvina, considerando sua grande abundância e importância comercial ao longo da costa brasileira (Marcovecchio, 2004; Amado et al., 2006). Dessa forma, testamos a utilidade de *M. furnieri* como organismo teste para verificar a existência de efeito genotóxico e/ou mutagênico associados a exposição ao biocida clorotalonil.

2. Materiais e Métodos

2.1 Organismos-teste

Os peixes foram coletados nos igarapés do município de Raposa no estado do Maranhão (Nordeste do Brasil) (2°25'19.8''S 44°05'29.4''O) com rede de tarrafa malha 30 mm (Autorização SisBio nº 55187-1). Os exemplares foram pré-selecionados *in situ* em função do tamanho visando a obtenção de um lote homogêneo de juvenis (comprimento total menor que 250 mm, segundo Juras, 1984), em seguida foram transportados em caixa d'água de PVC com água do local da coleta e aeração constante até o Laboratório de Ecotoxicologia (LabEcotox) da Universidade Federal do Maranhão,

onde receberam um banho de água doce por 3 a 5 minutos (Blaybock et al., 2005) e foram aclimatados por 11 dias em temperatura de $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, água marinha com salinidade ajustada em 20 g/kg e fotoperíodo 12C/12E em tanques de PVC de 310 L na densidade de 1 grama de peixe por litro de água com sistema de filtragem (*canister*), aeração constante, e alimentação *ad libitum* com camarões duas vezes ao dia. Os restos de alimento e fezes foram retirados ao final de cada dia com auxílio de uma rede de malha fina.

2.2 Bioensaios

Após a aclimação, os peixes foram organizados em quatro grupos experimentais contendo 20 peixes por tratamento, sendo: um controle negativo que recebeu uma dose do “veículo” composto por solução fisiológica para peixes e dimetil sulfoxido (DMSO) na proporção 99:1 (v:v); um controle positivo que recebeu o “veículo” mais ciclofosfamida (50 $\mu\text{g/g}$), uma droga já reconhecida por ser genotóxica e mutagênica para peixes (Matsumoto e Cólus, 2000); e dois grupos de tratamentos com exposição ao biocida clorotalonil, sendo um na concentração de 0,35 $\mu\text{g/g}$, considerando o fator de bioconcentração do clorotalonil para peixes segundo Davies (1988), e outro com uma concentração dez vezes maior (3,5 $\mu\text{g/g}$). Os indivíduos foram pesados e receberam uma dose única intraperitoneal de 1 $\mu\text{L/g}$ das soluções correspondentes a cada tratamento. Após 96 h das injeções (sem alimentação), os peixes foram anestesiados com óleo de cravo (eugenol 100 mg/L) (Simões et al., 2012) e, em seguida, sofreram punção da artéria branquial para retirada das amostras de sangue periférico para as análises (comitê de ética de experimentação animal da Universidade Federal do Maranhão: nº 23115.008075/2016-12).

2.3 Teste do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado segundo a metodologia de Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), com modificações de Cestari (2004). Diluiu-se 10 μL de sangue em 1.000 μL de soro bovino fetal (GoldLab, Brasil), do qual, 10 μL foram misturados a 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) (Agargen, Brasil). Essa mistura foi aplicada em lâminas pré-gelificadas com agarose de alto ponto de fusão (1,5%) (Agargen, Brasil). As lâminas foram cobertas com lamínulas e refrigeradas por 10 a 20 minutos a 4°C . Após

a retirada da lamínula, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise gelada (2,5 M NaCl; 100 mM Na₂EDTA; 10 mM Tris pH 10, 10% DMSO e 1% Triton X- 100) em cuba de vidro vertical e deixada na geladeira por 1h a 4°C. Em seguida, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese horizontal, que foi colocada em uma caixa plástica preenchida com gelo para manter o material refrigerado. À cuba, foi adicionado o tampão alcalino (10 M NaOH, 0,2 M EDTA e água destilada, pH > 13), e iniciada a eletroforese a 25V e 300 mA durante 25 minutos. Em seguida, as lâminas foram transferidas para uma solução de neutralização (0,4 M Tris/HCl, pH 7,5) por 15 minutos, e colocadas para secar à temperatura ambiente. As lâminas secas foram fixadas com etanol absoluto por 5 minutos, coradas com brometo de etídio (30 µg/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência (BX51/BX52-Olympus; filtro 516-560nm; objetiva de 40x).

Foram analisados 100 nucleóides de eritrócitos por lâmina, nos quais foram considerados o tamanho da cauda. Os nucleóides foram classificados, de acordo com o dano encontrado no DNA, em cinco classes: 0: sem danos (<5%); 1: baixo nível de danos (5-20%); 2: médio nível de danos (21-40%); 3: alto nível de danos (41-94%) e 4: dano total (>95%) (Speit e Hartmann, 1995). O escore de danos foi obtido multiplicando-se o número de nucleóides em cada classe pelo valor da respectiva classe, dividido pelo número de núcleos (células) analisados, segundo a fórmula: $\text{Escore} = [(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)]/\text{número total de células}$

2.4. Teste do micronúcleo e anomalias nucleares

O teste do micronúcleo seguiu a técnica descrita por Hooftman e Raat (1982). Foram realizados esfregaços de sangue dos peixes sobre lâminas, fixando-se o material com metanol por 10 minutos, e deixando a lâmina secar à temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com o kit hematológico Panótico (Laborclin, Brasil) durante 20 minutos, lavadas em água corrente, e colocadas para secar à temperatura ambiente. A frequência de eritrócitos micronucleados foi determinada pela análise de 1.000 células por animal, considerando-se apenas hemácias nucleadas com membranas nuclear e citoplasmática intactas. Os micronúcleos foram classificados de acordo com Hooftman e Raat (1982). As anomalias nucleares (brotamentos nucleares, fragmentos apoptóticos, células bilobadas e binucleadas) foram classificadas seguindo Barsiené et al. (2006).

2.5. Análises estatísticas

A normalidade na distribuição de frequência dos dados e sua homogeneidade foram avaliadas pelos testes Shapiro Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente. Como não houve distribuição normal, os resultados dos ensaios cometa e micronúcleo, e as anomalias nucleares foram avaliados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido de Dunnet ($p < 0,05$) usando o software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc.)

3. Resultados

M. furnieri apresentou-se como um organismo teste adequado, mostrando-se resistente aos procedimentos de captura, transporte e aclimação às condições de laboratório, e sensível ao clorotalonil e à ciclofosfamida (controle positivo) utilizadas nos ensaios, considerando as alterações observadas nos biomarcadores analisados. Além disso, não houve mortalidade e nem incidência de doenças durante o período de aclimação e o período de exposição (96h) nos diferentes tratamentos.

As duas concentrações de clorotalonil causaram danos ao DNA de *M. furnieri* quando comparadas ao controle negativo ($p \leq 0,0001$), também havendo diferença significativa nos danos entre as doses de clorotalonil testadas ($p \leq 0,0001$) (Fig. 1 A). Para o teste de mutagenicidade, as doses nas concentrações de $0,35 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$) e $3,5 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,0001$) apresentaram um aumento na frequência de células micronucleadas em relação ao controle negativo e ambas as doses apresentaram diferença entre si ($p < 0,01$) (Fig. 1 B). Quanto às anomalias nucleares, houve um aumento significativo no brotamento nuclear em relação ao controle negativo. As doses de clorotalonil não diferiram ($p > 0,05$) entre si (Fig. 1C). O clorotalonil também causou aumento nos fragmentos apoptóticos em ambas as doses, sendo que na concentração de $0,35 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$) a frequência foi menor que na concentração de $3,5 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,0001$), (Fig. 1D). Em ambas as concentrações de clorotalonil, os números de células bilobadas foram maiores do que no controle negativo ($p < 0,0001$), indicando um grande efeito sobre esse parâmetro mutagênico (Fig. 1E). Por outro lado, não houve efeito significativo na frequência de células binucleadas ($p > 0,05$) (Fig. 1F).

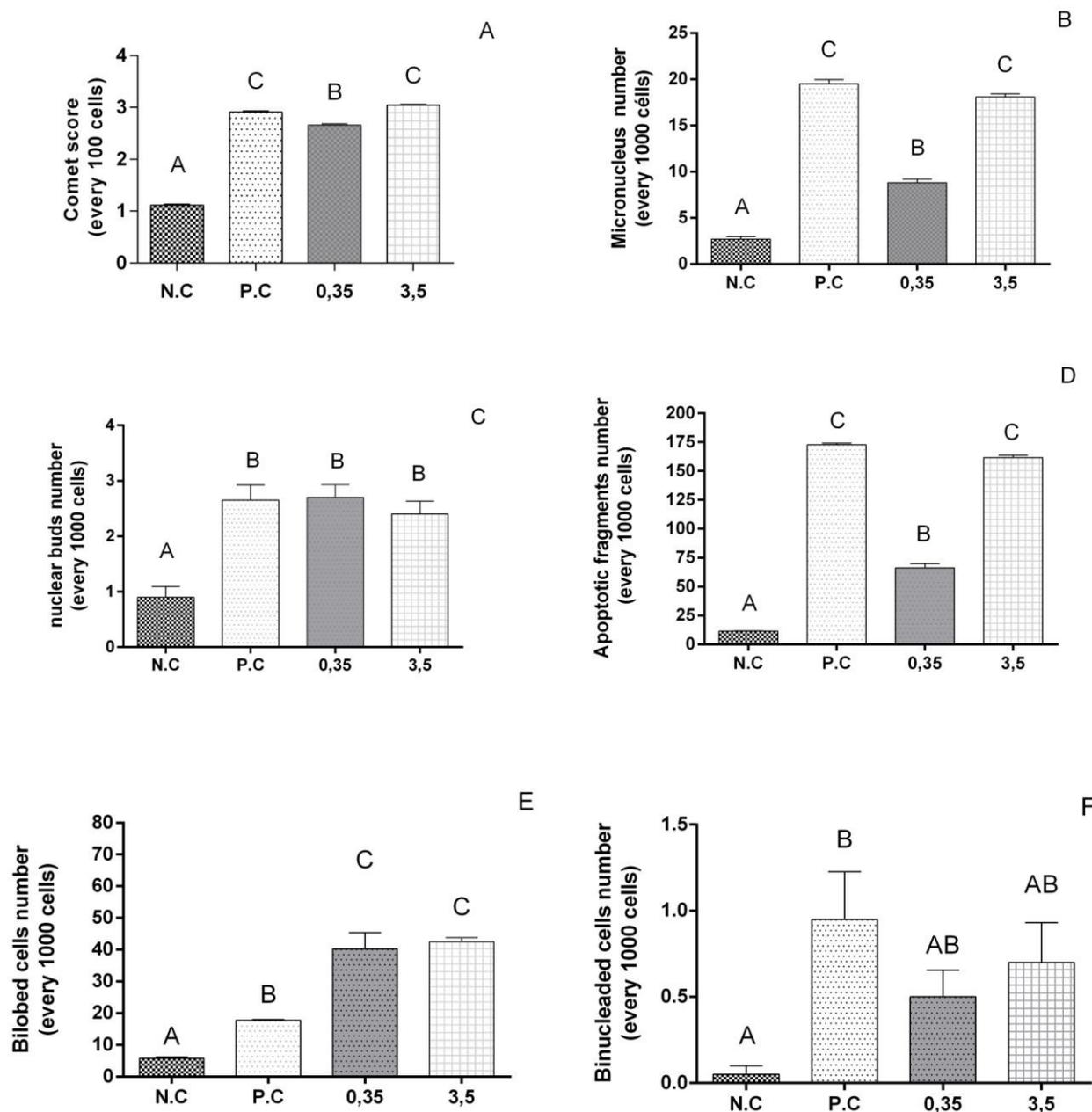


Figura 1. Resultados (média \pm S.D N=20) dos testes do cometa, micronúcleo e anomalias nucleares dos diferentes grupos experimentais sobre os eritrócitos do peixe estuarino *M. furnieri*. **A:** Escores de danos causados ao DNA avaliados através do teste do cometa. **B:** Frequência de micronúcleos. **C:** Frequência de brotamentos nucleares. **D:** Frequência de fragmentos apoptóticos. **E:** Frequência de células bilobadas. **F:** Frequência de células binucleadas. CN: Controle negativo (soro fisiológico e DMSO); CP: Controle positivo (50 $\mu\text{g/g}$ de ciclofosfamida); 0,35: grupo exposto a concentração de 0,35 $\mu\text{g/g}$ de clorotalonil e 3,5: grupo exposto a concentração de 3,5 $\mu\text{g/g}$ de clorotalonil. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre si (Kruskal Wallis - Dunnet, $p < 0,05$).

4. Discussão

Este estudo demonstrou a utilidade da espécie *M. furnieri* como organismo teste para ensaios ecotoxicológicos de curta duração e que, nas doses testadas, o biocida clorotalonil encontrado em tintas anti-incrustantes causa efeitos genotóxicos e mutagênicos neste peixe.

M. furnieri foi utilizada como biomonitor de poluição aquática em alguns estudos (Marcovecchio 2004; Amado et al., 2006), mas apesar disso não há na literatura casos em que a espécie tenha sido testada como organismo-teste para ensaios ecotoxicológicos. Alguns critérios devem ser levados em consideração para a escolha de um organismo-teste, como: elevada disponibilidade e abundância, representatividade de seu nível trófico, significado ambiental em relação à área de estudo, ampla distribuição, importância comercial, facilidades de cultivo e de aclimação às condições de laboratório (Costa et al., 2008). Rand e Petrocelli (1985) sugerem ainda a importância da espécie em ser nativa, motivo da escolha da *M. furnieri* neste estudo. Considerando que esta espécie se enquadra em todos estes critérios e se mostrou sensível aos testes realizados, sugerimos sua utilização como organismo-teste para ensaios ecotoxicológicos de curta duração.

Estudos utilizando biocidas de nova geração têm sido realizados para que se possa ter conhecimento dos efeitos que estes compostos podem trazer a organismos aquáticos não-alvo. Trabalhos de revisão como os de Caux (1996) e Cox (1997) apresentam os resultados para obtidos para diferentes grupos de organismos. Além disso De Lorenzo e Fulton (2012) que demonstraram sua toxicidade para algas, moluscos, crustáceos e peixes. Sanchez e Garayzar et al., (2016) realizaram estudos de expressão gênica expondo o peixe da espécie *Danio rerio* as concentrações de 7,0 µg/L e 35,0 µg/L do clorotalonil e observaram a diminuição da expressão de genes relacionados a imunidade, reprodução e depuração xenobiótica, além do aumento de genes que podem afetar a divisão celular que podem provocar danos ao DNA.

Entretanto, é importante salientar que o presente estudo é o primeiro a demonstrar a ação genotóxica e mutagênica causada pelo clorotalonil em peixes. Neste estudo, observamos que o clorotalonil foi capaz de causar lesões ao DNA nas duas concentrações testadas. Estas lesões indicam perturbações ocorrendo ao nível molecular, gerando instabilidade genômica, que podem levar ao surgimento de mutações caso esses danos não sejam reparados (Goldman e Shafer, 2014), e causar alterações nas células e nos

tecidos, como anormalidades morfológicas, câncer, redução da produção de gametas, afetando até mesmo a viabilidade das populações (Abdelfattah et al., 2017).

Os estudos de Slaninova et al., (2009) e Marques et al., (2016) com o fungicida mancozeb, cujo o mecanismo de ação é o mesmo do clorotalonil, indicaram danos ao DNA de peixes, os quais foram relacionados ao estresse oxidativo. Esses resultados estão de acordo com Ludovici et al., (1997) que relacionaram a indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) aos danos genéticos em eritrócitos de ratos submetidos ao clorotalonil. Nesse sentido, sugerimos que os danos genéticos observados em *M. furnieri* estão relacionados com a geração de EROs.

Biocidas de 2ª geração, como o cloreto de tributilestanho (TBCT) também causam danos ao DNA de peixes marinhos da espécie *Salinus irideus* (Tiano et al., 2001) mesmo em baixas concentrações e durante pouco tempo de exposição (10 µL/ml expostos por 30 minutos). O mesmo efeito ocorreu em peixes de água doce (*Hoplias malabaricus*) expostos à dose de 0,3 µg/g (Ferraro et al., 2004). Outros biocidas anti-incrustantes também são capazes de provocar o mesmo efeito, como foi observado por Barranger et al. (2014) que avaliaram a genotoxicidade do diuron em ostras da espécie *Crassostrea gigas* expostas a 0,4 e 0,6 g/L durante 7 dias, resultando em um aumento da frequência de quebras do DNA, provocados por estresse oxidativo. Chen et al., (2014) avaliaram a indução de estresse oxidativo do biocida DCOIT na espécie de peixe *Oryzias melastigma*, observando que este composto, também fungicida e anti-incrustante, é capaz de provocar esses efeitos em peixes. Nossos dados mostram a mesma situação para o clorotalonil, usado atualmente como biocida anti-incrustante.

Em ambas as doses de clorotalonil foi observada mutagenicidade, sugerindo que a substância é clastogênica, ou seja, um composto capaz de causar quebras no material genético. Agentes genotóxicos presentes no meio podem resultar em dano ao DNA, que quando não reparados, podem levar aos mais diversos tipos de alterações nucleares como, por exemplo, a formação de micronúcleos e outras anomalias (Odagiri et al., 1997), fato que foi observado através dos testes de mutagenicidade em ambas as doses de clorotalonil utilizadas (0,35 e 3,5 µg/g).

5. Conclusão

O peixe estuarino da espécie *M. furnieri* se mostrou um bom organismo-teste, sendo que os biomarcadores estudados demonstraram a sensibilidade da espécie para o

biocida de terceira geração clorotalonil. Mesmo se tratando de um biocida de 3ª geração, introduzido após a proibição dos de segunda geração, é capaz de causar danos ao DNA e provocar aumento na frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares, podendo ser caracterizado como um composto genotóxico e mutagênico para peixes, indicando ser prejudicial para espécies não alvo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo EDITAL CIÊNCIAS DO MAR nº 43/2013 (Projeto CIMAR No 1988/201) que financiou este trabalho. G. Fillmann (PQ 312341/2013-0) was sponsored by CNPq.

6. Referências Bibliográficas

- Abdelfattah, E.A., Augustyniak, M., Yousef, H.A., 2017. Biomonitoring of genotoxicity of industrial fertilizer pollutants in *Aiolopus thalassinus* (Orthoptera: Acrididae) using alkaline comet assay. *Chemosphere*, v.182, p. 762-770.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed.
- Andrade, M.G.S., Reis, S.R.A., Robinson, W.M., Borges-Osório, M.R., 2005. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal, *Rev Odonto Ciência- Fac.Odonto/PUCRS*, v.20, n.28 p. 137-141..
- Amado, L.L., Da Rosa, E.C., Leite, A.M., Moraes, L., Pires, W.V., Pinho, G.L.L., Martins, C.M.G., Robaldo, R.B., Nery, L.E.M., Monserrat, J.M., Bianchini, A., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., 2006. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, n. 2, p. 199–206.
- Barsiene, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Andreikenaite, L., Andersen, O.K., 2006. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology*. v 78, p. 99-104.
- Barranger, A., Akcha, F., Rouxel, J., Brizard, R., Maurouard, E., Pallud, M., Menard, D., Tapie, N., Budzinski, H., Burgeot, T., Benabdelmouna, 2014. A Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquatic Toxicology*, v. 146, p. 93–104.

Blaylock, R. B. et al., (2005) Culture of Spotted, Seatrout (*Cynoscion nebulosus*) in a Closed, Recirculating System. In: Stickney, R., R. Iwamoto, and M. Rust (Ed.). Aquaculture and Stock Enhancement of Finfish: Proceedings of the Thirtyfourth U.S.-Japan Aquaculture Panel Symposium, San Diego, California, U.S. Dept. Commerce, NOAA Tech. Memo. NMFS-F/SPO-85, 76 p

Castro, I.B., Westphal, E., Fillmann, G., 2011. Third generation antifouling paints: new biocides in the aquatic environment. *Quim Nova* 34, 1021–1031.

Caux, P.Y., Kent, R.A., Fan, G.T., Stephenson, G.L., 1996. Environmental fate and effects of chlorothalonil: a Canadian perspective. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* v. 26, p. 45 – 93.

Cestari, M.M., Lemos, P.M.M., Ribeiro, C.A.O., Costa, J.R.M. Alves, P.E., Ferraro, M.V.M., Mantovani, M.S., Fenocchio, A.S., 2004. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genetics and Molecular Biology*, 27(2), 270-274
Chen, L., Ye, R., Xu, Y., Gao, Z., Au, D. W. T., Qian, P. 2014. Comparative safety of the antifouling compound butenolide and 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) to the marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquatic Toxicology*, v 149, p. 116–125.

Cox C., 1997. Chlorothalonil. *Journal of pesticide reform*, v. 17, n 4, p. 14-20.

Costa, R.C., Olivi, P., Botta, C.M.R., Espindola, E.L.G., 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quím. Nova*. v.31 no.7 São Paulo.

Da Silva, J., Heuser, V., Andrade, V., 2003. Biomonitoramento Ambiental. *Genética Toxicológica*. p. 167-178.

Da Costa M.B., Fernandez M.A., Barbieroo D.C., De Melo F.T.V., Otegui M.B.P., Ferreira B.S., 2008, First Record of imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. *Braz.J. Oceanogr.* 56(2): 145-148

Davies, P. E. 1988. Disappearance rates of chlorothalonil (TCIN) in the aquatic environment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. P. v 40, 405–409.

Davies, P., E. 1987. Disappearance rates of chlorothalonil in the aquatic environment. *Bull Environ Contam Toxicol* ;4:405 – 10.

De Brito, L., V., R., Coutinho, R., Cavalcanti, E., S., e Benchimol, M. 2007. The influence of macrofouling on the corrosion behaviour of API 5L X65 carbon steel. *Biofouling*, 23: 193–201

De Lorenzo M.E., Fulton M.H., 2012. Comparative risk assessment of permethrin, chlorothalonil, and diuron to coastal aquatic species. *Mar Poll Bull.* v.64 (7), p. 1291-1299

Dos Santos, D.M., Santos, G.S., Cestari, M.M., Ribeiro, C.A.O., De Assis, H.C.S., Yamamoto, F. Guiloski, I. C., De Marchi, M.R.R., Montone, R.C., 2013. Bioaccumulation of butyltins and liver damage in the demersal fish *Cathorops spixii* (Siluriformes, Ariidae). *Environ Sci Pollut Res.* v 21 p. 3166–3174

Dominguez, L.A.E., Caldas, S.S., Primel, E.G., Fillmann, G., 2014. The Influence of Salinity and Matrix Effect in the Determination of Antifouling Biocides in Estuarine Waters of Patos Lagoon (Southern Brazil). *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 25, No. 7, p. 1302-1310

Ernst, W., Doe, K., Jonah, P., Young, J., Julien, G., Hennigar, P., 1991. The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v, 21, p. 1 – 9.

Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 455, p. 81-95.

Fenech M., Crott J.W., 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis block micronucleus assay. *Mutat Res* 504(1-2):131–136

Ferraro, M.V.M., Fenochio, A.S., Mantovani, M.S., Ribeiro, C.O., Cestari, M.M., 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. v. 27, n. 1, p. 103 – 107.

Gallo A, Tosti E., 2015. Reprotoxicity of the Antifoulant Chlorothalonil in Ascidiacs: An Ecological Risk Assessment. *PLoS ONE* 10(4) p. 1-14

Gallagher, E.P., R.C. Cattley, R. T. Di Giulio. 1992. The acute toxicity and sublethal effects of chlorothalonil in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere* 24:3-10

Goldman, L., Schafer, A.I., 2014. *Goldman Cecil Medicina*. Elsevier. 24^a ed. p. 3264

Hoofman, R. N. and Raat, W. K., 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research*, v. 104 p. 147-152.

Horiguchi T., Kojima M., Hamada F., Kajikawa A., Shiraishi H, Morita M. et al., 2006, Impact of Tributyltin and Triphenyltin on Ivory Shell (*Babylonia japonica*) Populations. *Environ. Health Persp.* 114: 13-19.

Jesus, T.B., Carvalho, C.E.V., 2008. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio. *Oecol Bras*, v. 12, n. 4, p. 680-693.

JURAS, A.A. 1984 Estudo sobre reprodução, regime alimentar e crescimento de *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Teleostei, Sciaenidae), capturada no litoral da Ilha de São Luis do Maranhão - Brasil. São Paulo. 205p. (Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo - USP).

Lebret, K.; Thabard, M.; Hellio, C., 2009. Algae as marine fouling organisms: adhesion damage and prevention. Cap. 4 In: *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*. p. 80-112

Ludovici, M., Casalini, C., Briani, C., Dolara, P., 1997. Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology*. v.117, p. 55–60.

Marcovecchio, J.E., 2004. The use of *Micropogonias furnieri* and *Mugil liza* as bioindicators of heavy metals pollution in La Plata river estuary, Argentina. *Science of the total environment*. v. 323, p. 219-226.

Marques, S.M., Antunes S.C., Pissarra, H., Pereira, M.L., Gonçalves, F., Pereira, R., 2009. Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi Seoane*) from a uranium mine pond. *Aquatic Toxicology*, n. 91p.187–195.

Marques, A., Rego, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2016. Evidences of DNA and chromosomal damage induced by the mancozeb-based fungicide Mancozan® in fish (*Anguilla anguilla* L.). *Pestic Biochem Physiol*. v. 133 p. 52-58.

Martins, T.L., Vargas, V.M.F., 2013. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. v. 8, n. 1.p. 1-11.

Matsumoto, F.E., Cólus, I.M.S., 2000. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology*, 23, v. 2, p. 489 – 492.

Mochida, K., Fujii, K. 2009. In *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*; Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M., Langston, W. J., eds.; Springer: Tokio,

Nakanishi T., 2008, Endocrine disruption induced by organotin compounds; organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor. *J. Toxicol. Sci.* 33: 269-276.

Nunes, B., Braga, M.R., Campos, J.C., Gomes, R., Ramos, A.S., Antunes, S.C., Correia, A.T. 2015. Ecotoxicological effect on zinc pyrithione in the fresh water fish *Gambusia holbroki* v. 24 p. 1896–1905

Odigari Y, Uchida H, Shibazati S. 1997. Interindividual variation in cytogenetic response to X-rays and colchicines measured with the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*, v. 381, p. 1-13.

Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, v.567, p. 109-149.

- Onduka, T., Kakuno, A., Kono., Ito, K., Mochida, K., Fujii, K. 2012. Toxicity of chlorothalonil to marine organisms. *Fish Sci* v.78, p. 1301–1308
- Peakall, D.W., 1994. Biomarkers: the way forward in environment assessment. *Toxicol. Ecotoxicology. News*, v1, p55-60.
- Rand, G.M., Petrocelli, S.R., 1985. *Fundamentals of Aquatic toxicology*. Washington. 665p.
- Rajaguru. P., Kalpana, R., Hema, A., Suba, S., Baskarasethupathi, B., Kumar.P.A and Kalaiselvi, K., 2001. Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the Comet assay. *Environ Mol Mutag* 38:316-322.
- Sánchez Garayzar, A.B., Bahamonde, P.P., Martyniuk, C.J., Betancourt, M., Munkittrick, K.R., 2016. Hepatic gene expression profiling in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the fungicide chlorothalonil, *Comp. Biochem. Physiol., D*. Article in press.
- Serrano-Garcia, L e Montero-Montoya, R., 2001. Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 38, p. 38-45.
- Speit, G., Hartmann, A. 1995. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay) *Mutagenesis*, 10 (1995), pp. 555–559
- Simões, L.N., Gomide, A.T.M., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., Gomes,L.V., 2012. O uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, Maringá, v. 34, n. 2, p. 175-181.
- Singh, N.P., MC Coy, M.T., Tice, R. R. and Ccheider, E. L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. v. 1, n. 175, p. 184-191.
- Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodova, Z. 2009. A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinology letters*, v. 30, p. 1-12.
- Srivastava, P., Singh, A., 2015. Yamano, T., Morita, S., 1995. Effects of pesticides on isolated rat hepatocytes, mitochondria, and microsomes II. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 1–7.
- Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, I.B., Duarte, F.A., Pinho, G.L.L., 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment?. *Journal of Hazardous Materials*, 330, p. 76–82
- Tiano, L., Fedeli, D., Moretti, M. Falcioni, G., 2001. DNA damage induced by organotins on trout-nucleated erythrocytes. *Applied Organometallic Chemistry*. V. 15, p. 575-580.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. and Sasaki, Y. F., 2000. Single Cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. v. 35, p. 206-221.

USEPA, 1999. Registration Eligibility Decision (RED): Chlorothalonil. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, p. 337.

Walker, W., W., Cripe, C., R., Prichard, P., H. 1988. Biological and abiotic degradation of xenobiotic compounds in in-vitro estuarine water and sediment/water systems. *Chemosphere*;17:2255 – 71

Wu, X., Cheng, L., Cao, Z., Yu, Y., 2012. Accumulation of chlorothalonil successively applied to soil and its effect on microbial activity in soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* v. 81, p. 65-69.

Yamano, T., Morita, S., 1995. Effects of pesticides on isolated rat hepatocytes, mitochondria, and microsomes II. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v. 28, p. 1–7.

Ytreberg, E., Bighiu, M.A., Lundgren, L., Eklund, B., 2016. XRF measurements of tin, copper and zinc in antifouling paints coated on leisure boats. *Environmental pollution.* v. 213, p. 594-599.

Zenkner, R. F. F. et al. Avaliação da genotoxicidade do rio pardinho utilizando o ensaio cometa em *Astyanaxfasciatus*, Cuvier, 1819. *Caderno de Pesquisa, série Biologia*, v, 25, n. 3, p. 79-93. 2013.