



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISELE DOS SANTOS MORAIS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE *Chironomus sancticaroli*
STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) A BUTIL BENZIL
FTALATATO E ANTIMÔNIO**

CURITIBA

2018

GISELE DOS SANTOS MORAIS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE *Chironomus sancticaroli*
STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) A BUTIL BENZIL
FTALATATO E ANTIMÔNIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia,
Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.

Biblioteca de Ciências Biológicas.

(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Morais, Gisele dos Santos

Avaliação do efeito da exposição de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) a butil benzil ftalatato e antimônio. / Gisele dos Santos Moraes. – Curitiba, 2018. 119 p. : il. ; 30cm.

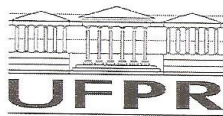
Orientador: Mário Antônio Navarro da Silva

Coorientadora: Marta Margarete Cestari

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Toxicidade. 2. Diptero. 3. Genotoxicidade . I. Título. II. Silva, Mário Antônio Navarro da. III. Cestari, Marta Margarete. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (20. ed.) 615.9



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ENTOMOLOGIA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de GISELE DOS SANTOS MORAIS intitulada: "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE *Chironomus sancticaroli* STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) A BUTIL BENZIL FTALATATO E ANTIMÔNIO", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 25 de Abril de 2018.



MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



WANESSA ALGART RANSDORF
Avaliador Externo (UTFPR)



VINICIUS SOBRINHO RICHARDI
Avaliador Externo (UFPR)



DEBORA REBECHI BAGGIO
Avaliador Externo (FORREST INO)

À minha família pelo apoio, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva pela orientação nos últimos 10 anos, por acreditar nas minhas ideias, confiar no meu trabalho, pelas discussões científicas e pelo constante aprendizado de como fazer ciência. Agradeço também, por me ensinar a ser ética, com o trabalho e com a sociedade, obrigada!

À minha coorientadora Marta Margarete Cestari do Laboratório de Mutagênese Ambiental e Citogenética Animal do departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio na realização do trabalho.

Ao Gustavo Souza Santos do Laboratório de Mutagênese Ambiental e Citogenética Animal, UFPR, pela realização dos ensaios cometa alcalino.

Ao Prof. Marco Grassi do Grupo de Química Ambiental da Universidade Federal do Paraná, pôr-nos auxiliar com a quantificação química. À Loana M. Baika pela quantificação química do antimônio.

À Thalita Bastida Vieira pelos ensinamentos sobre ensaios enzimáticos.

À Universidade Federal do Paraná pela infraestrutura, possibilitando a realização da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e aos professores do curso, pelos ensinamentos.

À banca examinadora pelas contribuições, que com certeza colaboraram para o crescimento e enriquecimento do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

À todos os colegas que estão ou já passaram pelo Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae, Ana Mazza, Alessandro, Angela, Arturo, Betina, Camila, Débora, Emily, Mariana, Tatiana, Thalita e Vinícius pelo convívio, ensinamentos, discussões científicas e momentos de confraternização. Vou sempre lembrar de vocês com muito carinho.

As colegas de pós-graduação e amigas, Betina, Camila Fediuk, Camila Santos, Maria Fernanda (Mafer), Monique, Silvana e Thalita, por estarem sempre disponíveis me aconselhando e me fazendo crescer como pessoa. Agradeço também, pelos inúmeros momentos de alegria, pelos cafezinhos, pelo apoio nos momentos de tristeza e fraqueza, pelo incentivo e compreensão. Agradeço especialmente a Thalita por estar sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins, me encorajando, me dando bronca, me apoiando, e acreditando em mim mesmo quando eu mesmo não acreditava, muito obrigada, você foi essencial nesta conquista. Com certeza sou uma pessoa mais feliz com vocês fazendo parte da minha vida, muito obrigada!!!!

Aos meu pais Elide e Benedito que sempre me incentivaram a estudar. Vocês fazem parte de tudo que eu sou hoje. Obrigada!! Amo vocês!!!

Ao meu esposo Cristiano que me acompanhou em todos os passos, sempre me apoiando me incentivando e me encorajando. Ao meu filho, Pedro que mesmo sem saber foi uma grande força e incentivo para realizações deste trabalho, principalmente quando dizia: “- Só a minha mãe sabe que bicho é esse”. Vocês foram muito mais que essenciais nesta conquista, vocês foram meus pilares de força, coragem e determinação. Sem vocês a realização desta pesquisa não seria possível. Amo vocês!!!!

À minha família, irmãs Gracyelle e Michele, cunhadas Aline, Franciele e Heloísa, cunhados Márcio, Márcio e Robson, sogra Maria e seu esposo Venecir, sogro Joaquim, sobrinhos João, Helena e Valentina, pelo apoio, pelos momentos felizes, pela companhia, força e conselhos, por estarem sempre presentes e por ser essa família maravilhosas que eu adoro, obrigada!!!

Com carinho!

Gisele

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos” (Isaac Newton)

RESUMO

O butil benzil ftalato e o antimônio chegam à água, principalmente, através de atividades, como o descarte inadequado de produtos industriais e domésticos. Entretanto, os efeitos tóxicos sobre os invertebrados aquáticos ainda não são bem conhecidos. Os Chironomidae representam um importante elo na cadeia alimentar se destacando como bioindicadores, apresentando respostas a toxicidade em diferentes níveis de organização biológica. Dessa forma, o objetivo da pesquisa foi avaliar os efeitos genotóxicos, bioquímicos e em parâmetros biológicos de *Chironomus sancticaroli* em exposição ao butil benzil ftalato e antimônio. Foram realizados bioensaios de toxicidade aguda (48 horas), com larvas de quarto instar, subcrônica (oito dias) e crônica (25 dias) com larvas de primeiro instar. Foram avaliadas as concentrações nominais de 0,0001 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ para o butil benzil ftalato (BBP). Para o antimônio (Sb) foram analisadas as concentrações nominais de 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹, sendo as concentrações reais obtidas pelo método de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A genotoxicidade foi avaliada através do ensaio cometa alcalino (N = 10). A avaliação bioquímica foi determinada através da atividade da AChE, EST- α , EST- β , GST, SOD e CAT e peroxidação lipídica (LPO) (N = 20). Foram analisados os parâmetros biológicos de desenvolvimento das larvas (N = 30), tamanho dos adultos (N = 30), ciclo de vida e fecundidade potencial das fêmeas (N = 30). O BBP ocasionou efeitos genotóxicos em exposição aguda (2 mg.L⁻¹) e subcrônica (0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹). Efeito neurotóxico ocorreu em exposição aguda (0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹). A via de biotransformação apresentou alteração com redução da atividade em exposição aguda (EST- α (0,1 mg.L⁻¹) e da GST (0,0001 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹)) e subcrônica (EST- β (0,01 mg.L⁻¹) e GST (0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹)), sendo observada elevada atividade da EST- β (2 mg.L⁻¹) em exposição de 48 horas. Para a via de defesa ao estresse oxidativo, ocorreram aumento da atividade da SOD (1 mg.L⁻¹) em exposição aguda e da CAT (0,001 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹) e SOD (0,001 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹) em exposição subcrônica e redução da atividade da atividade da CAT (0,1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹) em 48 horas de exposição, não ocorrendo danos de LPO. Atrasos no desenvolvimento das larvas foram observados em todas as concentrações avaliadas. O ciclo de vida não apresentou alterações. O número de adultos apresentou queda significativa em 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹ e nas maiores concentrações não ocorreu emergência dos adultos. Machos menores foram observados em 0,001 mg.L⁻¹, não ocorrendo alterações na fecundidade potencial das fêmeas. O Sb ocasionou danos ao DNA em exposição aguda (0,05 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹) e exposição subcrônica (0,05 mg.L⁻¹). O Sb ocasionou aumento da atividade da AChE (0,8 mg.L⁻¹). A via de biotransformação apresentou aumento da atividade em 48 horas (EST- β (0,8 mg.L⁻¹) e GST (0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹)) e oito dias (EST- α (0,0005 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹); EST- β (0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹); GST (0,005 mg.L⁻¹)) de exposição. Para a via de defesa ao estresse oxidativo foram observados aumento da atividade da SOD (0,8 mg.L⁻¹) e CAT (0,5 mg.L⁻¹) em exposição aguda e da CAT (0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹) em exposição subcrônica. Danos de LPO foram observados em 0,001 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹ em exposição subcrônica. O Sb provocou redução do desenvolvimento das larvas em todas as concentrações, e machos e fêmeas menores (0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹). Esses dados demonstram que BBP e Sb apresentam toxicidade sobre *Chironomus sancticaroli* do DNA ao nível populacional.

Palavras-chave: desenvolvimento, efeitos bioquímicos, plastificante, metalóide

ABSTRACT

The benzyl butyl phthalate and antimony, which reach the water, mainly through the inadequate disposal of industrial and domestic products. However, there is limited information on toxicity in aquatic invertebrates. In aquatic ecosystem, the midge family Chironomidae are a trophic link and used with bioindicators, which have toxic responses at different levels of biological organization. In the present study, was investigated the genotoxics, biochemicals and biological effects of benzyl butyl phthalate and antimony in *Chironomus sancticarloi* for acute and chronic exposure. Exposure acute (48 hours), subchronic (eight days) and chronic (25 days) were made, using for stage of larvae and larvae for 72 hours, respectively. The nominal concentrations de 0,0001 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ for benzyl butyl phthalate and 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ and 0,8 mg.L⁻¹ for antimony was analyzed. The real concentrations of antimony was determined for Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrom (ICP OES). The genotoxicity effects were analyzed for DNA damage (N = 10). The biochemicals effects were analyzed the enzymes activity of AChE, EST- α , EST- β , GST, SOD e CAT and lipid peroxidation (LPO). The biology effects was investigated for larvae development (N=30), size of adults (N = 30) and cycle of life (N = 30). The BBP showed genotoxicity effects in acute (2 mg.L⁻¹) and chronic exposure (0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹). Neurotoxicity effects occurred in acute (0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹). The alteration of biotransformation pathway was reduction acute (EST- α (0,1 mg.L⁻¹) and GST (0,0001 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹)) and subchronic (EST- β ((0,01 mg.L⁻¹) e GST (0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹)) exposure and high activity of EST- β (2 mg.L⁻¹) in 48 hours exposure. The pathway of defenses to oxidative stress showed high activity of SOD (1 mg.L⁻¹) in acute exposure and CAT (0,001 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹) and SOD (0,001 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹) in subchronic exposure. Reduction activity of CAT was observed in 48 hours. Lipid peroxidation was not observed. In biology, the BBP cause delays in larval development, reduction of the number of adults (0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹) with inhibition of emergency in the high concentrations. Smoller males were found in 0,001 mg.L⁻¹. The females potential fecundity no change occurred. Antimony caused high activity for AChE (0,8 mg.L⁻¹) in acute exposure. The partway biotransformation showed a high activity in 48 hours (EST- β (0,8 mg.L⁻¹); GST (0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹)) and eight days (EST- α ; EST- β ; GST) exposure. The partway of defenses to oxidative stress showed a high activity of SOD (0,8 mg.L⁻¹) and CAT (0,5 mg.L⁻¹) in acute exposure and CAT (0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹) in subchronic exposure. Lipid peroxidation was observed in chronic exposure (0,001 mg.L⁻¹ 0,005 mg.L⁻¹). In the biology, it occurred delays in larvae development, reduction in the number of adults in concentration larger of than 0,005 mg.L⁻¹. Smaller males and females was observed in the high concentrations. This results indicated that the BBP and Sb caused toxicity effects on *Chironomus sancticarloi* from DNA to population level.

Key-words: development, biochemicals effects, plasticizer, metaloid

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

TOXICIDADE DO BUTIL BENZIL FTALATO EM DIFERENTES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO BIOLÓGICA DE *Chironomus sancticaroli* STRIXINO & STRIXINO, 1981(DIPTERA: CHIRONOMIDAE)

- FIGURA 1. *Chironomus sancticaroli*. (A) Massa ovígera. (B) Larva. (C) Pupa. (D) Adulto, fêmea. 38
- FIGURA 2. Aquários de criação da colônia matriz de *Chironomus sancticaroli*. 38
- FIGURA 3. Bioensaio agudo de 48 horas, demonstrando a disposição dos frascos de vidro na câmara de germinação (BOD). 39
- FIGURA 4. Bioensaio crônico, demonstrando os aquários recobertos e bomba de aeração. .. 40
- FIGURA 5. Danos ao DNA em *Chironomus sancticaroli*. (A) Sem danos. (B) Dano tipo 1. (C) Dano tipo 2. (D) Dano tipo 3. (E) Dano tipo 4. 42
- FIGURA 6. Vista ventral da cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli*, indicando a medida da base da cabeça até a ponta do dente trifido. 45
- FIGURA 7. Asa direita de fêmea de *Chironomus sancticaroli*, demonstrando a medida da região do arculus ao ápice. 46
- FIGURA 8. Porcentagem de mortalidade de larvas de quarto instar de *Chironomus sancticaroli* em exposição aguda (48 horas) a concentrações nominais de BBP. Demonstrando controle água, controle solvente (etanol P. A.) e concentrações avaliadas. 47
- FIGURA 9. Escore de danos ao DNA em larvas de *C. sancticaroli* em exposição a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente, Etanol P.A. (n = 10), indicando mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo. (A) exposição aguda de 48 horas. (B) exposição subcrônica de oito dias. Letras diferentes indicam diferença significativa (Kruskall-Wallis, $p < 0,0001$, com *a posteriori* de Dunnett). 48
- FIGURA 10. Mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo, da atividade enzimática (n = 20) em larvas de *C. sancticaroli* após exposição aguda (48 horas) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A.). Letras diferentes indicam alterações significativa $p < 0,0001$ (Kruskall-Wallis com *a posteriori* de Dunnett). (A) Acetilcolinesterase (AChE) ($\mu\text{moles/mg ptn/min}$). (B) Esterase alfa (EST- α) (nmol α -naftol/ mg ptn / min). (C) Esterase beta (EST- β) (nmol β -naftol/ mg ptn / min). (D) Glutathiona S-transferase (GST) ($\mu\text{moles/mgptn/min}$). (E) Catalase (CAT) ($\mu\text{mol/min/mg de proteína}$). (F) Superóxido dismutase (SOD) (u de sod/ mg de proteína.). (G) peroxidação lipídica (LPO) (nmol de hidroperóxidos/mg de proteína). 51

- FIGURA 11. Mediana primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo da atividade enzimática (n =20) em larvas de *C. sancticaroli* após exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A.). Letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,0001$ (Kruskall-Wallis com *aposteriori* de Dunnett). (A) Acetilcolinesterase (AChE) (μ moles/mg ptn/min). (B) Esterase alfa (EST- α) (nmol α -naftol/mgptn/min). (C) Esterase beta (EST- β) (nmol β - naftol/ mg ptn / min). (D) Glutathiona s-transferase (GST) (μ moles/mgptn/min). (E) Catalase (CAT) (μ mol/min.mg de proteína). (F) Superóxido dismutase (SOD) (u de sod/mg de proteína.). (G) Peroxidação lipídica (LPO) (nmol de hidroperóxidos/mg de proteína)..... 52
- FIGURA 12. Média e desvio padrão do comprimento da cápsula cefálica (mm) de larvas de *Chironomus sancticaroli* (n =30) em exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A.). Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA $p \leq 0,05$, com *aposteriori* de Tukey). 53
- FIGURA 13. Média diária e desvio padrão da emergencia de adultos de *C. sancticaroli* (n = 3 réplicas) após exposição crônica (25 dias) em diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A.). 56
- FIGURA 14. Média e desvio padrão do tamanho das asas de machos (n = 30) e fêmeas (n = 30) de *C.sancticaroli* (mm), após exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P. A.). Letras diferentes indicam alteração significativa (ANOVA $p \leq 0,05$, com *aposteriori* de Tukey)..... 57
- FIGURA 15. Mediana, primeiro e terceiro quartil da fecundidade potencial das fêmeas de *C. sancticaroli* (n = 30) após exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A). Letras diferentes indicam diferença significativa (Kruskall-Wallis, $p < 0,0001$, com *aposteriori* de Dunnett). 57

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO EM DISTINTOS NÍVEIS DE ORGAZINAÇÃO BIOLÓGICA DE

Chironomus sancticaroli STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA:

CHIRONOMIDAE) APÓS EXPOSIÇÃO AO ANTIMÔNIO

- FIGURA 1. Mortalidade porcentual de larvas de quarto instar de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) expostas por 48 horas ao Sb, demonstrando controle água e controle solvente (etanol P. A.) e as concentrações nominais de antimônio. 85
- FIGURA 2. Escore de danos ao DNA em larvas de *C. sancticaroli* em exposição ao antimônio (n = 10), demonstrando mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo. (A)

exposição aguda. (B) exposição subcrônica. Letras diferentes representam alterações significativas, $p < 0,0001$ (Kruskall-Wallis com *a posteriori* de Dunnett)..... 87

FIGURA 3. Mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo da atividade enzimática em larvas de *C. sancticaroli* após exposição aguda (48 horas) a diferentes concentrações de antimônio e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). Letras diferentes indicam alterações significativas para $p < 0,0001$ (Kruskall-Wallis com *a posteriori* de Dunnett). (A) acetilcolinesterase (AChE) ($\mu\text{moles/mgptn/min}$). (B) esterase alfa (EST- α) ($\text{nmol}\alpha\text{-naftol/mgptn/min}$). (C) esterase beta (EST- β) ($\text{nmol}\beta\text{-naftol/mgptn/min}$). (D) glutational s-transferase (GST) ($\mu\text{moles/mg ptn/min}$). (E) catalase (CAT) ($\mu\text{mol/min/mg de proteína}$). (F) superóxido dismutase (SOD) (U desod/mg de proteína). (G) peroxidação lipídica (LPO) (nmol de hidroperóxidos/mg de proteína). 89

FIGURA 4. Mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo da atividade enzimática em larvas de *C. sancticaroli* após exposição sucrônica (oito dias) a diferentes concentrações de antimônio e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). Letras diferentes indicam alterações significativas para $p < 0,0001$ (Kruskall-Wallis com *a posteriori* de Dunnett). (A) acetilcolinesterase (AChE) $\mu\text{moles/mgptn/min}$. (B) esterase alfa (EST-A) ($\text{nmol}\alpha\text{-naftol/mgptn/min}$). (C) esterase beta (EST-B) ($\text{nmol}\beta\text{naftol/mgptn/min}$). (D) glutational S-transferase (GST) ($\mu\text{moles/mgptn/min}$). (E) catalase (CAT) ($\mu\text{mol.min/.mg de proteína}$). (F) superóxido dismutase (SOD) (udesod/mg de proteína). (G) peroxidação lipídica (LPO) (nmol de hidroperóxidos/mg de proteína). 90

FIGURA 5. Média e desvio padrão do comprimento da cápsula cefálica (mm) de larvas de *Chironomus sancticaroli* ($n = 30$) após exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de antimônio e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA com *a posteriori* de Tukey $p \leq 0,05$)..... 91

FIGURA 6. Média diária e desvio padrão da emergência de adultos ($n = 3$) de *C. sancticaroli* em exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de Sb e grupos controle água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). 94

FIGURA 8. Média e desvio padrão do tamanho das asas de machos ($n = 30$) e fêmeas ($n = 30$) de *C. sancticaroli* expostas por 25 dias a diferentes concentrações de Sb e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA com *a posteriori* de Tukey, $p \leq 0,05$). 95

FIGURA 9. Mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo da fecundidade potencial das fêmeas (n =30) após exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de Sb e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). Letras diferentes indicam diferença significativa (Kruskall-Wallis, $p < 0,0001$ com *a posteriori* de Dunnett).
.....96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TOXICIDADE DO BUTIL BENZIL FTALATO EM DIFERENTES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO BIOLÓGICA DE *Chironomus sancticaroli* STRIXINO & STRIXINO, 1981(DIPTERA: CHIRONOMIDAE)

- TABELA 1. Porcentagem de redução da cápsula cefálica (n=30) de larvas *Chironomus sancticaroli* em exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de BBP, em relação aos grupos controles. 53
- TABELA 2. Valores mínimos e máximos do comprimento da cápsula cefálica (mm) de larvas de *C. sancticaroli* após exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controle água e solvente (Etanol P.A.). O símbolo (-) representa ausência de larvas. 54
- TABELA 3. Porcentagem de larvas de *C. sancticaroli* de cada instar (n = 30) por grupos controles água e solvente (Etanol P.A.) e diferentes concentrações de BBP, após exposição subcrônica (oito dias) ao BBP. Letras diferentes indicam resultado significativo, $p \leq 0,05$ (Mann- Whitney par a par)..... 54
- TABELA 4. Média e desvio padrão da emergência dos adultos (n = 300) e do início da emergência de machos e fêmeas (n=3 réplicas) de *C. sancticaroli*, após a exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A.). O símbolo (-) indica ausência de diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$, com *a posteriori* de Tukey)..... 55

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO EM DISTINTOS NÍVEIS DE ORGAZINAÇÃO BIOLÓGICA DE *Chironomus sancticaroli* STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) APÓS EXPOSIÇÃO AO ANTIMÔNIO

- TABELA 1. Concentrações nominais e reais do antimônio total em exposição aguda (48 horas). O símbolo (*) indica diferença significativa para as concentrações reais iniciais e reais finais de Sb (ANOVA com *a posteriori* de Tukey $p \leq 0,05$) 85
- TABELA 2. Concentrações nominais e reais do antimônio total em exposição subcrônica (oito dias). O símbolo (*) indica diferença significativa para as concentrações reais iniciais e reais finais (ANOVA com *a posteriori* de Tukey $p \leq 0,05$) 86

TABELA 3. Porcentagem de redução da cápsula cefálica (n = 30) de larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> em exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de Sb, em relação aos grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1).	92
TABELA 4. Valores mínimos e máximos do comprimento da cápsula cefálica (mm) para cada instar (mm) (n = 30) de larvas de <i>C. sancticaroli</i> expostas a oito dias a diferentes concentrações de Sb e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). O símbolo (–) representa ausência de larvas.	92
TABELA 5. Porcentagem de larvas de <i>C. sancticaroli</i> (n = 30) de cada instar por grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1) e expostas a diferentes concentrações de Sb, após exposição subcrônica (8 dias). Letras diferentes indicam resultado significativo, $p \leq 0,05$ (Mann- Whitney par a par).	93
TABELA 6. Média e desvio padrão da emergência dos adultos (n = 300) e do início da emergência de machos (n =3) e fêmeas (n =3) de <i>C. sancticaroli</i> após a exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de Sb e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). O símbolo (–) indica ausência de diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$, com <i>a posteriori</i> de Tukey).....	94
TABELA 7. Porcentagem de redução do tamanho das asas de machos (n = 30) e fêmeas (n = 30) de <i>C. sancticaroli</i> , após exposição crônica a diferentes concentrações de Sb em relação aos grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1).....	95

LISTA DE SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ATC	Iodeto de acetiltiocolina
ATO	Trióxido de antimônio
ATSDR	Agência para o registro de substâncias tóxicas e Doenças
BBP	Butil benzil ftalato
BHT	Hidroxitolueno butilado cristalino
BSA	Albumina soro bovina
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CVG	<i>Chemical Vapor Generation</i>
CL	Concentração letal
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DEHP	Di (2-etilhexil) ftalato
DEET	Diethyl Toluamide
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato
DZUP	Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure da Universidade Federal do Paraná
EcR	Receptor da Ecdisona
EST- α	Esterase alfa
EST- β	Esterase beta
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
HCl	Ácido clorídrico
ICP OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
LAMFIC ²	Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae
LMP	Agarose de baixo ponto de ebulição
LPO	Peroxidação lipídica

MHz	Megahertz
OECD	Organização para Cooperação o Desenvolvimento Econômico
PBS	Tampão fosfato salino
PBDEs	Éteres de difenila polibromados
PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Policloreto de vinila
Rpm	Rotação por minutos
SOD	Superóxido dismutase
TDS	Produtos sólidos totais
UFPR	Universidade Federal do Paraná
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetros
[]	Concentração
°C	Graus Celsius
=	Igual
>	Maior
±	Mais ou menos
≤	Menor igual
F	Fecundidade potencial
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
KCl	Cloreto de potássio
g	Gramas
l.min ⁻¹	Litros por minutos
ml	Mililitro
mM	Micromol
mA	Miliamperes
mg.L ⁻¹	Miligramas por litro
mol.L ⁻¹	Mol por litro
MΩ	Megaohm
NaOH	Hidróxido de sódio
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
nm	Nanômetros
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μg/ml	Microgramas por mililitro
μg.l ⁻¹	Microgramas por litro
μm	Micrometros
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
%	Porcentagem
®	Registrado

W	Watts
Sb	Antimônio
SbCl ₃	Cloreto de antimônio
SbO ₃	Peróxido de antimônio
u	Unidade
V	Volts
x	Veze

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	24
REFERÊNCIAS	28
OBJETIVO GERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	31
CAPÍTULO I TOXICIDADE DO BUTIL BENZIL FTALATO EM DIFERENTES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO BIOLÓGICA DE <i>Chironomus sancticaroli</i> STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)	32
RESUMO	33
1 INTRODUÇÃO	34
2 MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1. Material biológico	36
2.2. Avaliação da colônia matriz.....	36
2.3. Bioensaios de toxicidade.....	37
2.3.1. Condições dos bioensaios	37
2.3.2. Ensaios de toxicidade aguda (48 horas).....	39
2.3.3. Exposição subcrônica (oito dias) e crônica (25 dias).....	40
2.4. Biomarcador genético	41
2.5. Biomarcadores bioquímicos.....	42
2.6. Parâmetros biológicos	44
2.7. Análise dos dados.....	46
3 RESULTADOS	46
3.1. Testes de mortalidade.....	46
3.2. Biomarcador genético	47
3.3. Biomarcadores bioquímicos.....	48
3.4. Parâmetros biológicos	53
4 DISCUSSÃO	58

5	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64
	CAPÍTULO II AVALIAÇÃO EM DISTINTOS NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO BIOLÓGICA DE <i>Chironomus sancticarloi</i> STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) APÓS EXPOSIÇÃO AO ANTIMÔNIO	71
	RESUMO	72
1	INTRODUÇÃO	73
2	MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1.	Material biológico	75
2.2.	Avaliação da colônia matriz.....	76
2.3.	Bioensaios de toxicidade.....	76
2.3.1.	Condições dos bioensaios	76
2.3.2.	Ensaio de toxicidade aguda (48 horas).....	77
2.3.3.	Exposição subcrônica (oito dias) e crônica (25 dias).....	78
2.4.	Determinação das concentrações reais do Sb na água	79
2.5.	Biomarcador genético	80
2.6.	Biomarcadores bioquímicos.....	80
2.7.	Parâmetros biológicos	83
2.8.	Análise dos dados.....	84
3	RESULTADOS	84
3.1.	Testes de mortalidade.....	84
3.2.	Determinação das concentrações reais do Sb na água	85
3.3.	Biomarcador genético	86
3.4.	Biomarcadores bioquímicos.....	86
3.5.	Parâmetros biológicos	91
4	DISCUSSÃO	96
5	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	103

CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS	111

INTRODUÇÃO

O meio ambiente é constantemente degradado por poluentes ambientais, sendo a água altamente impactada (GOULART; CALLISTO, 2003). Os contaminantes são originados sobretudo pela atividade antrópica chegando ao meio aquático através do processo de produção, uso e destino final de produtos industrializados, como plástico e cosméticos, e artigos domésticos (LAPWORTH et al., 2012; WIEK; LARSON, 2012). Neste meio, as substâncias podem estar presente na coluna de água, sedimento e organismos, gerando efeitos tóxicos diretos ou pela acumulação nas cadeias tróficas (HERRERO et al., 2014).

Bioindicadores são organismos, espécies ou comunidades que respondem às alterações ambientais, modificando funções metabólicas ou acumulando agentes tóxicos (CALLISTO; ESTEVES, 1998). Dentre estes, os invertebrados aquáticos são indicados como organismos modelo para teste de toxicidade ambiental em consequência ao ciclo de vida relativamente curto e elevada densidade populacional, possibilitando estabelecer a relação entre a presença de poluentes e os efeitos decorrentes em diferentes níveis de organização biológica (MARINKOVIĆ et al., 2011; OECD, 2011).

Os invertebrados aquáticos são considerados indicadores do estágio inicial de degradação, auxiliando no conhecimento das consequências futuras da contaminação ambiental (CAREW et al., 2013). Dentre os insetos, amplamente utilizados como organismos bioindicadores, se destaca a família Chironomidae (CHOI, 2005; NICACIO; JUEEN, 2015; KRANZFELDER; FERRINGTON, 2016). Esta apresenta elevada importância no meio aquático no processamento da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, representando importante elo para níveis tróficos superiores (PARK; KWAK, 2008).

A família Chironomidae apresenta ampla distribuição mundial e ciclo de vida relativamente curto, com quatro estágios, ovo, larva, pupa e adulto (CRANSTON, 1995). Os imaturos vivem em ambientes aquáticos associados ao sedimento, sendo apenas os adultos terrestres (CRANSTON, 1995). As larvas são metabolicamente ativas e por isso apresentam maior nível de repostas ao estresse ambiental, podendo ocorrer respostas á toxicidade em diferentes níveis de organização biológica, do molecular ao populacional (ROH et al., 2007; LEE; CHOI, 2009; NAIR et al., 2011; ARAMBOUROU et al., 2014).

A avaliação dos efeitos tóxicos em diferentes níveis de organização biológica ajuda a determinar o mecanismo de ação dos poluentes, traz informações sobre o risco ambiental gerado em presença dos contaminantes, auxiliando a estabelecer limites que assegurem a viabilidade dos organismos no ambiente.

Diferentes biomarcadores, que representam alterações subletais resultantes da exposição à xenobióticos, têm sido utilizados para a avaliação da toxicidade ambiental (HYNE; MAHER, 2003). Em nível molecular, os danos ao DNA representam uma ferramenta rápida e sensível ao estresse ambiental que permitem determinar alterações estruturais do material genético, como quebra de fita simples e fita dupla (LEE et al., 2006; MORAIS et al., 2014; VICENTINI et al., 2017).

As alterações bioquímicas também são consideradas respostas eficientes, podendo-se avaliar a atividade de enzimas representantes de diferentes vias de atuação bioquímicas como de transmissão do impulso nervoso, de biotransformação, de defesa ao estresse oxidativo, assim como danos de peroxidação lipídica (RAKOTONDRAVELO et al., 2006; MARINKOVIĆ et al., 2011; DURAN et al., 2012; VICENTINI et al., 2017). Em nível populacional, parâmetros de mortalidade, alterações no desenvolvimento, emergência e reprodução têm demonstrado relevantes informações na determinação do impacto dos poluentes sobre os organismos (MORAIS et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015; NYBOM et al., 2016; PARK; KWAK, 2018).

Entre os poluentes ambientais, os ftalatos e o antimônio são amplamente distribuídos no meio aquático e, devido às propriedades tóxicas sobre os organismos, apresentam elevado interesse no estudo de toxicidade ambiental (STAPLES et al., 1997, 2000; NAM et al., 2009; PLANELLÓ et al., 2011b; DURAN et al., 2012; MANKIDY et al., 2013; HERRERO et al., 2015).

Os ftalatos ou ésteres de ácido ftálico são compostos incolores, oleosos e sem cheiro, utilizado em diversas áreas da indústria, principalmente na produção de plásticos, empregado para tornar o produto maleável, transparente e resistente (VITALI et al., 1997; HORN et al., 2004; OTERO et al., 2015). Esses compostos apresentam fraca ligação com o plástico, podendo chegar ao ambiente por meio de volatilização, extração, na presença de material líquido, como óleos e graxas, e migração, quando duas superfícies estão em contato (HEUDORF et al., 2007). Isto provoca o aumento da concentração dos ftalatos no ambiente, em água e nos alimentos, tornando-se disponíveis aos organismos vivos (HEUDORF et al., 2007).

No meio aquático os ftalatos estão presentes, principalmente, por resíduos da produção, uso e descarte inadequado de material plástico (EMA; MIYAWAKI, 2002). Apresentam ampla distribuição nos corpos de água apresentando no Brasil valores entre 0,5 ng.L⁻¹ e 33,1 mg.L⁻¹ para água superficiais, entre eles o butil benzil ftalato (BBP) (MONTAGNER et al., 2017). Estudos sobre a toxicidade do BBP estão, na grande maioria restritos a células humanas e mamíferos, possuindo informações escassas sobre os efeitos

tóxicos em invertebrados bentônicos (PLANELLÓ et al., 2011; HERRERO et al., 2014, 2015). Apesar da presença no ambiente aquático e os indícios da toxicidade, no Brasil não são estipulados limites ambientais para ftalatos.

O antimônio (Sb) é um metalóide, utilizado na produção têxtil, de plástico, resinas e no tratamento da Leishmaniose (WHO, 2003; BARRERA et al., 2017). O Sb é obtido a partir de diferentes compostos, sendo o mais utilizado o trióxido de antimônio (ATO) (WHO, 2003). Esses chegam ao ambiente elevando as concentrações naturais de antimônio, alcançando aumento de 50% entre os anos 1970 e 2000 na atmosfera (KRACHLER, 2005). O aumento da concentração do Sb e a elevada utilização de compostos de antimônio geraram preocupação em relação à toxicidade sobre organismos e risco ambiental, sendo considerados relevantes para estudos da toxicidade (US-EPA, 2014).

O ATO é principalmente utilizado como retardante de chamas e entra no ambiente sobretudo como resultado do lançamento inadequado de efluentes industriais e queima de materiais domésticos, sendo amplamente encontrado na água e no solo (WHO, 2003). No meio aquático o ATO apresenta elevada diluição liberando o Sb, principalmente, na forma de íon Sb^{3+} , que apresenta elevada estabilidade podendo ser oxidado a forma de íon Sb^{5+} na presença de substrato, contendo ácido húmico, e de microorganismo em percentual $< 0,1 \%$ (USEPA, 2014). O íon Sb^{3+} é a forma do antimônio considerada a mais tóxica aos organismos aquáticos permanecendo associada ao sedimento ou dispersa na coluna de água (ELLIOTT et al., 1998; WHO, 2003; USEPA, 2014). No Brasil o limite máximo do antimônio em água doce, classe I e II, e potável é de $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$, de acordo com a resolução 357 de 2005 (CONAMA, 2005). No entanto, ainda existe pouca informação disponível sobre os efeitos tóxicos sobre os invertebrados aquáticos.

Neste cenário, atualmente, existe o desafio de se conhecer os efeitos tóxicos sobre os organismos e o impacto dos xenobióticos sobre o ecossistema, que podem auxiliar a estabelecer limites para a presença dos contaminantes na água. Dessa forma, esta pesquisa buscou trazer informações sobre os efeitos tóxicos do BBP e Sb em diferentes níveis de organização biológica, utilizando a espécie neotropical *Chironomus sancticaroli* como organismo modelo, dividindo-se em dois capítulos:

Capítulo I: “Toxicidade do butil benzil ftalato em diferentes níveis de organização biológica de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981(Diptera: Chironomidae)”, que tem o objetivo de determinar os efeitos genotóxicos, bioquímicos e em parâmetros biológicos, do BBP sobre *Chironomus sancticaroli*.

Capítulo II: “Avaliação em distintos níveis de organização biológica de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) após exposição ao antimônio”, que tem o objetivo de avaliar os efeitos genotóxicos, bioquímicos e em parâmetros biológicos de *Chironomus sancticaroli* ocasionados pelo antimônio.

REFERÊNCIAS

- ARAMBOUROU, H.; BEISEL, J. N.; BRANCHU, P.; DEBAT, V. Exposure to sediments from polluted rivers has limited phenotypic effects on larvae and adults of *Chironomus riparius*. **Science of the Total Environment**, v. 484, n. 1, p. 92–101, 2014.
- BARRERA, M. C.; ROJAS, L. J.; WEISS, A.; et al. Profiling gene expression of antimony response genes in *Leishmania (Viannia) panamensis* and infected macrophages and its relationship with drug susceptibility. **Acta Tropica**, v. 176, p. 355-363, 2017.
- CALLISTO, M.; ESTEVES, F. D. A. Biomonitoramento da macrofauna bentônica de Chironomidae (Diptera) em dois igarapés amazônicos sob influência das atividades de uma mineração de bauxita. **Oecologia Brasiliensis**, 1998.
- CAREW, M. E.; PETTIGROVE, V. J.; METZELING, L.; HOFFMANN, A. A. Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. **Frontiers in Zoology**, v. 10, n. 1, p. 45, 2013.
- CHOI, J. Ecotoxicological Biomonitoring at Different Levels of Biological Organization and Its Application in *Chironomus* spp. **Journals in Environmental Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2005.
- DURAN, M.; MICHAILOVA, P.; SARI, A.; et al. Assessment of the sediment toxicity in Bulgarian and Turkish Rivers using the biomarkers in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae). **Acta Zoologica Bulgarica**, v. 64, n. Suppl. 4, p. 167–173, 2012.
- ELLIOTT, B. M.; MACKAY, J. M.; CLAY, P.; ASHBY, J. An assessment of the genetic toxicology of antimony trioxide. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 415, n. 1-2, p. 109–117, 1998.
- EMA, M.; MIYAWAKI, E. Effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzyl phthalate during late pregnancy. **Reproductive Toxicology**, v. 16, p. 71–76, 2002.
- HAHN, N. S.; FUGI, R. Alimentação de peixes em reservatórios brasileiros: alterações e consequências nos estágios iniciais do represamento. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n.4, p.469-480. 2007
- HERRERO, O.; PLANELLÓ, R.; AQUILINO, M.; MORCILLO, G. Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius* (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad. **Revista de Toxicología**, v. 31, p. 176–186, 2014.
- HERRERO, Ó.; PLANELLÓ, R.; MORCILLO, G. Chemosphere The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress , the energy metabolism , and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. **Chemosphere**, v. 128, p. 266–277, 2015.
- HORN, O.; NALLI, S.; COOPER, D.; NICELL, J. Plasticizer metabolites in the environment. **Water Research**, v. 38, p. 3693–3698, 2004.

KRANZFELDER, P.; FERRINGTON, L. C. Temporal and spatial variability of Chironomidae (Diptera) species emergence in a Neotropical estuary. **Freshwater Science**, v. 35, n. 2, p. 631–643, 2016.

LAPWORTH, D. J.; BARAN, N.; STUART, M. E.; WARD, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 287–303, 2012.

LEE, S. W.; CHOI, J. Multi-level ecotoxicity assay on the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) exposed to octachlorostyrene. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 269–274, 2009.

LEE, S.-M.; LEE, S.-B.; PARK, C.-H.; CHOI, J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, n. 6, p. 1074–1081, 2006.

MARINKOVIĆ, M.; VERWEIJ, R. A.; NUMMERDOR, G. A.; et al. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to compounds with different modes of action. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 4, p. 1645–51, 2011.

MATERIALS, P. Preliminary Materials for the Integrated Risk Information System (IRIS) Toxicological Review of Butyl Benzyl Phthalate (BBP). USEPA, p. 1–215, 2014.

MORAIS, S.; PESENTI, E. C.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 323–328, 2014.

NAIR, P. M. G.; PARK, S. Y.; LEE, S. W.; CHOI, J. Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 31–37, 2011.

NICACIO, G.; JUEN, L. Chironomids as indicators in freshwater ecosystems: An assessment of the literature. **Insect Conservation and Diversity**, v. 8, n. 5, p. 393–403, 2015.

NYBOM, I.; ABEL, S.; WAISSI, G.; et al. Effects of Activated Carbon on PCB Bioaccumulation and Biological Responses of *Chironomus riparius* in Full Life Cycle Test. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 252–5260, 2016.

OTERO, P.; SAHA, S. K.; MOANE, S.; et al. Improved method for rapid detection of phthalates in bottled water by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical**, v. 997, p. 229–235, 2015.

PARK, K.; KWAK, I. S. Assessment of potential biomarkers, metallothionein and vitellogenin mRNA expressions in various chemically exposed benthic *Chironomus riparius* larvae. **Ocean Science Journal**, v. 47, n. 4, p. 435–444, 2012.

PARK, K.; KWAK, I.-S. Disrupting effects of antibiotic sulfathiazole on developmental process during sensitive life-cycle stage of *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, v. 190, p. 25–34, 2018.

PLANELLÓ, R.; HERRERO, O.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system , the stress response and ribosomes. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 62–70, 2011.

RAKOTONDRAVELO, M. L.; ANDERSON, T. D.; CHARLTON, R. E.; ZHU, K. Y. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 360–366, 2006.

RODRIGUES, A. C. M.; GRAVATO, C.; QUINTANEIRO, C.; et al. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 506–513, 2015.

ROH, J.-Y.; JUNG, I.-H.; LEE, J.-Y.; CHOI, J. Toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology**, v. 237, p. 126–133, 2007.

SANSEVERIANO, A. M.; NESSIMIAN, J. L. Assimetria Flutuante Em Organismos Aquáticos E Sua Aplicação Para Avaliação De Impactos Ambientais. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 382–405, 2008.

STAPLES, C. A.; PARKERTON, T. F.; PETERSON, D. R. A risk assessment of selected phthalate esters in North American and Western European surface waters. **Chemosphere**, v. 40, n. 8, p. 885–891, 2000.

US-EPA. United States Environmental Protection Agency. U S environmental Protection Agency, p. 1–16, 2012.

VICENTINI, M.; MORAIS, G. S.; REBECCHI-BAGGIO, D. R.; RICHARDI, V. S.; SANTOS, G. S.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. Benzo (a) pyrene Exposure Causes Genotoxic and Biochemical Changes in the Midge Larvae of *Chironomus sancticarloi* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). **Neotropical Entomology**, v.46, n. 6. p.658-665-2017.

VITALI, M.; CREMISINI, C.; GUIDOTTI, M.; MACILENT, G. Phthalate esters in freshwaters as markers of contamination sources-a site study in Italy. **Pergamon Environment International**, v. 23, n. 3, p. 337–347, 1997.

WHO. Antimony in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Who, p. 1–9, 2003. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/antimony.pdf. Acesso em: 15/08/2017

WIEK, A.; LARSON, K. L. Water, People, and Sustainability—A Systems Framework for Analyzing and Assessing Water Governance Regimes. **Water Resources Management**, v. 26, n. 11, p. 3153–3171, 2012.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos genotóxicos, bioquímicos e em parâmetros biológicos de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixno, 1981 (Diptera: Chironomidae) após exposição a butil benzil ftalato e antimônio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar os possíveis danos ao DNA em *Chironomus sancticaroli* ocasionados pela exposição aguda (48 horas) e subcrônica (oito dias) a butil benzil ftalato e antimônio.

- Avaliar a atividade enzimática da acetilcolinesterase, esterase alfa, esterase beta, glutationa S-transferase, catalase, superóxido dismutase e peroxidação lipídica em *Chironomus sancticaroli* em exposição aguda (48 horas) e subcrônica (oito dias) a butil benzil ftalato e antimônio.

- Analisar o tamanho das larvas em exposição subcrônica (oito dias) a butil benzil ftalato e antimônio.

- Determinar alterações no ciclo de vida, tamanho dos adultos e fecundidade potencial das fêmeas de *Chironomus sancticaroli* em exposição crônica (25 dias) a butil benzil ftalato e antimônio.

CAPÍTULO I
TOXICIDADE DO BUTIL BENZIL FTALATO EM DIFERENTES NÍVEIS DE
ORGANIZAÇÃO BIOLÓGICA DE *Chironomus sancticaroli* STRIXINO & STRIXINO,
1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)

RESUMO

O butil benzil fatalato (BBP) é amplamente utilizado na produção de plástico, empregado para tornar o produto maleável, transparente e resistente. Chega ao meio aquático durante o processo de produção, uso e descarte de produtos plásticos e derivados. Entretanto, os efeitos tóxicos sobre os invertebrados aquáticos ainda são pouco conhecidos. Os Chironomidae são organismos amplamente utilizados como bioindicadores, com ampla distribuição, elevada densidade populacional e ciclo de vida relativamente curto, o que possibilita a determinação de respostas a toxicidade em elevados níveis de organização biológica. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos genotóxicos, bioquímicos, e nos parâmetros biológicos de *Chironomus sancticaroli* em exposição ao BBP. Foram realizados bioensaios de toxicidade aguda (48 horas), com larvas de quarto instar, subcrônicos (oito dias) e crônicos (25 dias), com larvas de primeiro instar, expondo os organismos a seis concentrações nominais 0,0001 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹. Para avaliar a genotoxicidade foram determinados os danos ao DNA através do ensaio cometa alcalino (N = 10). As alterações bioquímicas foram determinadas pela atividade das enzimas AChE, EST- α , EST- β , GST, SOD e CAT e de danos de peroxidação lipídica (n = 20). Nos parâmetros biológicos foram avaliados o desenvolvimento das larvas, através do tamanho da cápsula cefálica e instares larvais (N = 30), o ciclo de vida, através da emergência dos machos e fêmeas (N = 3), o tamanho dos adultos, através do comprimento das asas dos machos e fêmeas (N = 30) e a fecundidade potencial das fêmeas (N = 30). O BBP apresentou efeitos genotóxicos em exposição aguda (2 mg.L⁻¹) e crônica (0,01 mg.L⁻¹ a 2 mg.L⁻¹). Dentre os efeitos bioquímicos o BBP ocasionou redução da atividade da AChE (0,01 mg.L⁻¹ a 1 mg.L⁻¹) em exposição aguda, indicando neurotoxicidade. Na via de biotransformação foram observadas redução da atividade da EST- α (0,1) e da GST, em exposição aguda (0,0001; 0,01 a 2), e EST- β (0,01 mg.L⁻¹) e GST (0,01 mg.L⁻¹ a 2 mg.L⁻¹) em exposição subcrônica e aumento da atividade da EST- β (2 mg.L⁻¹) em exposição de 48 horas. Na via de defesa ao estresse oxidativo ocorreu aumento da atividade de SOD (1 mg.L⁻¹) em exposição aguda e de CAT (0,1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹) e SOD (0,001 mg.L⁻¹ a 1 mg.L⁻¹) em exposição crônica. Danos de peroxidação lipídica não foram observados. Na biologia, o BBP provocou redução do desenvolvimento das larvas em todas as concentrações avaliadas. No ciclo de vida não foram observadas alterações nas concentrações de 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹, enquanto que nas concentrações de 0,01 mg.L⁻¹ a 2 mg.L⁻¹ não foi observado emergência de organismos adultos. O número de adultos apresentou apenas 53% em 0,0001 mg.L⁻¹ e 40% em 0,001 mg.L⁻¹. Machos apresentaram asas menores em 0,001 mg.L⁻¹. Esses resultados demonstram que o BBP atua em diferentes níveis de organização do DNA a população, ocasionando efeitos genotóxicos, neurotóxicos e bioquímicos. Da mesma forma, o BBP ocasiona atrasos no desenvolvimento das larvas, machos menores, inviabilizando a emergência dos adultos de *Chironomus sancticaroli* em elevadas concentrações. Isto demonstra que o BBP provoca efeitos tóxicos do nível molecular ao nível populacional.

Palavras chave: bioensaios, desenvolvimento, ciclo de vida, plastificante.

1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental ocasiona a presença de uma grande variedade de compostos químicos na água, dentre eles os desreguladores endócrinos (SODRÉ et al., 2007; MONTAGNER et al., 2017). Estes compostos atuam de forma similar a hormônios, tendo como principal consequência alterações no desenvolvimento e na reprodução dos organismos (WATTS et al., 2001; EMA; MIYAWAKI, 2002; HAHN; SCHULZ, 2002; FOSTER, 2006; BILA; DEZOTTI, 2007; MARINKOVIĆ et al., 2011; CAMPOS et al., 2016; IKELE et al., 2016). Entre esses, no meio aquático, os ftalatos ganham destaque possuindo elevada relevância no estudo de toxicidade ambiental, sendo listado como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA 2007) e a Agência para o registro de substâncias tóxicas e Doenças (ATSDR) (2013).

O éster butil benzil ftalato (BBP) é muito utilizado no setor industrial, principalmente na produção de plástico, como o PVC, podendo, também, ser encontrado em grande variedade de produtos, como equipamentos médicos, papel filme, tintas, cosméticos, brinquedos, embalagens de alimentos e recipientes de armazenamento de água (HORN et al., 2004; SHEN, 2005; US-EPA, 2007; HEUDORF et al., 2007; HE et al., 2015; OTERO et al., 2015). É empregado como um lubrificante que facilita o deslizamento das cadeias poliméricas provocando o agrupamento delas, devido a diminuição do atrito entre as moléculas, tornando o produto mais maleável, transparente e durável (VITALI et al., 1997; OTERO et al., 2015). Dessa forma, apresenta ligação reversível com o plástico podendo migrar, na presença de duas superfícies em contato, volatilizar ou ocorrer a extração, em contato com superfícies líquidas como, óleo e água, o que aumenta a disponibilidade do composto no ambiente, tornando-o disponível aos organismos vivos (HEUDORF et al., 2007).

No meio aquático, os ftalatos chegam principalmente, através do processo de produção, distribuição, uso e descarte de plásticos e derivados (VITALI et al., 1997; EMA; MIYAWAKI, 2002; FERREIRA; MORITA, 2010). Apresentam pouca solubilidade em água acumulando na porção sólida do sedimento e partículas orgânicas dispersas (HEUDORF et al., 2007). São degradados por processo de fotoxidação e biodegradação permanecendo no ambiente por dias ou semanas (LIANG et al., 2008). Entretanto, a constante liberação dos compostos no ambiente aquático permite que sejam encontrados em concentrações de $0,5 \text{ ng.L}^{-1}$ e $33,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para águas superficiais no Brasil (SOUZA et al., 2012), fazendo com que permaneçam disponíveis aos organismos bentônicos ocasionando efeitos tóxicos em curto e longo prazo (PLANELLÓ et al., 2011; HERRERO et al., 2014; 2015).

Entre os invertebrados bentônicos, os Chironomidae são bioindicadores amplamente utilizados em estudos de toxicidade ambiental (NAIR et al., 2011; MORAIS et al., 2014; REBECHI et al., 2014; PALACIO-CORTÉS et al., 2017; VICENTINI et al., 2017). Apresentam ampla distribuição e relevante posição na cadeia alimentar, tendo elevada importância para o monitoramento e conservação do ambiente aquático (NICACIO; JUAN, 2015). Representam, também, organismos bentônicos utilizados como modelos em estudos de toxicidade do BBP. Em *Chironomus riparius* Meigen 1804, já foram descritos redução da sobrevivência em 24 horas de exposição (PLANELLÓ et al., 2011), aumento da expressão de enzimas de estresse, *heat shock* (HSP) 40, 70 e 90 (PARK; KWAK, 2008) e redução da via de biotransformação, ocorrendo redução da atividade da glutathione S-transferase (GST) (HERRERO et al., 2015). O BBP também atuou como desregulador endócrino modulando os receptores da ecdisona (EcR), que participam da regulação do crescimento em *C. riparius* (PLANELLÓ et al., 2011; HERRERO et al., 2014; 2015).

Os efeitos tóxicos, podem ser observados em diferentes níveis de organização biológica, sendo avaliados por diferentes biomarcadores e *end point*. Em nível molecular, os danos ao DNA podem ser analisados pelo ensaio cometa, uma técnica rápida e sensível (LEE et al., 2006). A avaliação da atividade enzimática também é amplamente utilizada (RAKOTONDRAVELO et al., 2006; LEE; CHOI, 2007; REBECHI et al., 2014; REBECHI-BAGGIO et al., 2016), entre elas, a atividade da acetilcolinesterase (AChE) enzima reguladora do impulso nervoso (ARAÚJO et al., 2016), as esterases alfa (Est- α) e beta (Est- β) e glutathione S-transferase (GST) que metabolizam xenobióticos, e superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), que apresentam função de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROS) nas células (GILLE; SIGLER, 1995; CHOI et al., 2000; QU et al., 2014; LEI et al., 2015). O estresse oxidativo também pode ser indicado pela quantidade de peroxidação lipídica (LPO), que representa a peroxidação da membrana celular, ocasionada por EROS, como o peróxido de hidrogênio (PINCHUK et al., 2012; SEPPERUMAL; SAMINATHAN, 2014).

Parâmetros biológicos representam importantes *end points* para a avaliação dos desreguladores endócrinos (ROH et al., 2007; CAMPOS et al., 2016; PALACIO-CORTÉS; 2017). Em Chironomidae, fatores como a sobrevivência, o crescimento, a emergência e o tamanho dos adultos, são amplamente avaliados, podendo-se estabelecer efeitos em nível populacional sobre os organismos (LEE et al., 2006a; PAUMEN et al., 2008; PLANELLÓ et al., 2008; MARINKOVIĆ et al., 2011; HERRERO et al., 2014).

O estudo da toxicidade do BBP em diferentes níveis de organização biológica auxilia a determinar o modo de ação do composto, auxiliando o entendimento dos efeitos tóxicos sobre

os organismos de forma integrada, sendo essencial nos invertebrados bentônicos, uma vez que esses organismos ajudam a determinar o risco ambiental ocasionado pela poluição. Dessa forma, o objetivo da pesquisa foi determinar os efeitos genotóxicos, bioquímicos e sobre a biologia de *C. sancticaroli* expostos ao BBP em exposição aguda e crônica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Os espécimes foram obtidos da colônia de *Chironomus sancticaroli* mantida no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (LAMFIC²) (FIGURA 1). A criação seguiu o protocolo de Vicentini et al. (2017), modificado de água desclorada para água reconstituída (Solução de estoque I (sulfato de cálcio (CaSO₄); 1000 ml água destilada e solução de estoque II (Cloreto de potássio (KCl); Carbonato de sódio (NaHCO₃); 1000 ml água destilada). Essa proporção foi ajustada para os parâmetros de dureza de 16 mg.L⁻¹; pH entre 7,2 e 7,6 e condutividade de 160 µS/cm.

Os organismos foram mantidos em aquários (25 cm x 15 cm x 25 cm), contendo aproximadamente dois centímetros de areia de rio comercial e sete litros de água reconstituída em condições controladas de temperatura a 25°C ± 2 e fotoperíodo de 12/12 horas claro e escuro e aeração constante (FIGURA 2). A alimentação foi administrada três vezes por semana adicionando-se 2,5g de ração de cachorro triturada (Dog Chow®). Vouchers dos espécimes da colônia foram depositados na Coleção Padre Jesus de Santiago Moure (DZUP) com números de acesso 249269 a 249276.

2.2. Avaliação da colônia matriz

A homogeneidade das respostas da colônia de *C. sancticaroli* foi determinada utilizando o teste de sensibilidade ao KCl (cloreto de potássio) seguindo o protocolo de Dornfeld (2006). As avaliações foram realizadas expondo larvas de quarto ínstares sob concentrações de 1,5 g.l⁻¹; 2,25 g.l⁻¹; 3,5 g.l⁻¹; 5,0 g.l⁻¹ e 7,5 g.l⁻¹ de KCl, em condições de temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12/12 horas claro e escuro, por 48 horas. Os testes foram realizados em frascos de vidro de 300 ml com volume de solução de 200 ml, utilizando água reconstituída e sem a presença de sedimento. A alimentação foi administrada

adicionando-se 250 µl de ração líquida (20g ração de peixe triturada (Tetramim®) para 1000 ml de água destilada) no início do teste. Para cada concentração foram expostas quatro réplicas, com seis larvas em cada recipiente, totalizando 24 larvas por controle e concentração.

Inicialmente foram realizados 20 testes para se definir a faixa de sensibilidade da espécie, que variou de 4,72 g.L⁻¹ (limite inferior = média da CL₅₀ + 2(desvio padrão)) a 6,75 g.L⁻¹ (limite superior = média da CL₅₀ + 2(desvio padrão)). Posteriormente, os testes de sensibilidade foram realizados uma vez por mês, sendo os dados analisados com auxílio do programa Trimen Spearman-Karber. Foram utilizados dados de bioensaios que permaneceram dentro da faixa estabelecida, o restante foi descartado.

Em média as CL₅₀ apresentaram valor de 5,76 g.L⁻¹ com coeficiente de variação de 4,56%. O coeficiente de variação indica a padronização da metodologia e a confiança dos resultados obtidos, validando a utilização da espécie a serem utilizados em exposição de xenobióticos (Pereira 2010). A *Environmental Canada* (1995) estabelece que o coeficiente de variação ideal deve ser ≤ 30 %. Dessa forma, coeficiente de variação igual a 4,56%, indica que a colônia matriz de *C. sancticaroli* apresentou homogeneidade de respostas o que possibilitou a utilização dos espécimes em teste de toxicidade.

2.3. Bioensaios de toxicidade

2.3.1. Condições dos bioensaios

Os bioensaios de toxicidade foram realizados com base no protocolo da OECD 235 (2011) com as seguintes modificações: fotoperíodo de 16/8 horas claro e escuro para 12/12 horas claro e escuro. Para os ensaios foi utilizado como substrato areia de quartzo branco (50 - 70 MESH – Sigma Aldrich®) e água reconstituída. A temperatura foi mantida em 25°C ± 2 e umidade 80% ± 10% (STRIXINO; STRIXINO, 1982).

O BBP (98% - Sigma Aldrich®; referencia 308501; lote 250ML) foi diluído em etanol P.A. para a preparação da solução teste com concentração de 10.000 mg.l⁻¹. Como grupo controle, foram utilizados um grupo com solução de água reconstituída e etanol (P.A) e um grupo apenas com água reconstituída.

No início e final dos bioensaios foram mensurados os parâmetros físico-químicos de temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido, condutibilidade e produtos sólidos totais.

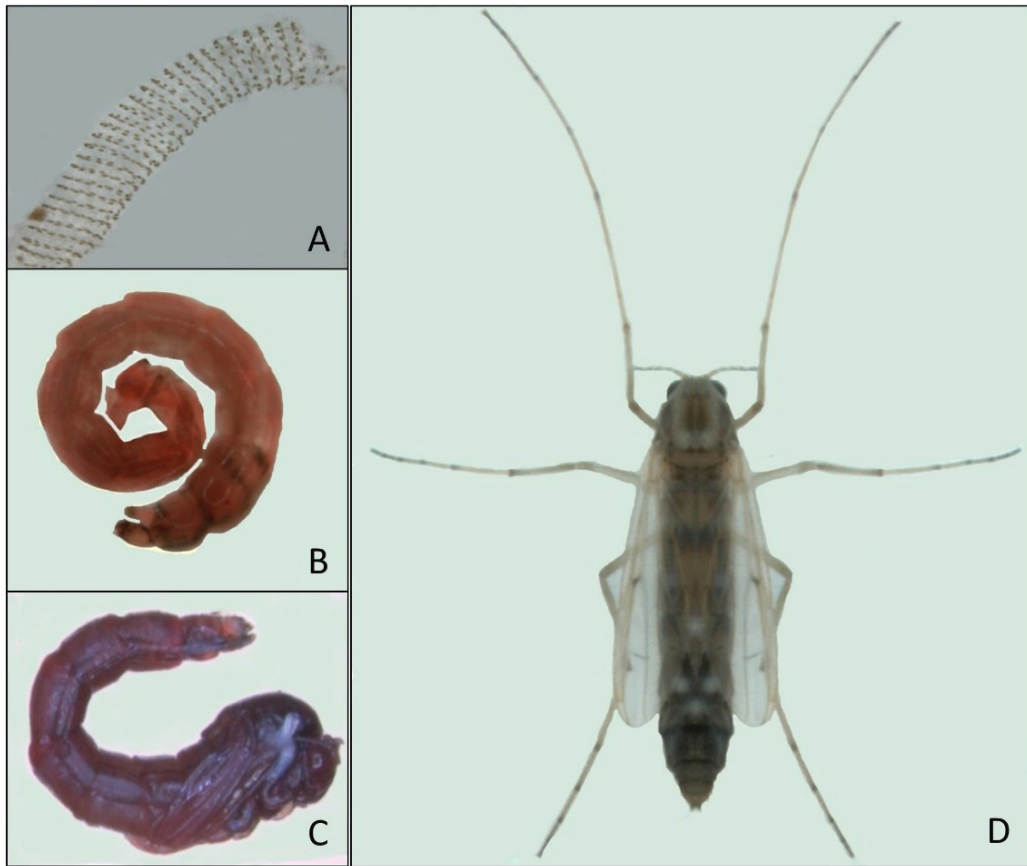


FIGURA 1. *Chironomus sancticaroli*. (A) Massa ovígera. (B) Larva. (C) Pupa. (D) Adulto, fêmea.

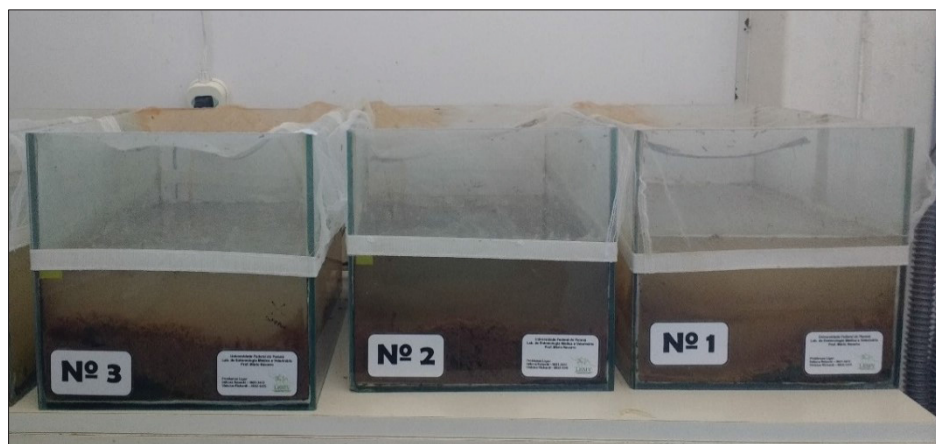


FIGURA 2. Aquários de criação da colônia matriz de *Chironomus sancticaroli*.

2.3.2. Ensaio de toxicidade aguda (48 horas)

Massas ovígeras de *C. sancticaroli* foram retiradas da colônia matriz e mantidas em bandejas (34 x 23 x 7 cm) contendo 78 g de areia de quartzo branco (3 mm) e três litros de água reconstituída, em condições de fotoperíodo de 12/12 horas claro e escuro, temperatura a 25°C, umidade de 80% ± 10% e aeração constante. A alimentação foi administrada a cada dois dias com 0,32 g de ração de peixe triturada da marca Tetramim®. Após o período de sete dias as larvas de quarto instar foram expostas ao poluente.

Os testes foram realizados em frascos de vidro de 300 ml, com fundo chato, contendo 10 larvas, 13 g de areia de quartzo branco, água reconstituída e solução de BBP, com volume final de 100 ml (FIGURA 3). Em cada ensaio foram adicionadas seis réplicas, totalizando 60 larvas para cada grupo controle e concentração, sendo realizadas três repetições. Os bioensaios foram estáticos e os frascos foram mantidos em câmara de germinação do tipo BOD.



FIGURA 3. Bioensaio agudo de 48 horas, demonstrando a disposição dos frascos de vidro na câmara de germinação (BOD).

Inicialmente foram realizados testes de mortalidade com concentrações nominais na faixa de 0,0001 mg.L⁻¹ a 20 mg.L⁻¹, considerando concentrações passíveis de serem encontradas no meio aquático e que foram utilizadas em estudos anteriores de exposição de Chironomidae ao BBP (STAPLES et al., 2000; PLANELLÓ et al., 2011; HERRERO et al., 2015).

A partir dos dados de mortalidade, foram estabelecidas para a avaliação em exposição aguda, subcrônica e crônica, as concentrações de 0,0001 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹, que apresentaram 100% de sobrevivência, já que foram analisados parâmetros subletais (FIGURA 8).

Os parâmetros físico-químicos se mantiveram em temperatura a 25°C ± 1,76, pH de 6,86 ± 0,25, oxigênio dissolvido de 6,28 ± 0,1 mg.L⁻¹, salinidade de 44,3 ± 2,7 µg.l⁻¹,

condutibilidade de $93,28 \pm 3,6 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e produtos sólidos totais de $64,9 \pm 1,72 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Os parâmetros de temperatura, pH e oxigênio dissolvido apresentaram condições ideais para o desenvolvimento dos organismos como determinada pela OECD (2004) de temperatura com variação de ± 1 , variação de pH de 1,5 e oxigênio dissolvido entre 5 e 7.

2.3.3. Exposição subcrônica (oito dias) e crônica (25 dias)

Para os bioensaios de toxicidade subcrônica e crônica, massas ovígeras foram retiradas da colônia matriz de *C. sancticaroli* e mantidas em frascos de vidro com 100 ml de água reconstituída, sob temperatura a $25^\circ\text{C} \pm 1$, fotoperíodo de 12/12 horas claro e escuro e umidade a $80\% \pm 10\%$. Após 72 horas, as larvas foram separadas em microscópio estereoscópio e expostas as concentrações de $0,0001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os ensaios foram realizados em aquários de vidro (10 cm x 21 cm x 10,5 cm), contendo 78 g de areia de quartzo branco (0,5 mm), água reconstituída, solução de contaminação e ração líquida (25g ração Tetramin®; 1000 ml de água destilada), com volume final de 700 ml, sendo mantidos recobertos, com aeração constante em câmara de germinação do tipo BOD. Em cada ensaio foram expostas 300 larvas por concentração e grupo controle, divididas em grupos de 100, com três repetições, totalizando 900 larvas expostas (FIGURA 4). A alimentação foi administrada com ração líquida, adicionando-se $0,012 \text{ mg}\cdot\text{L}$ por larva a cada 48 horas.



FIGURA 4. Bioensaio crônico, demonstrando os aquários recobertos e bomba de aeração.

Bioensaios, subcrônicos de oito dias foram realizados para a avaliação dos danos ao DNA, atividade enzimática e tamanho das larvas. Para a avaliação dos adultos, ciclo de vida, tamanho dos adultos e fecundidade potencial das fêmeas, foram realizados bioensaios crônicos de 25 dias. Nestes bioensaios, foram realizadas troca de água a cada oito dias, adicionando-se solução teste e ração líquida. Este período foi determinado para evitar o aumento da turbidez da água, sendo possibilitado devido a permanência do BBP durante semanas na água.

Durante o período dos bioensaios a temperatura foi de $25^{\circ}\text{C} \pm 1,78$, pH de $7,56 \pm 1$, oxigênio dissolvido de $6,80 \pm 0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ salinidade de $44,3 \pm 2,7 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, condutibilidade de $91,43 \pm 3,6 \text{ } \mu\text{S.cm}^{-1}$ e produtos sólidos totais de $63,4 \text{ mg.L}^{-1} \pm 1,54 \text{ mg.L}^{-1}$. Os parâmetros de temperatura, pH, e oxigênio dissolvido permaneceram dentro das condições estabelecidas pela (OECD, 2004), de temperatura com variação de ± 1 , variação de pH de 1,5 e oxigênio dissolvido entre 5 e 7.

2.4. Biomarcador genético

Os danos ao DNA foram determinados, após a exposição aguda (48 horas) e subcrônica (8 dias), utilizando a técnica do ensaio cometa alcalino seguindo o protocolo de Lee & Choi (2006) modificado por Morais et al. (2014). Para cada concentração e grupo controle foram acondicionadas 100 larvas, divididas em *pools* de 10 organismos cada, em 500 μL de soro bovino fetal, homogeneizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em vórtex. 100 μL da suspensão foi misturada com 100 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 1 % (0,1 g de LMP; 20 ml de PBS) e as amostras colocadas em lâminas recobertas por agarose normal a 1,5% (1,5 g; 100 ml de PBS). Estas foram cobertas com lamínulas e mantidas sob refrigeração por um período de 10 a 20 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (10 mM Tris; 100 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 2,5 M cloreto de sódio (NaCl); dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 %) por 24 horas. Após serem retiradas da solução de lise, as lâminas foram mantidas em solução alcalina (300mM NaOH; 1 mM EDTA) com pH > 13 por 30 minutos, para a desnaturação do DNA. Em seguida, foram submetidas à eletroforese a 4°C (25V e 300 mA) por 25 minutos. Ao término da corrida, as lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris (pH 7,5) por 15 minutos e fixadas com etanol absoluto por 5 minutos. Após secas, as lâminas foram coradas com 15 μL de Brometo de Etídio ($20 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$). Para cada grupo avaliado foram produzidas 10 lâminas, sendo examinados 100 nucléides por lâmina. As lâminas

foram observadas em teste cego, em microscópio de epifluorescência sob aumento de 400x, os danos foram determinados utilizando a classificação de Kobayashi et al. (1995) e o escore foi calculado seguindo Collins (2004) (FIGURA 5).

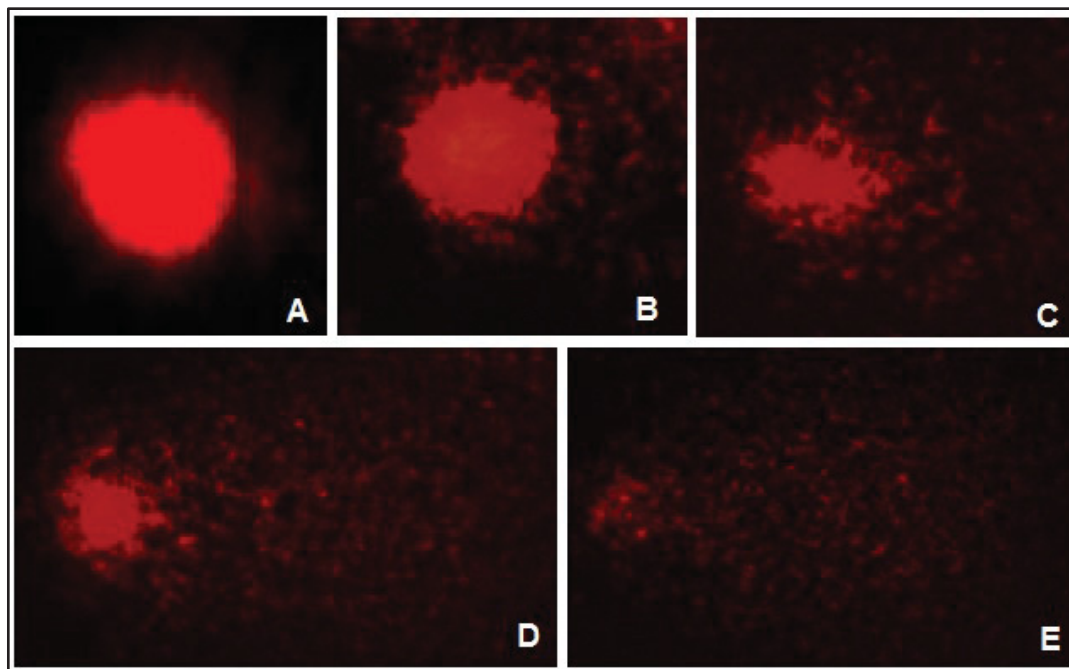


FIGURA 5. Danos ao DNA em *Chironomus sancticarloi*. (A) Sem danos. (B) Dano tipo 1. (C) Dano tipo 2. (D) Dano tipo 3. (E) Dano tipo 4.

2.5. Biomarcadores bioquímicos

Para cada concentração e grupo controle foram avaliados 20 *pools* de cinco larvas cada após a exposição aguda (48 horas) e subcrônica (8 dias). Estes foram homogeneizados em 620 μ L de água milli-Q e centrifugados a 10850 rpm a 4°C em centrífuga refrigerada, com exceção para as amostras de atividade da acetilcolinesterase.

As amostras foram aliquotadas, com volume específico para cada enzima e armazenadas em freezer a -80°C. Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços e a leitura da absorbância em espectrofotômetro de microplaca (comprimento de onda entre 190-850 nm).

A atividade enzimática da AChE foi avaliada seguindo o protocolo de ELLMAN et al. (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). Foram adicionadas 25 μ L de amostras, 200 μ L de 5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato (DTNB; 0.75 mM) e 50 μ L de iodoacetilcolina (ATC; 10 mM). Em seguida, a placa foi incubada em temperatura e luz

ambiente por 30 minutos. A leitura foi feita com comprimento de onda de 405 nm, a cada minuto por cinco minutos. Os resultados foram expressos em $\mu\text{moles/mg ptn/min}$.

A atividade da EST- α e EST- β foi determinada seguindo o protocolo de Valle; e Montella (2006). Para ambas foram adicionadas 10 μl de amostra. Em seguida, para a EST- α foram adicionados 200 μl de alfa-naftil acetato/Nafosfato (0,3 mM), utilizando o alfa-naftol (0,3 mg.L^{-1}) como controle positivo. Para a EST- β foram adicionados 200 μL de beta-naftil acetato/ Nafosfato (0,3 mM), utilizando beta-naftol (0,3 mg.L^{-1}) como controle positivo. Posteriormente as placas foram incubadas por 15 minutos em temperatura e luz ambiente, seguido da adição de 50 μl do corante Fast Blue (0,3%), sendo novamente incubadas por cinco minutos. Após esse período foi realizada leitura *end point* com comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos em $\text{nmol } \alpha\text{-naftol/ mg ptn /min}$ para EST- α e $\text{nmol } \beta\text{-naftol/mgptn/min}$ para EST- β . A conversão dos valores de absorbância em conteúdo de alfa/beta-naftol foi feita através da curva padrão, utilizando as massas de 0 μg , 1 μg , 2 μg , 3 μg , 4 μg e 5 μg . Para isso foram adicionados volumes de 0 μL , 2 μL , 4 μL , 6 μL , 8 μL e 10 μL de alfa/beta-naftol em duplicata. O volume foi completado para 10 μl com água milli-Q. Posteriormente, seguiu o mesmo procedimento de preparação e leitura das microplacas.

A avaliação da atividade da GST foi realizada seguindo o protocolo de Keen et al. (1976). Foram adicionados 15 μL de amostras e 195 μL de solução composta por glutathiona reduzida (GSH 10 mM) e cloro-dinitrobenzeno (CDNB; 21 mM). A leitura foi realizada em comprimento de onda de 340 nm por 20 minutos a cada um minuto. Os resultados foram expressos em $\mu\text{moles/mgptn/min}$.

Para determinar a atividade da CAT seguiu-se o proposto por Aebi (1984). Foram adicionados 5 μL de amostra e 295 μL de solução de reação (água milli-Q; EDTA; peróxido de hidrogênio a 30%). A leitura foi feita com comprimento de onda de 240 nm por cinco minutos a cada 15 segundos. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/min/mg de proteína}^{-1}$.

A análise da atividade da SOD seguiu o proposto por Gao et al. (1988). Em microtubos de centrifugação de 1,5 ml foram alíquotadas, em duplicata, amostras de 40 μL . Em seguida, foram adicionados 885 μL de tampão tris de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; pH 8,0; 5mM) e 50 μL de ácido pirogálico. Posteriormente, os microtubos foram incubados por 30 minutos e a reação foi interrompida com 25 μL de HCl (1 N). Foi realizado juntamente um grupo controle, o qual, apenas, não passou pelo processo de incubação. Na sequência, 300 μL da solução foram adicionados à placa, em triplicata, sendo realizada a leitura com comprimento de onda de 440 nm. Os resultados foram expressos em unidades (U) de SOD/mg de proteína.

A quantidade de LPO foi determinada seguindo o protocolo de Jiang et al. (1992). Em microtubos de centrifugação de 1,5 ml, foram adicionados 70 µL de amostra e 70 µL de metanol (P.A.). As amostras foram centrifugadas a 7020 rpm por cinco minutos a 4°C. 100 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo e adicionados 900 µl de reativo de Fox 2 (solução metanólica (xilenol Orange 0.1 mM; hidroxitolueno butilado cristalino (BHT) 4 mM; metanol P.A.); solução de sulfato ferroso amoniacal 2500 µM (H₂SO₄; água milli-Q). Os microtubos de centrifugação foram incubados no escuro por 30 minutos, sendo agitados em vórtex a cada três minutos. Após esse período a solução foi transferida para microplaca de 96 poços, em triplicata, com volume de 300 µl cada. A leitura foi feita a 560 nm. Os resultados foram expressos em nmol de hidroperóxidos/mg de proteína.

A quantidade de proteína total foi determinada seguindo o protocolo de Bradford (1976). Foram adicionados 10 µL de amostras, 10 µL de Albumina Sérica Bovina (BSA) para o controle positivo e 250 µL de corante Bradford (1 Bradford: 5 de água milli-Q). A leitura foi obtida em comprimento de onda de 620 nm. A conversão de valores de absorbância em valores de proteína total foi realizada através da curva padrão de BSA utilizando as quantidades de 0 µg, 2,5 µg, 5 µg, 7,5 µg, 10 µg e 15 µg de BSA. Para isso foram adicionados os volumes de 0 µL, 2,5 µL, 5 µL, 7,5 µL, 10 µL e 7,5 µL de BSA, na microplaca seguindo o mesmo protocolo de preparação e leitura das placas de proteína.

2.6. Parâmetros biológicos

O desenvolvimento das larvas foi avaliado através do tamanho da cápsula cefálica e instares larvais, após a exposição subcrônica (8 dias). Foram avaliadas 30 cápsulas cefálicas por concentração e grupos controles. Após os bioensaios de oito dias as larvas ainda vivas, foram armazenados em etanol 80%. Posteriormente, as cápsulas cefálicas foram fotografadas em vista ventral em microscópio estereoscópio com câmera acoplada em aumento de 100x e medidas da região da base da cápsula até a ponta do dente trífido, utilizando o programa ZEN (2011- *blue edition*) (FIGURA 6). O comprimento também foi utilizado para determinar o instar dos organismos, seguindo as medidas estabelecidas por Strixino & Strixino (1985) Richardi et al. (2013) para *C. sancticaroli*.

O ciclo de vida foi determinado através da emergência dos adultos após a exposição crônica (25 dias) ao BBP. Foram determinadas o início da emergência de machos e fêmeas. Após a emergência, os adultos foram retirados dos aquários com auxílio de sugador e sacrificados em congelador. Posteriormente, eles foram contabilizados, separados em machos

(antenas plumosas) e fêmeas (antenas pilosas) e armazenados em etanol 99% para as análises da fecundidade potencial das fêmeas e tamanho das asas de ambos os sexos.



FIGURA 6. Vista ventral da cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli*, indicando a medida da base da cabeça até a ponta do dente trífido.

O tamanho dos adultos foi avaliado através do comprimento das asas, após a exposição crônica (25 dias). A asa direita de 30 fêmeas e 30 machos foram retiradas, montadas em preparação semipermanente, fotografadas em microscópio estereoscópio, com câmera acoplada, sob aumento de 30x. Posteriormente, foram mensuradas da região do arculus, dispensando a base verdadeira, ao ápice utilizando o programa ZEN (2011- *blue edition*) (FIGURA 7).

A fecundidade potencial das fêmeas representa o número possíveis de ovos da fêmea produzir que está diretamente relacionado ao tamanho das fêmeas adultas. Segundo Strixino (1980), o tamanho das fêmeas é diretamente proporcional ao comprimento das asas, podendo ser utilizada para a determinação da fecundidade potencial. Esta foi avaliada com auxílio da expressão elaborada por Strixino (1980) para *C. sancticaroli*, utilizando as medidas das mensuradas para a avaliação do tamanho dos adultos, onde: $F = -707,41 + 471,64x L$ (L = comprimento da asa).

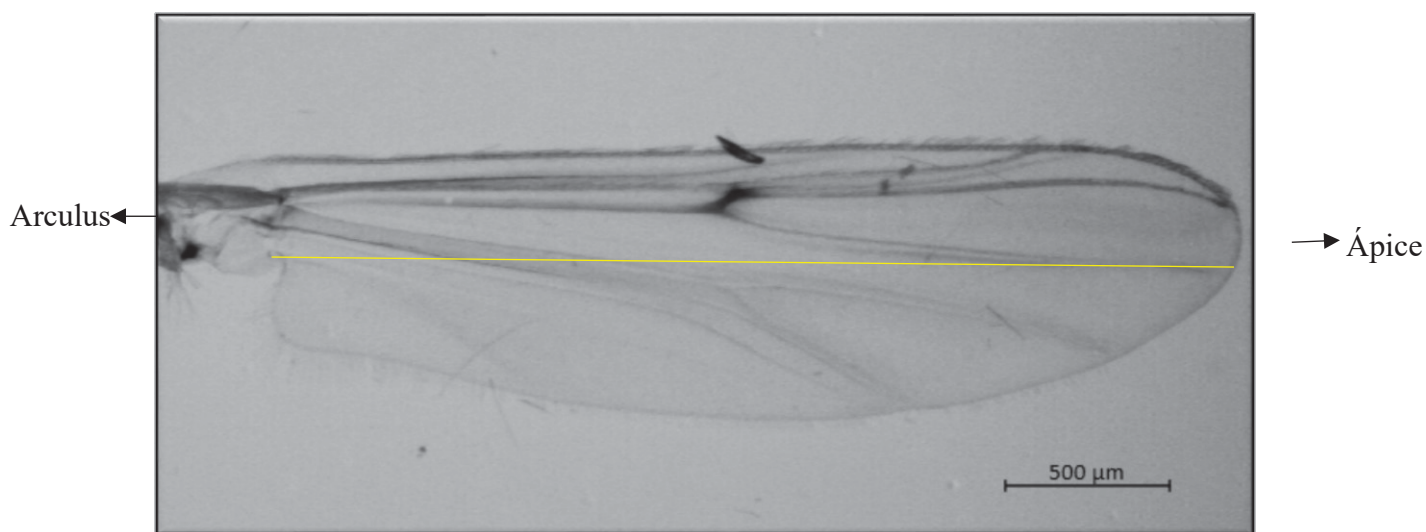


FIGURA 7. Asa direita de fêmea de *Chironomus sancticaroli*, demonstrando a medida da região do arculus ao ápice.

2.7. Análise dos dados

Distribuição normal e homogeneidade foram testadas pelos testes Shapiro Wilk ($p < 0,05$) e Levene's ($p < 0,05$), respectivamente, através do programa Past 3.11. Os dados paramétricos, foram avaliados pelo teste ANOVA ($p \leq 0,05$) de um fator com *a posteriori* de Tukey, sendo analisados os parâmetros biológicos, tamanho da cápsula cefálica, emergência dos machos e fêmeas, número total de adultos, número de adultos por dia e tamanho das asas, pelo programa Past 3.11. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$) com *a posteriori* de Dunnett pelo programa BioEstat 5.0, sendo analisados danos ao DNA, atividade enzimática e fecundidade potencial das fêmeas. Os instares larvais foram analisados através do teste de Mann-Whitney, par a par com $p \leq 0,05$ pelo programa Past 3.11. As análises de *outlier* foram feitas com a ferramenta online *Quickcalcs Graphpad software*. Os gráficos foram confeccionados no Excel 2013.

3 RESULTADOS

3.1. Testes de mortalidade

A mortalidade foi observada a partir da concentração de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ com 55% de mortalidade, não sendo verificada resposta concentração dependente. No experimento não

ocorreu 100% de mortalidade. A partir desses dados, foram determinadas as concentrações entre $0,0001 \text{ mg.L}^{-1}$ a 2 mg.L^{-1} , com 100% de sobrevivência, para se avaliar os biomarcadores em exposições aguda, subcrônica e crônica (FIGURA 8).

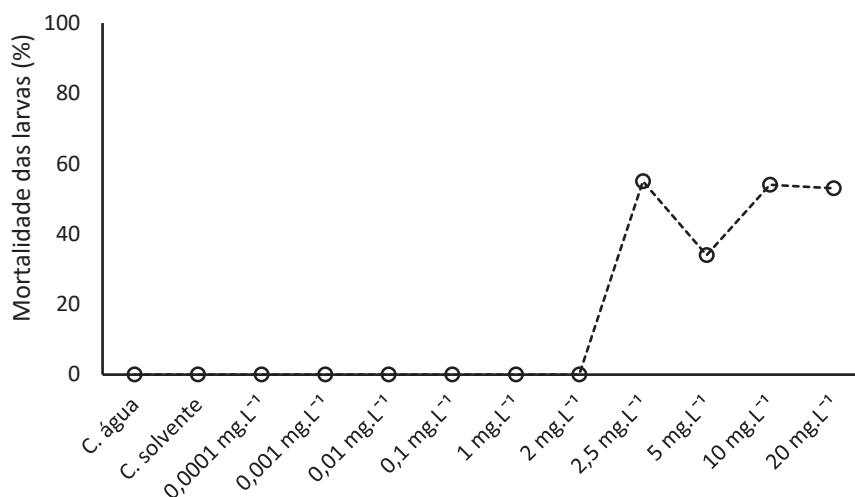


FIGURA 8. Porcentagem de mortalidade de larvas de quarto instar de *Chironomus sancticaroli* em exposição aguda (48 horas) a concentrações nominais de BBP. Demonstrando controle água, controle solvente (etanol P. A.) e concentrações avaliadas.

3.2. Biomarcador genético

Em exposição aguda danos significativos ao DNA foram observados na concentração 2 mg.L^{-1} de BBP em relação ao grupo controle água (FIGURA 9 A). Em relação ao grupo controle solvente foi observado diferença significativa em $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, 1 mg.L^{-1} e 2 mg.L^{-1} de BBP. Dentre os grupos expostos diferença significativa foi observado entre $0,0001 \text{ mg.L}^{-1}$ e 2 mg.L^{-1} de BBP, não ocorrendo concentração dependente (FIGURA 9 A).

Em exposição subcrônica, danos significativos foram observados nas concentrações de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, 1 mg.L^{-1} e 2 mg.L^{-1} de BBP em relação aos grupos controles (FIGURA 9 B). Entre os grupos expostos foram observadas diferença significativa entre $0,0001 \text{ mg.L}^{-1}$ e 2 mg.L^{-1} de BBP, não ocorrendo concentração dependente (FIGURA 9 B).

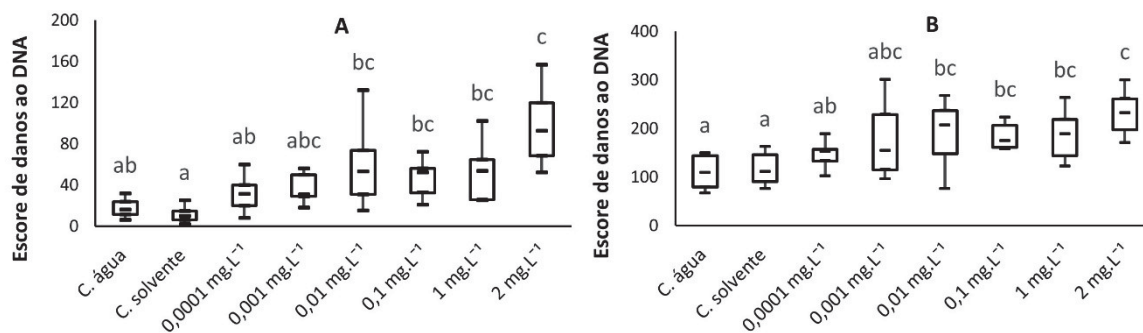


FIGURA 9. Escore de danos ao DNA em larvas de *C. sancticaroli* em exposição a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente, Etanol P.A. (n = 10), indicando mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo. (A) exposição aguda de 48 horas. (B) exposição subcrônica de oito dias. Letras diferentes indicam diferença significativa (Kruskall-Wallis, $p < 0,0001$, com *a posteriori* de Dunnett).

3.3. Biomarcadores bioquímicos

Alterações nos marcadores bioquímicos foram observadas em exposição aguda (48 horas) e subcrônica (8 dias) em relação aos grupos controles. A atividade da AChE sofreu redução significativa nas concentrações $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e 1 mg.L^{-1} de BBP em exposição aguda, em relação aos grupos controles (FIGURA 10 A). Dentre os grupos expostos foram observadas redução significativa da atividade da AChE entre as concentrações de $0,0001 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,0001 \text{ mg.L}^{-1}$ e 1 mg.L^{-1} de BBP (FIGURA 10 A). Em exposição subcrônica não ocorreram alterações significativas entre os grupos expostos ao BBP em relação aos grupos controles e dentre os grupos expostos (FIGURA 11 A).

A atividade da EST- α apresentou redução significativa na concentração $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BBP em exposição aguda, em relação aos grupos controles (FIGURA 10 B). Dentre os grupos expostos reduções significativas foram observadas entre as concentrações $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ e 1 mg.L^{-1} e aumento significativo em $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e 2 mg.L^{-1} de BBP (FIGURA 10 B). Em exposição subcrônica não foram observadas alterações significativas entre os grupos expostos ao BBP e aos grupos controles (FIGURA 11 B). Quando comparados os grupos expostos, aumento significativo da atividade ocorreram entre $0,0001 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e redução significativa da atividade entre $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e 2 mg.L^{-1} de BBP (FIGURA 11 B).

A atividade da EST- β apresentou aumento significativo em 2 mg.L^{-1} de BBP (FIGURA 10 C) em exposição aguda, em relação aos grupos controles. Entre os grupos expostos, ocorreu redução significativa da atividade da EST- β entre $0,0001 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$

e aumento significativo da atividade entre 0,001 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP (FIGURA 10 C). Em exposição subcrônica ocorreu redução significativa em 0,01 mg.L⁻¹ de BBP em relação aos grupos controles (FIGURA 11 C). Dentre os grupos expostos aumento significativo da atividade da EST-β foi observada entre 0,0001 mg.L⁻¹ e 2, 0,001 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP (FIGURA 11 C).

Reduções significativas da atividade da GST foram observadas em exposição aguda nas concentrações de 0,0001 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP em relação aos grupos controles (FIGURA 10 D). Entre os grupos expostos ao BBP não foram observadas alterações significativas (FIGURA 10 D). Em exposição subcrônica, reduções da atividade foram observadas nas concentrações 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 2 mg.L⁻¹ de BBP em relação aos grupos controles (FIGURA 11 D). Dentre os grupos expostos reduções significativas da atividade da GST foram observadas entre 0,0001 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹, 0,0001 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP (FIGURA 11 D).

Quedas na atividade da CAT foram observadas nas concentrações de 0,1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP em exposição aguda em relação aos grupos controles (FIGURA 10 E). Entre os grupos expostos reduções da atividade da CAT foram observadas entre 0,0001 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 0,01 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹ e 0,01 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP (FIGURA 10 E). Em exposição subcrônica foram observados aumento significativo nas concentrações de 0,001 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP em relação aos grupos controles (FIGURA 11 E). Dentre os grupos expostos aumento significativo da atividade da CAT foram observadas entre 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹, 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹, 0,0001 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP e redução significativa entre 0,001 mg.L⁻¹ e 0,01 mg.L⁻¹ de BBP (FIGURA 11 E).

A atividade da SOD apresentou aumento significativo apenas na concentração 1 mg.L⁻¹ de BBP em exposição aguda, em relação aos grupos controles (FIGURA 10 F). Entre os grupos expostos ao BBP não ocorreram alterações significativas (FIGURA 10 F). Em exposição subcrônica, elevada atividade foi observada nas concentrações 0,001 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ de BBP em relação aos grupos controles (FIGURA 11 F). Quando comparados os grupos expostos aumento significativo da atividade da SOD foi observada entre 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹, 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,01 mg.L⁻¹, 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹, 0,0001

mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ e redução da atividade entre 0,001 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹ e 0,01 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP (FIGURA 11 F).

A quantidade de LPO não apresentou alteração dos grupos expostos ao BBP em relação aos grupos controles, em exposição aguda (FIGURA 10 G). Dentre os grupos expostos aumento significativo da quantidade de LPO foi observado em 0,01 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ de BBP (FIGURA 10 G). Em exposição subcrônica em exposição ao BBP alterações significativas não foram observadas em relação aos grupos controles (FIGURA 11 G). Entre os grupos expostos aumento da concentração de hidroperóxido foram observados entre 0,0001 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ e redução significava da quantidade de LPO ocorreu entre 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP (FIGURA 11 G).

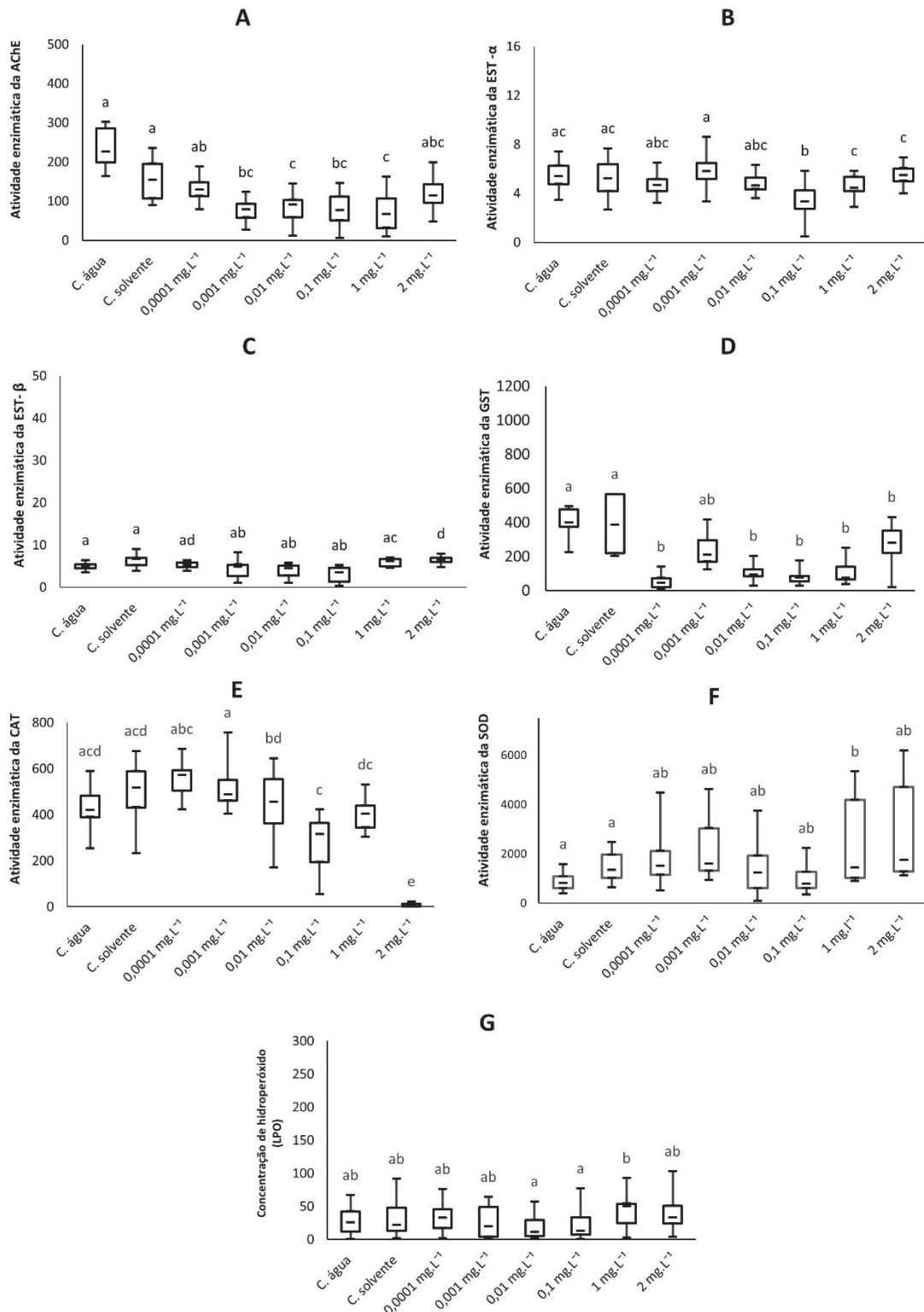


FIGURA 10. Mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo, da atividade enzimática (n = 20) em larvas de *C. sancticaroli* após exposição aguda (48 horas) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A.). Letras diferentes indicam alterações significativa p < 0,0001 (Kruskall-Wallis com *a posteriori* de Dunnett). (A) Acetilcolinesterase (AChE) (µmoles/mg ptn/min). (B) Esterase alfa (EST-α) (nmola-naftol/ mg ptn / min). (C) Esterase beta (EST-β) (nmolβ-naftol/ mg ptn / min). (D) Glutathiona S-transferase (GST) (µmoles/mgptn/min). (E) Catalase (CAT) (µmol/min/mg de proteína). (F) Superóxido dismutase (SOD) (u de sod/ mg de proteína). (G) peroxidação lipídica (LPO) (nmol de hidroperóxidos/mg de proteína).

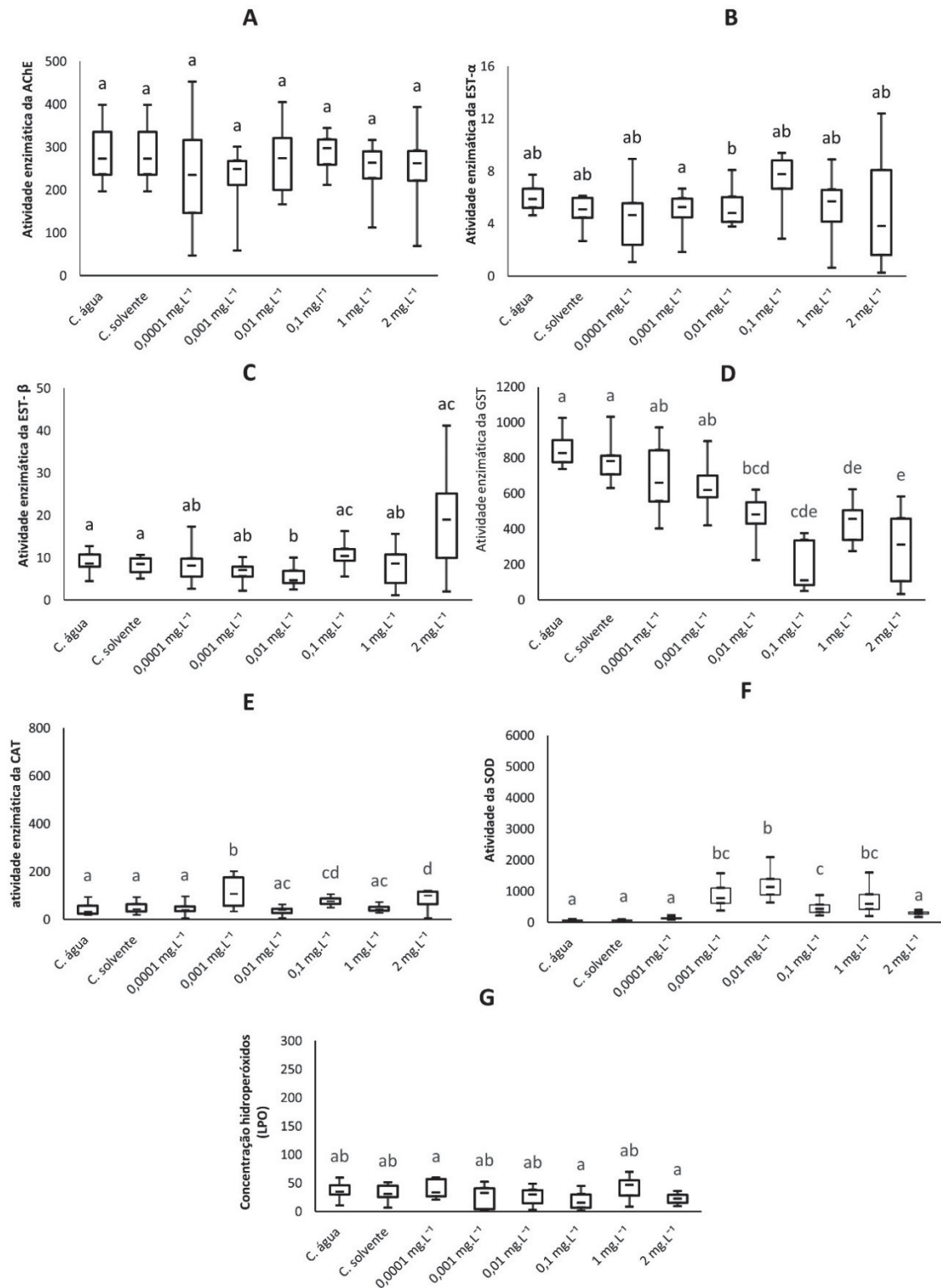


FIGURA 11. Mediana primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo da atividade enzimática ($n=20$) em larvas de *C. sancticarioli* após exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A.). Letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,0001$ (Kruskall-Wallis com *a posteriori* de Dunnett). (A) Acetilcolinesterase (AChE) ($\mu\text{moles/mg ptn/min}$). (B) Esterase alfa (EST- α) ($\text{nmol } \alpha\text{-naftol/mg ptn/min}$). (C) Esterase beta (EST- β) ($\text{nmol } \beta\text{-naftol/mg ptn/min}$). (D) Glutathione s-transferase (GST) ($\mu\text{moles/mg ptn/min}$). (E) Catalase (CAT) ($\mu\text{mol/min.mg de proteína}$). (F) Superóxido dismutase (SOD) ($\text{u de sod/mg de proteína}$). (G) Peroxidação lipídica (LPO) ($\text{nmol de hidroperóxidos/mg de proteína}$).

3.4. Parâmetros biológicos

Todas as concentrações de BBP apresentaram comprimento da cápsula cefálica significativamente menor em relação aos grupos controles após a exposição subcrônica (oito dias) (FIGURA 12). Entre os grupos expostos efeitos semelhantes foram observados para 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP, não se obtendo, alterações significativas entre elas (FIGURA 12). A redução da estrutura ocorreu, em relação aos grupos controles, em média de 14,21% em 0,0001 mg.L⁻¹, chegando a 43,11% em 2 mg.L⁻¹ de BBP com efeito concentração dependente (TABELA 1).

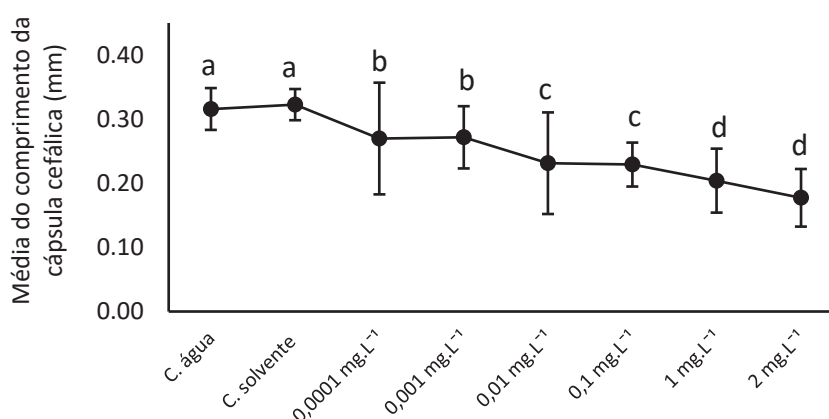


FIGURA 12. Média e desvio padrão do comprimento da cápsula cefálica (mm) de larvas de *Chironomus sancticaroli* (n =30) em exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A.). Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA $p \leq 0,05$, com *a posteriori* de Tukey).

TABELA 1. Porcentagem de redução da cápsula cefálica (n =30) de larvas *Chironomus sancticaroli* em exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de BBP, em relação aos grupos controles.

[] mg.L ⁻¹	Redução do tamanho da estrutura (%)
0,0001	14,21
0,001	14,03
0,01	27,95
0,1	27,05
1	36,01
2	43,11

Os valores mínimos e máximos da cápsula cefálica obtidos para cada ínstar, por concentração e grupos controles, após exposição subcrônica (oito dias) ao BBP estão dispostas

na TABELA 2. Em todas as concentrações foram obtidas distribuição diferenciada em relação aos grupos controles (TABELA 3). Entre os grupos expostos ao BBP distribuição diferenciada foi observada entre 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹, 0,0001 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹, 0,0001 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP (TABELA 3).

Larvas de quarto instar representaram 100% dos organismos nos grupos controles. Larvas de segundo instar foram observadas nas concentrações de 0,01 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BBP. Larvas de terceiro instar apresentaram porcentual maior que 40% nas seis concentrações analisadas. Enquanto que larvas de quarto instar não foram encontradas nas concentrações de 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ (TABELA 3).

TABELA 2. Valores mínimos e máximos do comprimento da cápsula cefálica (mm) de larvas de *C. sancticaroli* após exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controle água e solvente (Etanol P.A.). O símbolo (-) representa ausência de larvas.

[] mg.l ⁻¹	Comprimento da cápsula cefálica (mm)			
	1° instar	2° instar	3° instar	4° instar
C. água	-	-	-	0,289-0,39
C. solvente	-	-	-	0,332-0,337
0,0001	-	-	0,253-0,255	0,282-0,323
0,001	-	-	0,244-0,251	0,269-0,33
0,01	-	0,101-0,11	0,255-0,241	0,366-0,33
0,1	-	-	0,246-0,237	0,262-0,260
1	-	0,127-0,147	0,212-0,246	-
2	-	0,137-0,117	0,231-0,202	-

TABELA 3. Porcentagem de larvas de *C. sancticaroli* de cada instar (n = 30) por grupos controles água e solvente (Etanol P.A.) e diferentes concentrações de BBP, após exposição subcrônica (oito dias) ao BBP. Letras diferentes indicam resultado significativo, p ≤ 0,05 (Mann-Whitney par a par).

[] mg.l ⁻¹	Porcentagem de larvas (%)				Mann-Whitney (p ≤ 005)
	1° instar	2° instar	3° instar	4° instar	
C. água	0	0	0	100	a
C. solvente	0	0	0	100	a
0,0001	0	0	46,6	53,4	b
0,001	0	0	73,4	26,6	c
0,01	0	20	63,4	16,6	c
0,1	0	0	90	10	bc
1	0	33,4	66,6	0	d
2	0	36,7	63,3	0	d

A avaliação do ciclo de vida foi feita realizando-se três bioensaios crônicos de 25 dias. A emergência dos grupos controles e grupos expostos se iniciou no nono dia de bioensaios, sendo finalizada no 22º dia, tendo maior período de emergência entre 13º e 16º dia para os grupos controles (FIGURA 13). O início da emergência não apresentou alterações significativas para os machos e as fêmeas em 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹ de BBP em relação aos grupos controles (TABELA 4). Entre os grupos expostos não foram observadas alterações significativas para a emergência de machos e fêmeas (TABELA 4). Enquanto que, nas concentrações de 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ não ocorreu emergência dos adultos após 25 dias de exposição ao BBP, não sendo observadas larvas ou pupas vivas no sedimento. Dessa forma, não foi possível fazer a avaliação dos adultos nessas concentrações.

O parâmetro número total de adultos emergidos não apresentou alterações significativas em relação aos grupos controles para 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹ de BBP (TABELA 4). Dentre os grupos expostos, também não foram observadas alterações significativas (TABELA 4). Entretanto, reduções percentuais de adultos que emergiram foram observadas com aumento da concentração, sendo de 98,38% no grupo controle água, 94,66% no grupo controle solvente, 53 em 0,0001 mg.L⁻¹ e apenas 40% em 0,001 mg.L⁻¹ de BBP.

Para o número de adultos emergidos por dia, em média, em exposição crônica ao BBP não apresentou alterações significativas em relação aos grupos controles. Dentre os grupos expostos, também não foi observado alterações significativas (FIGURA 13).

TABELA 4. Média e desvio padrão da emergência dos adultos (n = 300) e do início da emergência de machos e fêmeas (n =3 réplicas) de *C. sancticaroli*, após a exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A.). O símbolo (-) indica ausência de diferença significativa (ANOVA, p < 0,05, com *aposteriori* de Tukey)

Concentração	Média de emergência	Anova (p < 0,05)	Dias de emergência			
			Machos (média)	Anova (p < 0,05)	Fêmeas (média)	Anova (p < 0,05)
C. água	295± 0,1	-	9 ± 0,1	-	9,6 ± 0,5	-
C. solvente	284± 0,2	-	9,3 ± 0,1	-	9,3 ± 0,5	-
0,0001 mg.L ⁻¹	159±0,1	-	9,3 ± 0,1	-	11 ± 0,1	-
0,001 mg.L ⁻¹	120±0,2	-	9,6 ± 0,1	-	10 ± 0,5	-

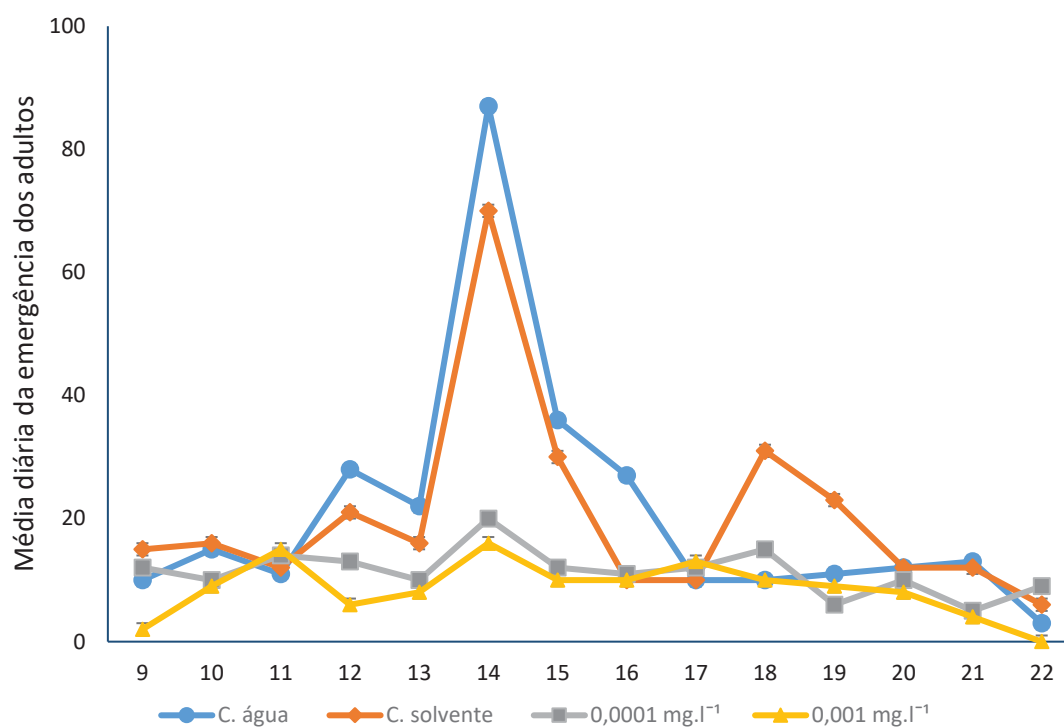


FIGURA 13. Média diária e desvio padrão da emergência de adultos de *C. sancticaroli* (n = 3 réplicas) após exposição crônica (25 dias) em diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A.).

As fêmeas não apresentaram alterações no tamanho das asas em relação aos grupos controles, após exposição crônica ao BBP (FIGURA 14). Entre os grupos expostos ao BBP (0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹) não foram observadas alterações significativas. Para os machos redução significativa do tamanho das asas foram observadas na concentração de 0,001 mg.L⁻¹ de BBP, com redução de 48,8% do tamanho da estrutura, em relação aos grupos controles. Entre as concentrações (0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹) de BBP não foram observadas alterações significativas (FIGURA 14). Para as concentrações de 0,01 mg.L⁻¹ a 2 mg.L⁻¹ de BBP, não foi possível avaliar o tamanho das asas, devido a não emergência dos adultos.

A fecundidade potencial das fêmeas não apresentou alteração significativa para as concentrações de 0,0001 mg.l⁻¹ e 0,001 mg.l⁻¹ de BBP em relação aos grupos controles (FIGURA 15). Entre os grupos expostos ao BBP concentrações não ocorreu alterações significativas. Para as concentrações acima de 0,001 mg.L⁻¹ de BBP, não foi possível determinar a fecundidade potencial das fêmeas, devido a não emergência dos adultos.

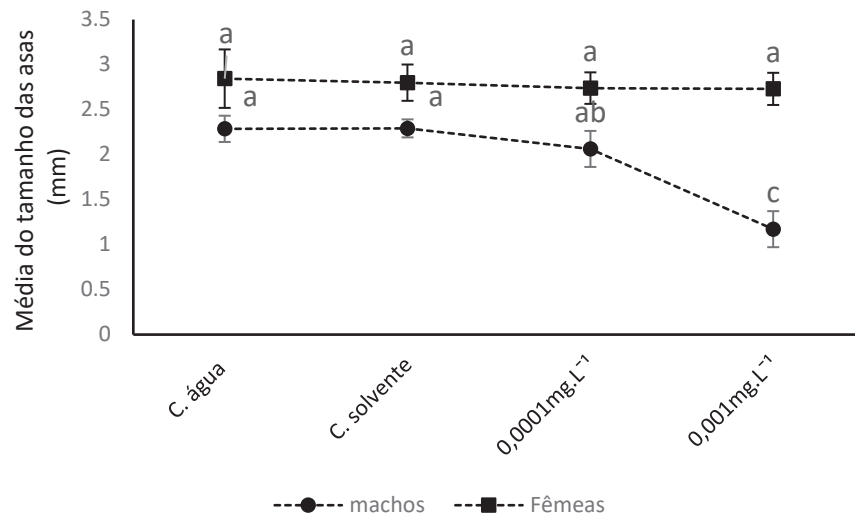


FIGURA 14. Média e desvio padrão do tamanho das asas de machos (n = 30) e fêmeas (n = 30) de *C.sancticaroli* (mm), após exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P. A.). Letras diferentes indicam alteração significativa (ANOVA $p \leq 0,05$, com *a posteriori* de Tukey).

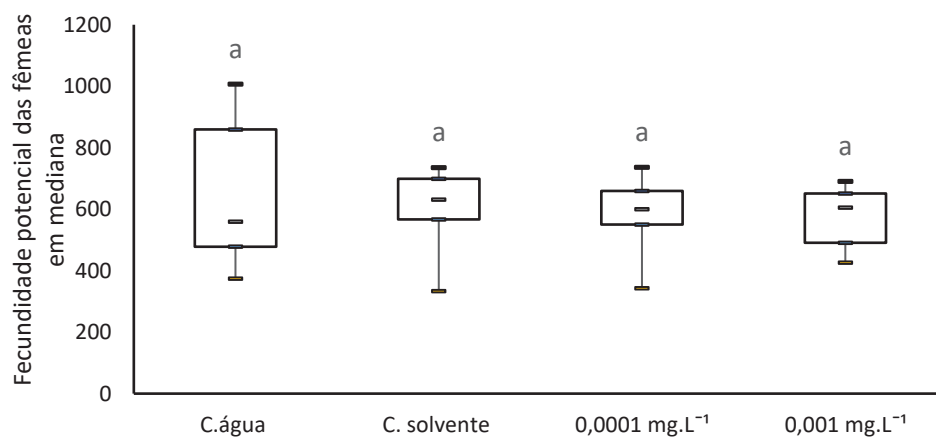


FIGURA 15. Mediana, primeiro e terceiro quartil da fecundidade potencial das fêmeas de *C. sancticaroli* (n = 30) após exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de BBP e grupos controles água e solvente (Etanol P.A.). Letras diferentes indicam diferença significativa (Kruskall-Wallis, $p < 0,0001$, com *a posteriori* de Dunnett).

4 DISCUSSÃO

O butil benzil ftalato é um desregulador endócrino considerado tóxico para os organismos vivos (QU et al., 2014). No entanto, os efeitos tóxicos sobre os invertebrados aquáticos ainda são poucos conhecidos. Este estudo avaliou a toxicidade do BBP em diferentes níveis de organização biológica de *C. sancticaroli* sob concentrações de relevância ambiental, obtendo-se efeitos tóxicos do DNA ao nível populacional.

Testes agudos de mortalidade demonstraram que o BBP atuou claramente sobre a sobrevivência das larvas em concentrações a partir de 2,5 mg.L⁻¹, apresentando porcentual de mortalidade da população exposta próximo de 60%. Isto demonstra que BBP ocasiona aumento da mortalidade das larvas de quarto instar em elevadas concentrações. Em larvas de *C. riparius* foi observada sobrevivência de 80% a 100% em larvas de quarto instar expostas a concentrações entre 0,001 µg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ de BBP em exposição de 48 horas (HERRERO et al., 2015). Isto demonstra que as larvas de *C. sancticaroli* apresentam maior resistência em exposição aguda ao BBP.

A análise dos danos ao DNA demonstrou que o BBP é genotóxico para as larvas de *C. sancticaroli* em exposição aguda (48 horas) e subcrônica (oito dias). Em 48 horas, danos significativos foram observados na concentração mais elevada, enquanto em exposição crônica danos significativos ao material genético tiveram início na concentração de 0,01 mg.L⁻¹ até a concentração máxima avaliada. A ocorrência de danos ao DNA em organismos expostos à ftalatos estão associadas a espécies reativas de oxidativo geradas durante o processo de metabolização dos plastificantes (RUSYN et al., 2001; ERKEKOGLU; KOCER-GUMUSEL, 2014). Em exposição subcrônica, mesmo em baixas concentrações (0,01 mg.L⁻¹) provocou danos no material genético. Dessa forma, em ambiente com liberação constante de BBP poderá ocasionar alterações na estrutura e função do DNA de larvas de Chironomidae (COLLINS, 2004).

Danos ao DNA podem ocasionar mutações no material genético, o que interfere na constituição genética da população, sendo necessário o estudo de danos ao DNA relacionados a exposição a contaminantes ambientais (PARK; CHOI, 2007), representando uma importante ferramenta no estudo da toxicidade dos ftalatos.

Alterações na atividade das enzimas ocasionadas pelo BBP foram observadas em exposição aguda (48 horas) e subcrônica (8 dias). Em exposição aguda o BBP ocasionou efeito neurotóxico nas larvas de *C. sancticaroli* com redução da atividade da AChE, importante regulador do impulso nervoso (AZEVEDO-PEREIRA et al., 2011; ARAÚJO et al., 2016). A

inibição da atividade da AChE impede a degradação da acetilcolina, ocasionando contração muscular contínua, o que influencia diretamente na locomoção dos organismos, tornando-os mais suscetíveis à predação (PENTTINEN; HOLOPAINEN, 1995; AZEVEDO-PEREIRA et al., 2011). A redução da atividade da AChE também pode interferir na sobrevivência dos organismos (DAY; SCOTT, 1990). Assim, os dados obtidos indicam que a exposição aguda ao BBP pode afetar a sobrevivência das larvas de *C. sancticaroli*, em virtude da redução da atividade da AChE. Dessa forma, a presença do plastificante no ambiente pode ocasionar redução da densidade populacional da espécie em curto período de exposição. Redução da atividade da AChE ocasionadas pelo BBP foram observados em *Danio rerio* (Chordata: Cyprinidae) expostos por sete dias a concentrações de 0,332 mg.L⁻¹ e 0,665 mg.L⁻¹ (ZHANG et al., 2014).

A via de biotransformação apresentou alterações na atividade de enzimas de fase I e fase II, em exposição aguda (48 horas) e subcrônica (oito dias). Para as esterases, em exposição aguda ocorreu redução da atividade da EST- α (0,1 mg.L⁻¹) e aumento da atividade de EST- β (2 mg.L⁻¹) e em exposição subcrônica redução da atividade da EST- β (0,01 mg.L⁻¹). Essas enzimas atuam na metabolização de inseticidas, principalmente organofosforados, sendo consideradas importantes fatores de adaptação para os mosquitos (BRAGA; VALLE 2007; MONTELLA et al., 2012). Dessa forma, o aumento da atividade da EST- β em exposição subcrônica pode indicar que está enzima esteja atuando na metabolização do BBP.

A atividade da GST apresentou redução em exposição aguda (0,0001 mg.L⁻¹ e 0,01 mg.L⁻¹ a 1 mg.L⁻¹) e subcrônica (0,01 mg.L⁻¹ a 2 mg.L⁻¹). A GST é uma importante enzima de biotransformação de fase II e antioxidante e atua catalizando a conjugação da glutathione reduzida a substâncias reativas, tornando-as mais hidrofílicas, o que possibilita a excreção celular (AITKEN; ROMAN, 2008). A redução da atividade desta enzima pode acarretar no acúmulo de metabólitos reativos, podendo gerar, conseqüentemente, danos ao DNA (AITKEN; ROMAN, 2008; LIU et al., 2014; MELA et al., 2014). Isto corrobora com as alterações observadas no material genético em longa exposição ao BBP. Dados semelhantes foram observados por em *C. riparius* em exposição de 48 horas, ao BBP na concentração 1 μ g.L⁻¹ (HERRERO et al., 2014) e 100 μ g.L⁻¹ (HERRERO et al., 2015).

O BBP ocasionou alterações na via de defesa ao estresse oxidativo em exposição aguda e crônica. Em 48 horas de exposição foi observado aumento da atividade da SOD (1 mg.L⁻¹). Em exposição subcrônica ocorreu aumento da atividade da CAT (0,001 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹) e da SOD nas concentrações entre 0,001 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹. Essas enzimas representam a primeira defesa antioxidante dos organismos, possuindo a função de neutralizar espécies reativas de

oxigênio do interior da célula, de modo a evitar o estresse oxidativo (GILLE; SIGLER, 1995; QU et al., 2014; LEI et al., 2015).

A SOD é uma enzima que cataliza o ânion superóxido gerando oxigênio e peróxido de hidrogênio (GILLE; SIGLER, 1995; CHOI et al., 1999; LEI et al., 2015). A CAT apresenta função associada à SOD convertendo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, diminuindo assim a toxicidade no interior da célula (QU et al., 2014). Com isso, a CAT tem a atividade elevada de modo a compensar o aumento de peróxido de hidrogênio, gerado pela atividade da SOD (CHOI et al., 2000). Dessa forma, o aumento da atividade da SOD e da CAT poderia sugerir a presença de espécies reativas de oxigênio na célula em exposição subcrônica, que quando associadas à presença de danos ao DNA reforçam a hipótese de estresse oxidativo gerado pelo BBP.

O aumento da atividade da SOD e da CAT ampliam a tolerância dos organismos atuando na desintoxicação em situações de estresse oxidativo (CHOI et al., 1999; DATKHILE et al., 2009), podendo representar fatores adaptativos para a resistência dos organismos expostos a ftalatos. Elevada atividade da SOD e da CAT, também foram observadas em *Oreochromis mossambicus* Peters, 1852 e em embriões de peixes, em exposição de 96 horas ao BBP em concentrações de 5 mg.L⁻¹ e 15 mg.L⁻¹ (SEPPERUMAL; SAMINATHAN, 2014).

A CAT apresentou redução da atividade nas concentrações 0,1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ em exposição de 48 horas. Essa enzima pode ser inibida pelo ânion superóxido, podendo ser reativada rapidamente pela atividade da SOD (KONO; FRIDOVICH, 1982). Isto também poderia sugerir a presença de espécies reativas de oxigênio nessas concentrações. O ftalato DEET também ocasionou redução da atividade da CAT em *C. riparius* em exposição de 12 dias nas concentrações de 6,90 mg.L⁻¹ e 38,94 mg.L⁻¹ (CAMPOS et al., 2016). Para o desregulador endócrino octaclorostireno também foram descritos reduzindo a atividade da CAT em *C. riparius* em exposição de 24 horas (LEE; CHOI, 2009).

A LPO não apresentou alterações em exposição aguda e subcrônica ocasionadas pelo BBP. A peroxidação lipídica provoca inatividade funcional e estrutural da membrana celular, podendo chegar a elevados níveis de alterações teciduais, ocasionada, principalmente pelo peróxido de hidrogênio (QU et al., 2014; SEPPERUMAL; SAMINATHAN, 2014). Isto sugere que o BBP não ocasionou alterações estruturais da membrana celular e em níveis teciduais nas larvas de *C. sancticaroli*, podendo indicar também a eficiência do sistema antioxidante na presença do BBP.

Em exposição aguda a manutenção do padrão da LPO e fatores como inibição da CAT sugerem que o BBP poderia estar ativando outras vias de estresse oxidativo, como a GSH-Px,

que também degrada peróxido de hidrogênio, sendo encontrada atuando em peixes expostos ao ftalato (SEPPERUMAL; SAMINATHAN, 2014). Para *C. riparius*, também não foram observadas alterações na quantidade de LPO foram observados em exposição por 48 horas ao ftalato DEHP em concentrações de 6,9 mg.L⁻¹ a 38,94 mg.L⁻¹ (CAMPOS et al., 2016).

Parâmetros biológicos são amplamente utilizados como *end points* nos estudos da toxicidade de desreguladores endócrinos (LAUGHLIN et al., 1978; EMA; MIYAWAKI, 2002; FOSTER, 2006; ROH et al., 2007). O BBP ocasionou redução do desenvolvimento das larvas em todas as concentrações avaliadas, com redução da cápsula cefálica de 14,21% já na menor concentração chegando a 43,1 % na concentração mais elevada (2 mg.L⁻¹). A determinação dos instares larvais corroboraram com o atraso no desenvolvimento dos organismos, não sendo observadas larvas de quarto instar nas concentrações a partir de 1 mg.L⁻¹. Isto indica que o BBP provoca prejuízo e atraso no desenvolvimento das larvas, mesmo em baixas concentrações.

Em insetos, o desenvolvimento dos organismos é regulado por hormônios como a ecdisona, um esteroide que atua nas alterações dos tecidos corpóreos resultando na metamorfose dos organismos (PLANELLÓ et al., 2011). Estudos anteriores com *C. riparius* indicam que o BBP possui a capacidade de mimetizar hormônios esteróides, atuando na sinalização da via hormonal da ecdisona, pela regulação do receptor do esteróide (EcR) (HERRERO et al., 2014; 2015). Ao longo do tempo isto pode ocasionar alterações no desenvolvimento e reprodução dos insetos (OEHLMANN; SCHULTE-OEHLMANN, 2003; PLANELLÓ et al., 2011). Dessa forma, o atraso no desenvolvimento das larvas de *C. sancticaroli* expostas ao BBP pode estar sendo ocasionado pela desregulação da via de desenvolvimento dos organismos.

Machos e fêmeas não apresentaram alterações no período de início da emergência, apenas em 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹, indicando que o ciclo vida não sofreu alterações nas duas menores concentrações avaliadas. Entretanto, a emergência dos adutos apresentou redução percentual nas concentrações mais baixas e não emergência nas concentrações mais elevadas (0,01 mg.L⁻¹ a 2 mg.L⁻¹), demonstrando elevada toxicidade do BBP sobre os imaturos, em longa exposição. Isto demonstra que a emergência dos adultos apresenta elevada sensibilidade em exposição ao BBP podendo ser utilizada como *end point* no estudo da toxicidade dos ftalatos. Para *C. riparius* o ftalato DEET provocou efeitos semelhantes, não apresentando também adultos em concentrações superiores a 21,78 mg.L⁻¹ (CAMPOS et al., 2016). Desreguladores endócrinos como o nonilfenol também ocasionaram redução da emergência em *C. riparius* (LEE; CHOI, 2006).

O crescimento inadequado das larvas ocasionou a permanência dos imaturos em exposição ao BBP, acarretando no aumento da mortalidade dos organismos e consequentemente a baixa e a não emergência dos adultos. Isto demonstra a elevada toxicidade do BBP sobre a emergência dos adultos de *C. sancticaroli*. O baixo número de adultos reduz o sucesso reprodutivo da espécie (SIBLEY et al., 1997; RODRIGUES et al., 2015), indicando que o BBP apresenta toxicidade em nível populacional.

A avaliação de concentrações de relevância ambiental (SOUZA et al., 2012), entre 0,0001 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹, demonstra que a presença constante do BBP no meio aquático, pode ocasionar declínio das populações naturais de Chironomidae, ocasionando redução da densidade populacional e alterando consequentemente, a dinâmica do ambiente aquático, já que larvas de Chironomidae representam um elo entre produtores e consumidores primários, participam da ciclagem de nutrientes e do processamento da matéria orgânica (CRANSTON, 1995; HAN et al., 2007).

Os machos apresentaram redução do tamanho das asas já na concentração mais baixa, enquanto que nas asas fêmeas não foram observadas alterações. O comprimento das asas está diretamente associado ao tamanho dos organismos adultos (YEAP et al., 2013), o que indica que o BBP ocasionou redução do tamanho dos machos de *C. sancticaroli*. O tamanho do corpo dos machos está diretamente associado a número de gametas produzidos e consequentemente, ao sucesso reprodutivo dos organismos (SIBLEY et al., 1997). Dessa forma, a redução do tamanho dos machos pode sugerir efeitos severos sobre a reprodução da espécie (RODRIGUES et al., 2015), podendo provocar prejuízos para o número de descendentes em ambientes aquáticos contaminados pelo BBP.

O atraso no crescimento das larvas acarretou na emergência de machos menores de *C. sancticaroli* em exposição ao BBP. Dados semelhantes foram observados em *C. riparius* expostos ao ftalato DEET nas concentrações de 21,78 mg.L⁻¹ e 34,32 mg.L⁻¹ (CAMPOS et al., 2016). Em mamíferos, reduções do tamanho de camundongos machos também foram descritos em exposição ao BBP (EMA; MIYAWAKI, 2002). Estes dados também demonstram que os machos apresentaram maior sensibilidade em exposição ao BBP em relação as fêmeas.

O BBP não afetou a fecundidade potencial das fêmeas em 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹, o que indica a manutenção do número de ovos possíveis das fêmeas produzirem (STRIXINO, 1980). Entretanto nas concentrações mais elevadas a não emergência de fêmeas ocasiona prejuízos para as próximas gerações, gerando elevado impacto sobre a população em exposição ao BBP.

A avaliação em diferentes níveis de organização biológica permitiu estabelecer os efeitos tóxicos do BBP de forma integrada, indicando que o composto provoca alterações do DNA à população, sendo mais tóxico para a emergência dos adultos. Esses resultados também, trazem informações que auxiliam a entender o modo de ação do composto, assim como o impacto ambiental gerado pela presença do BBP, já informações sobre a toxicidade do ftalato sobre os invertebrados aquáticos ainda são escassos.

5 CONCLUSÕES

A análise em conjunto de biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica demonstrou elevada toxicidade do BBP sobre *C. sancticaroli* apresentando maior toxicidade em longa exposição. Os resultados indicaram que o BBP causa efeitos genotóxicos, neurotóxicos, alterações da atividade de enzimas da via de biotransformação e de defesa ao estresse oxidativo. Em nível populacional o BBP provocou atrasos no desenvolvimento das larvas, ocasionando conseqüentemente a redução do tamanho dos machos e elevada toxicidade na emergência dos adultos com ausência da emergência nas concentrações mais elevadas. Isto demonstra que concentrações de BBP presentes no ambiente podem ocasionando efeitos subletais, alterando o metabolismo, assim como provocar efeitos que afetam a população.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro method. **Enzymol**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 636, p. 154–171, 2008.
- AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholinesterase activity to behaviour. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1210–1215, 2011.
- BENSON, R. Hazard to the developing male reproductive system from cumulative exposure to phthalate esters—dibutyl phthalate, diisobutyl phthalate, butylbenzyl phthalate, diethylhexyl phthalate, dipentyl phthalate, and diisononyl phthalate. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 90–101, 2009.
- BILA, MAIA D.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- BRAGA, I.; VALLE, V. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol Serv Saude** 16:279–293, 2007.
- CAMPOS, D.; GRAVATO, C.; QUINTANEIRO, C.; SOARES, A. M. V. M.; PESTANA, J. L. T. Responses of the aquatic midge *Chironomus riparius* to DEET exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 172, p. 80–85, 2016.
- CHOI, J.; ROCHE, H.; CAQUET, T. Characterization of superoxide dismutase activity in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae a potential biomarker. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 124, p. 73–81, 1999.
- CHOI, J.; ROCHE, H.; CAQUET, T. Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* mg. (diptera, chironomidae) larvae: Potential biomarkers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 495–500, 2000.
- CRANE, M.; SILDANCHANDRA, W.; KHEIR, R.; CALLAGHAN, A. Relationship between biomarker activity and developmental endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 361–369, 2002.
- DATKHILE, K. D.; MUKHOPADHYAYA, R.; DONGRE, T. K.; NATH, B. B. Increased level of superoxide dismutase (SOD) activity in larvae of *Chironomus ramosus* (Diptera: Chironomidae) subjected to ionizing radiation. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 4, p. 500–506, 2009.

DAY, K. E.; SCOTT, I. M. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. **Aquatic Toxicology**, v. 18, n. 2, p. 101–113, 1990.

Dornfeld, C.B. Utilização de *Chironomus sp* (Diptera, Chironomidae) para a Avaliação da Qualidade de Sedimentos e Contaminação por Metais. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental – Universidade Federal de São Carlos), São Carlos, São Paulo, 2006.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

EMA, M.; MIYAWAKI, E. Effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzyl phthalate during late pregnancy. **Reproductive Toxicology**, v. 16, p. 71–76, 2002.

EMA, M.; MURAI, T.; ITAMI, T.; KAWASAKI, H. Evaluation of the teratogenic potential of the plasticizer butyl benzyl phthalate in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 10, n. 5, p. 339–343, 1990.

ERKEKOGLU, P.; KOCER-GUMUSEL, B. Genotoxicity of phthalates. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, n. 9, p. 616–626, 2014.

FOSTER, P. M. D. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, p. 140–147, 2006.

GILLE, G.; SIGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 131–52, 1995.

HAHN, N. S.; FUGI, R. Alimentação de peixes em reservatórios brasileiros: alterações e consequências nos estágios iniciais do represamento. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n.4, p.469-480. 2007.

HAHN, T.; SCHULZ, R. Ecdysteroid synthesis and imaginal disc development in the midge *Chironomus riparius* as biomarkers for endocrine effects of tributyltin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 1052–1057, 2002.

HE, M.; YANG, C.; GENG, R.; et al. Monitoring of phthalates in foodstuffs using gas purge microsyringe extraction coupled with GC-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 879, p. 63–68, 2015.

HERRERO, O.; PLANELLÓ, R.; AQUILINO, M.; MORCILLO, G. Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius* (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad. **Revista de Toxicología**, v. 31, p. 176–186, 2014.

HERRERO, Ó.; PLANELLÓ, R.; MORCILLO, G. Chemosphere The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy metabolism, and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. **Chemosphere**, v. 128, p. 266–277, 2015.

HORN, O.; NALLI, S.; COOPER, D.; NICELL, J. Plasticizer metabolites in the environment. **Water Research**, v. 38, p. 3693–3698, 2004.

IKELE, C. B.; MGBENKA, B. O.; OLUAH, N. S. Histopathological effects of diethyl phthalate *Clarias Gariepinus juveniles*. **Animal Research International**. v. 8, p. 1431-1438, 2016.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **Mammalian Mutagenicity**. v. 3, p. 103-105, 1995.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 10, p. 5751–5754, 1982.

LAUGHLIN, R. B.; NEFF, J. M.; HRUNG, Y. C.; GOODWIN, T. C.; GIAM, C. S. The effects of three phthalate esters on the larval development of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* (holthuis). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 72, p. 323–336, 1978.

LEE, S. W.; CHOI, J. Multi-level ecotoxicity assay on the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) exposed to octachlorostyrene. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 269–274, 2009.

LEE, S.-B.; CHOI, J. Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instarlarvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 11, p. 3006–3014, 2006.

LEE, S.-B.; CHOI, J. Effects of bisphenol A and ethynyl estradiol exposure on enzyme activities, growth and development in the fourth instarlarvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, n. 1, p. 84–90, 2007.

LEE, S.-M.; LEE, S.-B.; PARK, C.-H.; CHOI, J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, n. 6, p. 1074–1081, 2006.

LEI, X. G.; ZHU, J.-H.; CHENG, W.-H.; et al. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. **Physiological Reviews**, v. 96, p. 1, 2015.

LIU, D.; PAN, L.; LI, Z.; CAI, Y.; MIAO, J. Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 251–259, 2014.

MANKIDY, R.; WISEMAN, S.; MA, H.; GIESY, J. P. Biological impact of phthalates. **Toxicology Letters**, v. 217, p. 50–58, 2013.

MARINKOVIĆ, M.; VERWEIJ, R. A.; NUMMERDOR, G. A.; et al. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to compounds with different modes of action. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 4, p. 1645–51, 2011.

- MELA, M.; NETO, F. F.; YAMAMOTO, F. Y.; et al. Mercury distribution in target organs and biochemical responses after subchronic and trophic exposure to Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 245–256, 2014.
- MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - **A review**. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 437–449, 2012.
- MORAIS, S.; PESENTI, E. C.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sancticaroli* (Diptera:Chironomidae). **Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 323–328, 2014.
- MORALES, M.; PLANELLÓ, R.; MARTÍNEZ-PAZ, P., HERRERO, O.; CORTÉS, E., GUITARTE, J. L. J., MOECILLO, G. Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: Expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 153, n. 1, p. 150–158, 2011.
- NAIR, P. M. G.; PARK, S. Y.; LEE, S. W.; CHOI, J. Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 31–37, 2011.
- NICACIO, G.; JUEN, L. Chironomids as indicators in freshwater ecosystems: An assessment of the literature. **Insect Conservation and Diversity**, v. 8, n. 5, p. 393–403, 2015.
- OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals. p. 1–21, 2004.
- OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. Endocrine disruption in invertebrates. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 11-12, 2003.
- OTERO, P.; SAHA, S. K.; MOANE, S.; BARON, J., CANCY, G., MURRAY, P. Improved method for rapid detection of phthalates in bottled water by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical**, v. 997, p. 229–235, 2015.
- PALACIO-CORTÉS, A. M.; SIGNORINI-SOUZA, I. DE L.; YOSHIO HARA, E. L.; et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) effects on *Chironomus sancticaroli* larvae after short-term exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 308–315, 2017.
- PARK, K.; KWAK, I.-S. Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. **Chemosphere**, v. 74, p. 89–95, 2008.
- PARK, S. Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **ScienceDirect**, v. 33, p. 817–822, 2007.
- PARK, S. Y.; 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.

PAUMEN, M. L.; BORGMAN, E.; KRAAK, M. H. S.; GESTEL, C. A. M. VAN; ADMIRAAL, W. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to polycyclic aromatic compound exposure. **Environmental International**, v. 152, n. 1, p. 225–232, 2008.

PENTTINEN, O.-P.; HOLOPAINEN, I. J. Physiological energetics of a midge, *Chironomus riparius* Meigen (Insecta, Diptera): normoxic heat output over the whole life cycle and response of larva to hypoxia and anoxia. **Oecologia**, v. 103, p. 419–424, 1995.

PINCHUK, I.; SHOVAL, H.; DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, n. 6, p. 638–647, 2012.

PLANELLÓ, R.; HERRERO, O.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 62–70, 2011.

PLANELLÓ, R.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, v. 71, p. 1870–1876, 2008.

QU, R.; FENG, M.; SUN, P.; WANG, Z. A Comparative Study on Antioxidant Status Combined with Integrated Biomarker Response in *Carassius auratus* Fish Exposed to Nine Phthalates. **Environmental toxicology**, p. 1125–1134, 2014.

RAKOTONDRAVELO, M. L.; ANDERSON, T. D.; CHARLTON, R. E.; ZHU, K. Y. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 360–366, 2006.

REBECHI, D.; RICHARDI, V. S.; VICENTINI, M.; et al. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 3, p. 296–301, 2014.

REBECHI-BAGGIO, D.; RICHARDI, V. S.; VICENTINI, M.; et al. Factors that alter the biochemical biomarkers of environmental contamination in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, p. 341–346, 2016.

RICHARDI, V. S.; REBECHI, D.; ARANHA, J. M. R.; NAVARRO-SILVA, M. A. Determination of larval instars in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) using novel head capsule structures. **Zoologia**, v. 30, n. 2, p. 211–216, 2013.

RODRIGUES, A. C. M.; GRAVATO, C.; QUINTANEIRO, C.; et al. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 506–513, 2015.

ROH, J.-Y.; JUNG, I.-H.; LEE, J.-Y.; CHOI, J. Toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology**, v. 237, p. 126–133, 2007.

RUSYN, I.; KADIISKA, M. B.; DIKALOVA, A.; et al. Phthalates Rapidly Increase Production of Reactive Oxygen Species in Vivo: Role of Kupffer Cells. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 744–750, 2001.

SEPPERUMAL, U.; SAMINATHAN, S. Antioxidant enzymatic response to Butylbenzylphthalate exposures in a fresh water fish *Oreochromis mossambicus*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v. 3, n. 4, p. 1007–1013, 2014.

SERVIA, M. J.; PÉRY, A. R. R.; HEYDORFF, M.; GARRIC, J.; LAGADIC, L. Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 3, p. 229–240, 2006.

SHEN, H. Y. Simultaneous screening and determination eight phthalates in plastic products for food use by sonication-assisted extraction/GC-MS methods. **Talanta**, v. 66, n. 3, p. 734–739, 2005.

SIBLEY, P. K.; BENOIT, D. A.; ANKLEY, G. T. The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: Relationship to reproduction and demographic endpoints. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 336–345, 1997.

SILVA DE ASSIS, H. C. Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen. Ph.D. Thesis, University of Berlin, Berlin, Germany, 1998.

STAPLES, C. A.; ADAMS, W. J.; PARKERTON, T. F.; et al. Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 875–891, 1997.

STAPLES, C. A.; PARKERTON, T. F.; PETERSON, D. R. A risk assessment of selected phthalate esters in North American and Western European surface waters. **Chemosphere**, v. 40, n. 8, p. 885–891, 2000.

STAPLES, C. A.; PETERSON, D. R.; PARKERTON, T. F.; ADAMS, W. J. The environmental fate of phthalate esters: A literature review. **Chemosphere**, v. 35, n. 4, p. 667–749, 1997.

STRIXINO, T. S. 1980. Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sabcarlensis* sp. n. (Diptera: Chironomidae). Tese de doutorado (Universidade Federal de São Carlos), São Paulo.

STRIXINO, T. & G. STRIXINO. 1982. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, n. 2, p. 183-189.

US-EPA. I. Phthalates. Teach Chemical Summary, p. 1–25, 2007. Disponível em: <http://epa.gov/teach>. Acesso em: 16/03/2015

VALLE, D.; MONTELLA, I. R. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Brasil. **Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 1, p. 128, 2006.

VICENTINI, M.; MORAIS, G. S.; REBECCHI-BAGGIO, D. R.; et al. Benzo (a) pyrene Exposure Causes Genotoxic and Biochemical Changes in the Midge Larvae of *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). **Neotropical Entomology**, v.46, p. 658-665, 2017.

VITALI, M.; CREMISINI, C.; GUIDOTTI, M.; MACILENT, G. Phthalate esters in freshwaters as markers of contamination sources- a site study in Italy. **Pergamon Environment International**, v. 23, n. 3, p. 337–347, 1997.

WATTS, M. M.; PASCOE, D.; CARROLL, K. Chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). **Aquatic Toxicology**, v. 55, n. 1-2, p. 113–124, 2001.

YEAP, H. L.; ENDERSBY, N. M.; JOHNSON, P. H.; RITCHIE, S. A.; HOFFMANN, A. A. Body size and wing shape measurements as quality indicators of *Aedes aegypti* mosquitoes destined for field release. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 1, p. 78–92, 2013.

ZHANG, C.; YANG, X.; ZHEN, B. Influence of BBP exposure on nervous system and antioxidant system in zebrafish. **Ecotoxicology**, v. 23, p. 1854–1857, 2014.

CAPÍTULO II
AVALIAÇÃO EM DISTINTOS NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO BIOLÓGICA DE
***Chironomus sancticaroli* STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA:**
CHIRONOMIDAE) APÓS EXPOSIÇÃO AO ANTIMÔNIO

RESUMO

No meio aquático o metaloide antimônio pode ser encontrado na coluna de água e associado ao sedimento, ocasionando efeitos tóxicos sobre os organismos. Este metaloide chega aos corpos hídricos principalmente pela atividade antrópica, como a produção industrial e combustão de material doméstico. O trióxido de antimônio apresenta elevada solubilidade em água liberando o composto na forma Sb^{3+} , a qual é considerada mais tóxica aos organismos aquáticos. Dentre esses, os Chironomidae se destacam como bioindicadores aquáticos, sendo amplamente utilizados em estudos de toxicidade de xenobióticos em diferentes níveis de organização biológica. Dessa forma, o objetivo da pesquisa foi avaliar os efeitos genotóxicos, bioquímicos e sobre a biologia de *Chironomus sancticaroli* expostos ao antimônio. Foram realizados bioensaios de toxicidade aguda (48 horas), utilizando larvas de quarto instar, subcrônicos (oito dias) e crônicos (25 dias) utilizando larvas de primeiro instar sob as concentrações nominais de 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹. Em exposição subcrônica, devido ao pouco crescimento das larvas, os parâmetros de genotoxicidade e bioquímicos foram avaliados apenas para as concentrações de 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹. As concentrações reais foram determinadas pelo método de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. A genotoxicidade foi avaliada através do ensaio cometa alcalino (N = 10). As alterações bioquímicas foram determinadas pela atividade enzimática de AChE, EST- α , EST- β , GST, CAT, SOD e danos de LPO (N = 20). Dentre os parâmetros biológicos foram avaliados o desenvolvimento das larvas, através do tamanho da cápsula cefálica das larvas e instares larvais, o tamanho dos adultos, através do tamanho das asas, a fecundidade potencial das fêmeas (N = 30) e o ciclo de vida, através emergência dos adultos (N = 3). Efeitos genotóxicos foram observados em exposição aguda (0,05 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹) e subcrônico (0,005 mg.L⁻¹). Dentre os efeitos bioquímicos foi observado aumento da atividade da AChE (0,8 mg.L⁻¹) apenas em exposição aguda. A via de biotransformação apresentou aumento da atividade da EST- β (0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹) e GST (0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹) em exposição aguda e da EST- α (0,0005 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹), EST- β (0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹) e GST mg.L⁻¹ (0,005 mg.L⁻¹) em exposição subcrônica. Para a via de defesa ao estresse oxidativo ocorreu aumento da atividade da SOD (0,8 mg.L⁻¹) e CAT (0,5 mg.L⁻¹) em exposição aguda e da CAT (0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹) em exposição subcrônica. Danos de LPO foram observados em exposição crônica (0,001 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹). Nos parâmetros biológicos, o Sb atuou diretamente sobre o desenvolvimento dos imaturos, em todas as concentrações avaliadas, apresentando redução de 47,11% do comprimento da cápsula cefálica em 0,8 mg.L⁻¹ de Sb. Para os instares larvais, todas as concentrações apresentaram distribuição significativa, apresentando apenas 40% de larvas em quarto instar já na primeira concentração, não sendo observadas larvas neste estágio nas maiores concentrações. O ciclo de vida não apresentou alterações, não sendo observadas modificações na emergência de machos machos e fêmeas. O número de adultos apresentou queda com aumento da concentração. As asas sofreram redução para os machos e fêmeas, nas três maiores concentrações avaliadas (0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹) gerando consequentemente adultos de menor tamanho. A fecundidade potencial apresentou queda nas maiores concentrações (0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹). Dessa forma, pode-se estabelecer que o Sb apresenta elevada toxicidade sobre *C. sancticaroli* ocasionando efeitos do DNA a nível populacional, sendo mais tóxico sobre os parâmetros biológicos, em concentrações de relevância ambiental.

Palavras-chave: ciclo de vida, desenvolvimento, metalóide

1. INTRODUÇÃO

O antimônio (Sb) é um metalóide de massa atômica 121,75 u e sólido em temperatura de 25°C. É encontrado naturalmente na crosta terrestre, possuindo aumento da concentração ambiental associada, principalmente, às atividades antrópicas, como descarte inadequado de produtos domésticos, tendo aumento na atmosfera de 50% entre os anos 1970 e 2000 (FILELLA et al., 2002; SUNDAR; KRACHLER 2005; CHAKRAVARTY, 2010). É utilizado como semicondutor, na fabricação de baterias, plásticos, resinas e em terapias médicas (FILELLA et al., 2002; WHO, 2003).

Compostos de Sb são amplamente utilizados no setor industrial, na produção de produtos de cerâmica, vidros, tintas e na medicina para o tratamento da Leishmaniose (WHO, 2003). Dentre eles, o trióxido de antimônio (ATO) é o principal composto empregado para obtenção de antimônio, sendo aplicado sobretudo como retardante de chamas (BOECK et al., 2003; US-EPA, 2014). Devido à ampla utilização, o ATO é considerado prioritário para estudo de toxicidade pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA, 2014).

O ATO chega ao meio ambiente principalmente pela ação do homem, como, a combustão de materiais domésticos, o transporte aéreo de componentes voláteis e o descarte inadequado de resíduos industriais (WHO, 2003). Na água, o ATO representa elevada solubilidade (25,6 mg.L⁻¹ em pH = 7), ocasionando impacto aos organismos aquáticos através da liberação de Sb, principalmente, na forma de íon Sb³⁺, a qual é considerada mais tóxica (WHO, 2003). No ambiente as formas inorgânicas Sb³⁺ e Sb⁵⁺ podem coexistir (FILELLA et al., 2002), sendo a forma Sb³⁺ a mais estável podendo ser oxidado a forma de íon Sb⁵⁺ na presença de substrato contendo ácido húmico e de microorganismo em percentual < 0,1 % (USEPA, 2014). A água representa a via primária de exposição dos organismos aquáticos ao Sb, que está presente tanto no sedimento quanto na coluna de água (AHMAD et al., 2014; USEPA 2014). No Brasil, o antimônio apresenta limite máximo para água doce e potável de 0,005 mg.L⁻¹ de acordo com a resolução 357 de 2005 (CONAMA, 2005).

Estudos sobre a toxicidade do antimônio estão relacionados principalmente a células humanas e de camundongos (HUANG et al., 1998; SCHAUMLÖFFEL; GEBEL, 1998; HEXT et al., 1999; POON; CHU, 2000; TAKAHASHI et al., 2002). Dentre os efeitos foram observados inibição das enzimas de reparo do DNA em células de camundongo (TAKAHASHI et al., 2002), genotoxicidade pela formação de micronúcleos (SCHAUMLÖFFEL; GEBEL, 1998) e inibição da via de desintoxicação em eritrócitos humanos (POON; CHU, 2000).

Apesar dos invertebrados representarem no meio aquático elevada importância para a manutenção do equilíbrio do ecossistema, poucos trabalhos existem sobre a toxicidade do Sb nesses organismos. Dentre esses, foram observadas elevada mortalidade em crustáceos expostos ao antimônio por 24 horas (NAM et al., 2009) e em Chironomidae expostos a sedimento contaminado por cloreto de antimônio ($SbCl_3$) por 14 e 28 dias (HEIJERICK; VANGHELUEWE, 2005) e contaminado por ATO em 10 dias de exposição (OBERHOLSTER et al., 2011). Alterações na sobrevivência e reprodução dos adultos também foram observadas para invertebrados expostos a solo contaminado com sais de sulfato de Sb por 28 dias (KUPERMAN et al., 2006).

Os Chironomidae são amplamente utilizados como bioindicadores de qualidade da água (HERRERO et al., 2014, 2015; REBECHI et al., 2014; PALACIO-CORTÉS et al., 2017; VICENTINI et al., 2017). Eles apresentam ciclo de vida relativamente curto com elevada densidade populacional, o que possibilita análise em conjunto dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica (CHOI, 2005). No meio aquático possuem elevada importância participando da ciclagem de nutrientes e servindo como fonte de alimentação de diversas espécies de peixes (NICACIO; JUEN, 2015), sendo indicados como organismos modelos pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2014).

A avaliação de biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica vem sendo aplicada em estudos de toxicidade ambiental utilizando Chironomidae como organismos modelos (HERRERO et al., 2014; MORAIS et al., 2014; CAMPOS et al., 2016). Em nível molecular, a análise dos danos ao DNA pode ser feita através do ensaio cometa uma ferramenta rápida e sensível, sendo considerado importante biomarcador de genotoxicidade (MORAIS et al., 2014; PALACIO-CORTÉS et al., 2017; VICENTINI et al., 2017).

Alterações bioquímicas podem ser avaliadas utilizando medidas de atividade enzimática, que possuem elevada sensibilidade frente à poluição ambiental. A atividade da acetilcolinesterase (AChE) é considerada um biomarcador de neurotoxicidade, devido a atuação na regulação do impulso nervoso (AZEVEDO-PEREIRA et al., 2011). A via de biotransformação de fase I pode ser representada pelas esterases alfa ($EST-\alpha$) e beta ($EST-\beta$) que atuam metabolizando, principalmente, inseticidas, estando relacionadas à resistência em insetos (MONTELLA et al., 2012). A glutathione S-transferase (GST) atua na fase II da biotransformação, catalizando a reação de conjugação da glutathione a diferentes substratos a serem excretados pelas células, sendo relevante na metabolização de xenobióticos (AITKEN; ROMAN, 2008).

A superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são enzimas com atividade associada a via de estresse oxidativo que atuam na proteção das células contra espécies reativas de oxigênio (EROS) (GILLE; SIGLER, 1995; CHOI et al., 1999; QU et al., 2014). Os danos de peroxidação lipídica são considerados os biomarcadores mais sensíveis ao estresse oxidativo, podendo representar efeitos em níveis teciduais (NIKI, 2009; PINCHUK et al., 2012; SEPPERUMAL; SAMINATHAN, 2014).

A longo prazo pode-se estabelecer os efeitos em níveis populacionais sendo avaliados por diferentes *end points*. Dentre eles, são de grande relevância a mortalidade, crescimento das larvas, emergência e tamanho dos adultos e fecundidade potencial da fêmeas (LEE; CHOI, 2009; MARINKOVIĆ et al., 2011; HERRERO et al., 2014; MORAIS et al., 2014; CAMPOS et al., 2016).

A avaliação dos efeitos do Sb em diferentes níveis de organização biológica em exposição aguda, subcrônica e crônica auxilia no estabelecimento dos efeitos tóxicos sobre os organismos e as consequências geradas na população, assim como agrega informações sobre o modo de ação e o risco ambiental ocasionado pelo xenobiótico. Neste trabalho foram avaliados os efeitos genotóxicos, bioquímicos e sobre a biologia de *C. sancticaroli* em exposição aguda e crônica ao Sb.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Os espécimes foram obtidos da colônia de *Chironomus sancticaroli* mantida no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (LAMFIC²) (FIGURA 1). A criação seguiu o protocolo de Vicentini et al. (2017), modificado de água desclorada para água reconstituída (Solução de estoque I (sulfato de cálcio (CaSO₄); 1000 ml água destilada e solução de estoque II (Cloreto de potássio (KCl); Carbonato de sódio (NaHCO₃); 1000 ml água destilada). Essa proporção foi ajustada para os parâmetros de dureza de 16 mg.L⁻¹; pH entre 7,2 e 7,6; condutividade de 160 µS/cm. Os organismos foram mantidos em aquários (25 cm x 15 cm x 25 cm), contendo aproximadamente dois centímetros de areia de rio comercial e sete litros de água reconstituída em condições controladas de temperatura a 25°C ± 2 e fotoperíodo de 12/12 horas claro e escuro e aeração constante (FIGURA 2). A alimentação foi administrada três vezes por semana adicionando-se 2,5g de ração de cachorro triturada (Dog Chow®).

Vouchers dos espécimes da colônia foram depositados na Coleção Padre Jesus de Santiago Moure (DZUP) com números de acesso 249269 a 249276.

2.2. Avaliação da colônia matriz

A homogeneidade das respostas da colônia de *C. sancticaroli* foi determinada utilizando o teste de sensibilidade ao KCl (cloreto de potássio) seguindo o protocolo de Dornfeld (2006). As avaliações foram realizadas expondo larvas de quarto ínstaes sob concentrações de 1,5 g.l⁻¹; 2,25 g.l⁻¹; 3,5 g.l⁻¹; 5,0 g.l⁻¹ e 7,5 g.l⁻¹ de KCl, em condições de temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12/12 horas claro e escuro, por 48 horas. Os testes foram realizados em frascos de vidro de 300 ml com volume de solução de 200 ml, utilizando água reconstituída e sem a presença de sedimento. A alimentação foi administrada adicionando-se 250 µl de ração líquida (20g ração de peixe triturada (Tetramim®) para 1000 ml de água destilada) no início do teste. Para cada concentração foram expostas quatro réplicas, com seis larvas em cada recipiente, totalizando 24 larvas por controle e concentração.

Inicialmente foram realizados 20 testes para se definir a faixa de sensibilidade da espécie, que variou de 4,72 g.L⁻¹ (limite inferior = média da CL₅₀ + 2(desvio padrão)) a 6,75 g.L⁻¹ (limite superior = média da CL₅₀ + 2(desvio padrão)). Posteriormente, os testes de sensibilidade foram realizados uma vez por mês, sendo os dados analisados com auxílio do programa Trimen Spearman-Karber. Foram utilizados dados de bioensaios que permaneceram dentro da faixa estabelecida, o restante foi descartado.

Em média as CL₅₀ apresentaram valor de 5,76 g.L⁻¹ com coeficiente de variação de 4,56%. O coeficiente de variação indica a padronização da metodologia e a confiança dos resultados obtidos, validando a utilização da espécie a serem utilizados em exposição de xenobióticos (Pereira 2010). A *Environmental Canada* (1995) estabelece que o coeficiente de variação ideal deve ser ≤ 30 %. Dessa forma, coeficiente de variação igual a 4,56%, indica que a colônia matriz de *C. sancticaroli* apresentou homogeneidade de respostas o que possibilitou a utilização dos espécimes em teste de toxicidade.

2.3. Bioensaios de toxicidade

2.3.1. Condições dos bioensaios

Os bioensaios de toxicidade foram realizados com base no protocolo da OECD 235 (2011) com as seguintes modificações: fotoperíodo de 16/8 horas claro e escuro para 12/12

horas claro e escuro e larvas de primeiro instar nas exposições crônicas, devido à dificuldade de manipulação e à elevada sensibilidade dos organismos. Para os ensaios foi utilizado como substrato areia de quartzo branco (50 -70 MESH – Sigma Aldrich®) e água reconstituída. A temperatura foi mantida em $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade $80\% \pm 10\%$ (STRIXINO; STRIXINO, 1982).

O Trióxido de Antimônio (99%; Sigma-Aldrich® - 230898) foi inicialmente diluído em ácido clorídrico (37% P. A.), com concentração final de 1000 mg.L^{-1} . Posteriormente, essa solução foi diluída em etanol P. A. para a preparação da solução teste. Dessa forma, para se ter um controle adequado foram adicionados aos bioensaios um grupo apenas com água reconstituída e um grupo com solução de etanol P. A. e ácido clorídrico, na proporção de 25:1.

No início e final dos bioensaios foram mensurados parâmetros físico-químicos da água de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, salinidade, condutibilidade e produtos sólidos totais.

2.3.2. Ensaios de toxicidade aguda (48 horas)

Massas ovíferas de *C. sancticaroli* foram retiradas da colônia e mantidas em bandejas de criação contendo 78 g de areia de quartzo branco (3mm) e três litros de água reconstituída, em condições de temperatura a 25°C , fotoperíodo de 12/12 horas claro e escuro, umidade $80\% \pm 10\%$ e aeração constante. A alimentação foi ministrada a cada dois dias com 0,32 g de ração de peixe triturada (Tetramim®). Após o período de sete dias as larvas de quarto instar foram expostas ao agente tóxico.

Os testes foram realizados em frascos de vidro de 300 ml, com fundo chato, contendo 10 larvas, 13 g de quartzo branco, água reconstituída e solução de contaminante com volume final de 100 ml. Em cada ensaio foram adicionadas seis réplicas, totalizando 60 larvas para cada grupo e concentração, sendo realizadas três repetições. Os bioensaios foram estáticos e os frascos foram mantidos em câmara de germinação do tipo BOD.

Para a obtenção de antimônio foi utilizado o trióxido de antimônio, devido a fácil diluição do produto. Inicialmente foram realizados testes de mortalidade com as concentrações nominais de Sb de $0,0005 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$, 1 mg.L^{-1} , $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$ e 2 mg.L^{-1} , tendo como base o limite máximo determinado para a presença de compostos de Antimônio para água doce no Brasil de $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$, determinado pelo Conselho Nacional do meio Ambiente (CONAMA 357, 2005).

Para as análises foram determinadas as concentrações com índice de sobrevivência acima de 60%. Dessa forma, nos ensaios agudos foram avaliados os danos ao DNA e atividade

enzimática sob as concentrações de 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹.

Os parâmetros físico-químicos mantiveram-se, em temperatura a 23,1°C ± 1,0, pH a 6,78 ± 10,8 mg.L⁻¹, oxigênio dissolvido a 6,46 ± 0,1 mg.L⁻¹, salinidade a 49,03 ± 1,04 µg.l⁻¹, condutibilidade 117, 3 ± 1,03 µS.cm⁻¹ e produtos sólidos totais a 83,33 ± 8,65 mg.L⁻¹. Os parâmetros de temperatura, pH, e oxigênio dissolvido permaneceram na faixa estabelecida pela OECD (2004), de temperatura com variação de ±1, variação de pH de 1,5 e oxigênio dissolvido entre 5 e 7, indicando a qualidade dos bioensaios.

2.3.3. Exposição subcrônica (oito dias) e crônica (25 dias)

Paras os bioensaios de toxicidade subcrônica (8 dias) e crônica (25 dias) massas ovíferas foram retiradas da colônia matriz de *C. sancticaroli* e mantidas em copos com 100 ml de água reconstituída, em condições de temperatura a 25°C ± 1, fotoperíodo de 12/12 horas claro e escuro e umidade 80% ± 10%. Após 72 horas, foram separadas em lupa e expostas à contaminação.

Os ensaios foram realizados em aquários de vidro (10 cm x 21 cm x 10,5 cm) contendo 78 g de areia de quartzo branco (0,5 mm), água reconstituída, solução de teste e ração líquida (25 g ração Tetramin®; 1000 ml de água destilada), com volume final de 700 ml, sendo mantidos sob aeração constante em câmara de germinação do tipo BOD. Em cada bioensaio foram expostas 300 larvas por concentração e grupo controle, divididas em grupos de 100, com três repetições, totalizando 900 larvas expostas. A alimentação foi administrada com ração líquida, adicionando-se 0,012 mg.L⁻¹ por larva a cada 48 horas.

Foram realizados bioensaios subcrônicos de oito dias para avaliar os danos ao DNA, atividade enzimática e tamanho da cápsula cefálica e crônicos de 25 dias para avaliar, emergência, tamanho das asas e fecundidade potencial das fêmeas. Nestes bioensaios, foram realizadas troca de total da água a cada oito dias para renovar o ambiente, devido a elevada permanência do Sb na água, de cerca de 125 dias (USE-PA, 2014), sendo adicionado solução teste e ração líquida.

Foram avaliadas as concentrações de 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹, 0,8 mg.L⁻¹ de Sb, com exceção dos ensaios de danos ao DNA e atividade enzimática, nos quais não foram analisadas as maiores concentrações (0,5 mg.L⁻¹, 0,8 mg.L⁻¹), devido a ocorrência de atraso no crescimento das larvas.

Os parâmetros físico-químicos mantiveram-se, em temperatura a $25^{\circ}\text{C} \pm 1,76$, pH a $6,86 \pm 0,25$, oxigênio dissolvido a $6,28 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ salinidade a $71,21 \pm 3,31 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, condutibilidade $145,3 \pm 5,4 \text{ } \mu\text{S.cm}^{-1}$ e produtos sólidos totais a $132,09 \pm 5,09 \text{ mg.L}^{-1}$. Os parâmetros de temperatura, pH e oxigênio dissolvido permaneceram na faixa estabelecida pela OECD (2004) de temperatura com variação de ± 1 , variação de pH de 1,5 e oxigênio dissolvido entre 5 e 7, demonstrando a qualidade dos bioensaios.

2.4. Determinação das concentrações reais do Sb na água

A quantificação química do antimônio foi realizada pelo Grupo de Química Ambiental da Universidade Federal do Paraná. Foram realizadas a partir de três amostras de cada concentração e grupos controles retiradas no momento inicial e final do bioensaio. Para os bioensaios crônicos as amostras foram retiradas após oito dias. Dez ml de água foi filtrada em filtros de PTFE de $45 \text{ } \mu\text{m}$ e armazenadas em tubos falcon em congelador a -20°C até o momento da análise.

Para a determinação das concentrações reais de Sb nas amostras, foi empregada a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES – *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*). Foi utilizado o espectrômetro da Thermo Scientific modelo ICAP 6500, operando com visão axial. Os parâmetros instrumentais utilizados foram: Radiofrequência de 40 MHz; potência da radiofrequência de 1150 W; vazão do gás do plasma de $12,0 \text{ L min}^{-1}$; vazão do gás auxiliar de $1,0 \text{ l.min}^{-1}$; Vazão do gás no nebulizador de $0,7 \text{ l.min}^{-1}$; tocha de quartzo com vista axial; nebulizador do tipo concêntrico; linha analítica atômica 206,8 nm.

Para as amostras com valor nominal maior que $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$, foi utilizado o sistema de nebulização convencional. Para as amostras com valor nominal menor que $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, foi utilizado o sistema de CVG (*Chemical Vapor Generation*). Para determinação espectométrica foram utilizados ácido nítrico 14 mol.L^{-1} e solução padrão de 1000 mg.L^{-1} de Sb utilizando água deionizada ($18 \text{ M}\Omega$ – mili-Q). Para o sistema CVG foram preparados solução de ácido clorídrico (HCl) a 3 mol.L^{-1} e borohidreto de sódio (NaBH_4) a 1,0% (m.v) em 0,4% de hidróxido de sódio (NaOH).

As curvas de calibração foram preparadas em meio de HNO_3 $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$, incluindo a prova em branco, utilizando soluções padrão na faixa de concentração de $0,010 \text{ mg.L}^{-1}$ a $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Para o sistema de CVG, a curva analítica foi preparada na faixa de 0,2 a $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$.

Para ambos os sistemas de introdução de amostra, o coeficiente de correlação linear obtido foi superior a 0,99, atendendo assim, os critérios de linearidade.

2.5. Biomarcador genético

Os danos ao DNA foram determinados, após a exposição aguda (48 horas) e subcrônica (8 dias), utilizando a técnica do ensaio cometa alcalino seguindo o protocolo de Lee & Choi (2006) modificado por Moraes et al. (2014). Foram avaliadas as concentrações de 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb em exposição aguda e 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹ de Sb em exposição subcrônica. Para cada concentração e grupo controle foram acondicionadas 100 larvas, divididas em grupos de 10 cada, em 500 µL de soro bovino fetal, homogeneizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em vórtex. 100 µL da suspensão foi misturada com 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 1 % (0,1 g de LMP; 20 ml de tampão fosfato salino (PBS)) e as amostras colocadas em lâminas recobertas por agarose normal a 1,5% (1,5 g; 100 ml de PBS). Estas foram recobertas sob lamínulas e mantidas sob refrigeração por um período de 10 a 20 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (10 mM Tris; 100 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 2,5 M cloreto de sódio (NaCl); dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 %) por 24 horas. Após serem retiradas da solução de lise as lâminas foram mantidas em solução alcalina (300mM NaOH; 1 mM EDTA) com pH > 13 por 30 minutos, para a desnaturação do DNA. Em seguida, foram submetidas à eletroforese a 4°C (25V e 300 mA) por 25 minutos. Ao término da corrida, as lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris (pH 7,5) por 15 minutos e fixadas com etanol absoluto por 5 minutos. Após secas, as lâminas foram coradas com 15 µL de Brometo de Etídio (20 µg/ml). Para cada grupo avaliado foram produzidas 10 lâminas, sendo examinados 100 nucleóides por lâmina, totalizando 1000 células avaliadas. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência sob aumento de 400x e os danos foram determinados utilizando a classificação de Kobayashi et al. (1995) e o escore foi calculado seguindo Collins (2004).

2.6. Biomarcadores bioquímicos

A atividade enzimática foi avaliada sob as concentrações 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb em exposição aguda (48 horas) e sob

as concentrações de 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹ 0,05 mg.L⁻¹ de Sb em exposição subcrônica (oito dias).

Para cada concentração e grupo controle foram avaliados 20 pools de cinco larvas cada. Estes foram homogeneizados em 620 µL de água milli-Q e centrifugados a 10850 rpm a 4°C em centrífuga, exceto para as amostras para a atividade da acetilcolinesterase.

As amostras foram aliqüotadas, com volume específico para cada enzima e armazenadas em freezer a -80°C. Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços e a leitura da absorbância em espectrofotômetro de microplaca (comprimento de onda entre 190-850 nm).

A atividade enzimática da AChE foi avaliada seguindo o protocolo de ELLMAN et al. (1961) modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998). Foram adicionadas 25 µL de amostras, 200 µL de 5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato (DTNB; 0,75 mM) e 50 µL de iodetoacetilcolina (ATC; 10 mM). Em seguida, a microplaca foi incubada em temperatura e luz ambiente por 30 minutos. A leitura foi feita com comprimento de onda de 405 nm, a cada minuto por cinco minutos. Os resultados foram expressos em µmoles/mgptn/min.

A atividade da EST-α e EST-β foi determinada seguindo o protocolo por Valle et al. (2006). Para ambas foram adicionadas 10 µL de amostra. Em seguida, para a EST-α foram adicionados 200 µl de alfa-naftil acetato/Nafosfato (0,3 mM), utilizando o alfa-naftol (0,3 mg.L⁻¹) como controle positivo. Para a EST-β foram adicionados 200 µL de beta-naftil acetato/Nafosfato (0,3 mM), utilizando beta-naftol (0,3 mg.L⁻¹) como controle positivo. Posteriormente as placas foram incubadas por 15 minutos em temperatura e luz ambiente, seguido da adição de 50 µl do corante Fast Blue (0,3%), sendo novamente incubadas por cinco minutos. Após esse período foi realizada leitura *end point* com comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos em nmol α- naftol/mgptn/min para EST-α e nmol β- naftol/mgptn/min para EST-β. A conversão dos valores de absorbância em conteúdo de alfa/beta-naftol foi feita através da curva padrão, utilizando as massas de 0 µg, 1 µg, 2 µg, 3µg, 4 µg e 5µg. Para isso foram adicionados volumes de 0 µL, 2 µL, 4 µL, 6 µL, 8 µL e 10 µL de alfa/beta-naftol em duplicata. O volume foi completado para 10 µL com água milli-Q. Posteriormente, seguiu o mesmo procedimento de preparação e leitura das placas.

A avaliação da atividade da GST foi realizada seguindo o protocolo de Keen et al. (1976). Foram adicionados 15 µL de amostras e 195 µL de solução composta por glutathiona reduzida (GSH 10 mM) e cloro-dinitrobenzeno (CDNB; 21 mM). A leitura realizada em comprimento de onda de 340 nm por 20 minutos a cada um minuto. Os resultados foram expressos em µmoles/mg ptn/min.

Para determinar a atividade da CAT seguiu-se o proposto por Aebi (1984). Foram adicionados 5 µL de amostra e 295 µL de solução de reação (água milli-Q; EDTA; peróxido de hidrogênio a 30%). A leitura foi feita com comprimento de onda de 240 nm por cinco minutos a cada 15 segundos. Os resultados foram expressos em µmol/min/mg de proteína.

A análise da atividade da SOD seguiu o proposto por Gao et al. (1988). Em microtubos de centrifugação de 1,5 ml foram alíquotadas, em duplicata, amostras de 40 µL. Em seguida, foram adicionados 885 µL de tampão tris de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; pH 8,0; 5mM) e 50 µL de ácido pirogálico. Posteriormente, os microtubos foram incubados por 30 minutos e a reação foi interrompida com 25 µL de HCl (1 N). Foi realizado juntamente um grupo controle, o qual, apenas, não foi incubado. Na sequência, 300 µL da solução foram adicionados à microplaca, em triplicata, sendo realizada a leitura com comprimento de onda de 440 nm. Os resultados foram expressos em unidades (U) de SOD/mg de proteína.

A quantidade de LPO foi determinada seguindo o protocolo de Jiang et al. (1992). Em microtubos de centrifugação de 1,5 ml, foram adicionados 70 µL de amostra e 70 µL de metanol (P.A.). As amostras foram centrifugadas a 7020 rpm por cinco minutos a 4°C. 100 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo e adicionados 900 µL do reativo de Fox 2 (solução metanólica (xilenol Orange 0.1 mM; hidroxitolueno butilado cristalino (BHT) 4 mM; metanol P. A.); solução de sulfato ferroso amoniacal (H₂SO₄; água milli-Q). Os microtubos foram incubados no escuro por 30 minutos, sendo agitados em vórtex a cada três minutos. Após esse período, a solução foi transferida para microplaca de 96 poços, em triplicata, com volume de 300 µL cada. A leitura foi feita a 560 nm. Os resultados foram expressos em nmol de hidroperóxidos/mg de proteína.

A quantidade de proteína total foi determinada seguindo o protocolo de Bradford (1976). Foram adicionados 10 µL de amostras, 10 µL de Albumina Sérica Bovina (BSA) para o controle positivo e 250 µL de corante Bradford (1 Bradford: 5 de água milli-Q). A leitura foi feita em comprimento de onda de 620 nm. A conversão de valores de absorbância em valores de proteína total foi realizada através da curva padrão de BSA utilizando as quantidades de 0 µg, 2,5 µg, 5 µg, 7,5 µg, 10 µg e 15 µg de BSA. Para isso foram adicionados os volumes de 0 µL, 2,5 µL, 5 µL, 7,5 µL, 10 µL e 7,5 µl de BSA, na microplaca seguindo o mesmo protocolo de preparação e leitura das placas de proteína.

2.7. Parâmetros biológicos

O tamanho das larvas foi avaliado através do tamanho da cápsula cefálica e instares larvais, após a exposição subcrônica (oito dias). Foram avaliadas 30 cápsulas cefálicas por concentração e grupos controles. Após os bioensaios de oito dias as larvas ainda vivas, foram armazenadas em etanol 80%. Posteriormente, as cápsulas cefálicas foram fotografadas em vista ventral em microscópio estereoscópio com câmera acoplada em aumento de 100x e medidas da região da base da cápsula até a ponta do dente trifido, utilizando o programa ZEN (2011- *blue edition*) (FIGURA 6). O comprimento também foi utilizado para determinar o instar dos organismos, seguindo as medidas estabelecidas por Strixino & Strixino (1985) e Richardi et al. (2013) para *C. sancticaroli*.

O ciclo de vida foi determinado através da emergência dos adultos após a exposição crônica de 25 dias. Foram determinados os períodos de emergências dos machos e fêmeas após três bioensaios crônicos. Após a emergência, os adultos foram retirados dos aquários com auxílio de sugador e sacrificados em congelador. Posteriormente, os adultos foram contabilizados, separados em machos (antenas plumosas) e fêmeas (antenas pilosas) e armazenados em etanol 99% para as análises da fecundidade potencial das fêmeas e tamanho das asas de ambos os sexos.

O tamanho dos adultos foi determinado através do comprimento das asas, após a exposição crônica (25 dias). As asas direitas de 30 fêmeas e 30 machos foram retiradas, montadas em preparação semipermanente, fotografadas em microscópio estereoscópio com câmera acoplada, sob aumento de 30x. Posteriormente, foram mensuradas da região do arculus ao ápice utilizando o programa ZEN (2011- *blue edition*).

A fecundidade potencial das fêmeas representa o número possíveis de ovos da fêmea produzir que está diretamente relacionado ao tamanho das fêmeas adultas. Segundo Strixino (1980), o tamanho das fêmeas é diretamente proporcional ao comprimento das asas, podendo ser utilizada para a determinação da fecundidade potencial. Esta foi avaliada com auxílio da expressão elaborada por Strixino (1980) para *C. sancticaroli*, utilizando as medidas das mensuradas para a avaliação do tamanho dos adultos, onde: $F = -707,41 + 471,64x L$ (L= comprimento da asa).

2.8. Análise dos dados

Distribuição normal e homogeneidade foram testadas pelos testes Shapiro Wilk ($p < 0,05$) e Levene's ($p < 0,05$), respectivamente, através do programa Past 3.11. Os dados paramétricos, foram avaliados pelo teste ANOVA ($p \leq 0,05$) de um fator com *a posteriori* de Tukey, sendo analisados os parâmetros biológicos, tamanho da cápsula cefálica, emergência dos machos e fêmeas, número total de adultos, número de adultos por dia e tamanho das asas, pelo programa Past 3.11. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$) com *a posteriori* de Dunnett pelo programa BioEstat 5.0, sendo analisados danos ao DNA, atividade enzimática e fecundidade potencial das fêmeas. Os instares larvais foram analisados através do teste de Mann-Whitney, par a par com $p \leq 0,05$ pelo programa Past 3.11. As análises de *outlier* foram feitas com a ferramenta online *Quickcalcs Graphpad software*. Os gráficos foram confeccionados no Excel 2013.

3 RESULTADOS

3.1. Testes de mortalidade

Foi observada mortalidade de 3,6% das larvas na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ em exposição de 48 horas, ocorrendo aumento da mortalidade de acordo com a concentração de Sb, obtendo-se 100% de mortalidade em 2 mg.l^{-1} de Sb (FIGURA 1). Dessa forma, foram selecionadas para a análises dos biomarcadores e *end point* as concentrações entre $0,0005 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de Sb, que apresentaram sobrevivência maior que 60%.

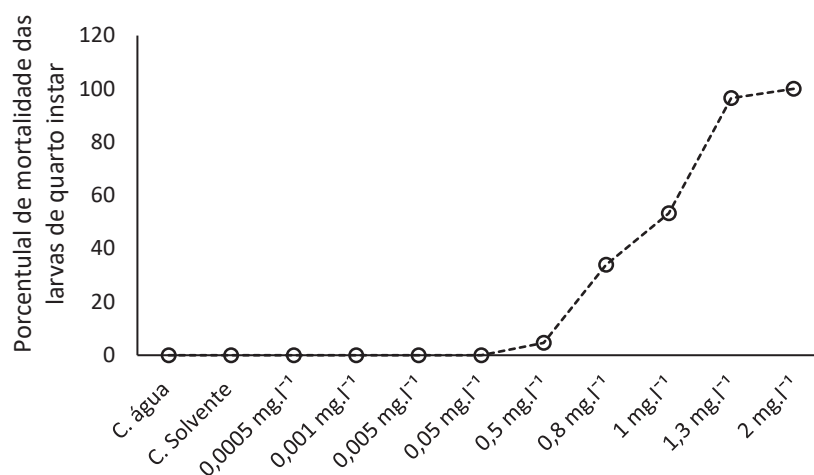


FIGURA 1. Mortalidade percentual de larvas de quarto instar de *Chironomus sancticarioli* (Diptera: Chironomidae) expostas por 48 horas ao Sb, demonstrando controle água e controle solvente (etanol P. A.) e as concentrações nominais de antimônio.

3.2. Determinação das concentrações reais do Sb na água

As menores concentrações (0,0005 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹) apresentaram concentrações reais próximas às calculadas, no período inicial (tempo 0) em exposição aguda. Para as concentrações nominais iguais ou acima de 0,005 mg.L⁻¹ os valores mensurados de antimônio permaneceram abaixo do valor calculado. No período final, todas as concentrações reais apresentaram valores menores em relação ao tempo 0, com redução significativa para 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb (TABELA 1). Os controles apresentaram valores nulos.

TABELA 1. Concentrações nominais e reais do antimônio total em exposição aguda (48 horas). O símbolo (*) indica diferença significativa para as concentrações reais iniciais e reais finais de Sb (ANOVA com *a posteriori* de Tukey $p \leq 0,05$)

[] nominal Sb mg.l ⁻¹	[] real mg.l ⁻¹		ANOVA ($p \leq 0,05$)
	Inicial	Final	
0,0005	0,0004 ± 0,01	0,0002 ± 0,00	
0,001	0,0015 ± 0,00	0,0011 ± 0,00	
0,005	0,0027 ± 0,00	0,0021 ± 0,00	
0,05	0,0269 ± 0,01	0,0142 ± 0,01	
0,5	0,0389 ± 0,00	0,0323 ± 0,04	*
0,8	0,439 ± 0,01	0,2552 ± 0,02	*

Em exposição subcrônica, no período de início da exposição (tempo 0), as concentrações nominais de 0,0005 mg.L⁻¹ a 0,05 mg.L⁻¹, apresentaram concentrações reais abaixo do valor calculado. Para as concentrações nominais de 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹, a concentração real foi mais elevada que os valores calculados. No período final de exposição todas as concentrações reais apresentaram valores reduzidos em relação ao tempo 0, com diferença significativa para 0,05 mg.L⁻¹ (TABELA 2). Os controles apresentaram valores nulos.

TABELA 2. Concentrações nominais e reais do antimônio total em exposição subcrônica (oito dias). O símbolo (*) indica diferença significativa para as concentrações reais iniciais e reais finais (ANOVA com *a posteriori* de Tukey $p \leq 0,05$)

[] nominal Sb mg.l ⁻¹	[] real mg.l ⁻¹		ANOVA ($p \leq 0,05$)
	Inicial	Final	
0,0005	< 0,0002 ± 0,00	0,0001 ± 0,00	
0,001	0,0017 ± 0,00	0,0005 ± 0,00	
0,005	0,0021 ± 0,00	0,0012 ± 0,00	
0,05	0,0404 ± 0,00	0,0159 ± 0,00	*
0,5	0,8940 ± 0,01	0,7535 ± 0,16	
0,8	1,440 ± 0,06	1,432 ± 0,04	

3.3. Biomarcador genético

Danos ao DNA significativos foram observados nas concentrações de 0,05 mg.l⁻¹ e 0,8 mg.l⁻¹ em exposição aguda em relação aos grupos controles em exposição ao Sb (FIGURA 2A). Entre as concentrações não foram observadas alterações significativas (FIGURA 2A). Em exposição subcrônica ao Sb, danos ao DNA foram observados em 0,05 mg.l⁻¹ em relação aos grupos controles (FIGURA 2B). Entre as concentrações não ocorreram alterações significativas (FIGURA 2B).

3.4. Biomarcadores bioquímicos

Aumento significativo da atividade da AChE foi observada em exposição aguda na concentração 0,8 mg.L⁻¹ de Sb em relação aos grupos controles (FIGURA 3A). Dentre as concentrações, foi observado aumento significativa da atividade entre 0,001 mg.L⁻¹ e

0,8 mg.L⁻¹ de Sb (FIGURA 3A). Em exposição subcrônica não ocorreu alterações significativas em relação ao grupo controle água (FIGURA 4A). Quando comparadas ao controle solvente reduções significativas da atividade da AChE foram observadas em 0,001 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ de Sb (FIGURA 4A). Dentre as concentrações foram observados aumentos significativos da atividade entre 0,005 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb (FIGURA 4A).

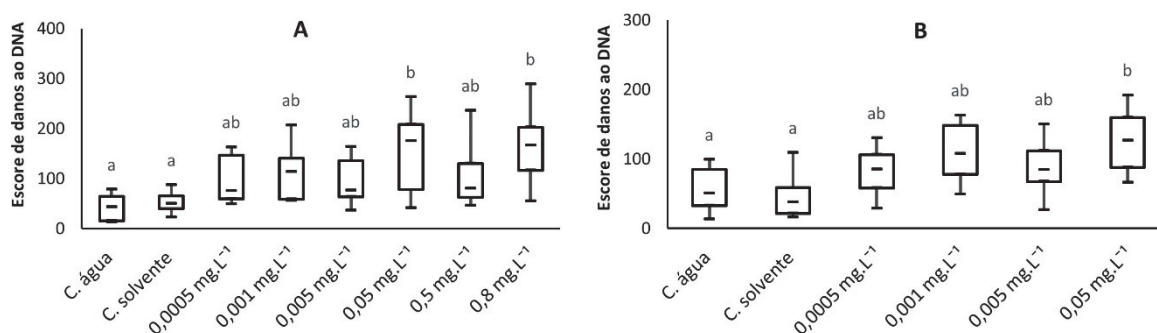


FIGURA 2. Escore de danos ao DNA em larvas de *C. sanctitaroli* em exposição ao antimônio (n = 10), demonstrando mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo. (A) exposição aguda. (B) exposição subcrônica. Letras diferentes representam alterações significativas, $p < 0,0001$ (Kruskall-Wallis com *a posteriori* de Dunnet).

A atividade da EST- α não apresentou alteração significativa nos grupos expostos ao Sb em relação aos grupos controles, em exposição aguda (FIGURA 3B). Dentre as concentrações aumento significativo da atividade da EST- α foram observados entre 0,005 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb (FIGURA 3B). Em exposição subcrônica aumento significativo da atividade da EST- α foi observado nas concentrações de 0,0005 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ de Sb em relação aos grupos controles (FIGURA 4B). Dentre os grupos expostos, redução significativa da atividade da EST- α foram observadas entre 0,0005 e 0,001 e aumento significativo entre 0,001 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ de Sb (FIGURA 4B).

A EST- β apresentou atividade significativamente elevada nas concentrações 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de BBP, em exposição aguda, com relação aos grupos controles (FIGURA 3C). Quando comparados os grupos expostos, aumento da atividade da EST- β foram observadas com aumento da concentração de Sb, obtendo-se concentração dependente (FIGURA 3C). Em exposição subcrônica a atividade da EST- β apresentou aumento nas concentrações de 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ de Sb em relação aos grupos controles (FIGURA 4C). Dentre os grupos expostos, aumento significativo da atividade foram

observadas entre 0,001 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb, apresentando elevação da atividade da enzima com aumento da concentração (FIGURA 4C).

Acréscimos significativos foram observados na atividade da GST nas concentrações de 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb em exposição aguda, com relação aos grupos controles (FIGURA 3D). Dentre os grupos expostos, aumento da atividade foram observadas entre 0,05 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb e redução da atividade entre 0,05 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ de Sb (FIGURA 3D). Em exposição subcrônica, aumento da atividade da GST foi observada apenas em 0,005 mg.L⁻¹ de Sb em relação aos grupos controles (FIGURA 4D). Dentre as concentrações, aumento significativo da atividade da GST ocorreu entre 0,0005 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹ de Sb, e redução significativa da atividade foram observadas entre 0,001 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ de Sb (FIGURA 4D).

Aumento significativo da atividade da CAT foi observada na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de Sb em exposição de aguda, quando comparadas aos grupos controles (FIGURA 3E). Dentre as concentrações aumento significativo da atividade foram observadas entre 0,0005 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb (FIGURA 3E). Em exposição subcrônica, a CAT apresentou aumento significativo nas concentrações de 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹ de Sb em relação aos grupos controles (FIGURA 4E). Dentre os grupos expostos, reduções da atividade foram observadas entre 0,0005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ de Sb (FIGURA 4E).

A atividade da SOD apresentou aumento significativo em 0,8 mg.L⁻¹ de Sb em exposição aguda, quando comparadas aos grupos controles (FIGURA 3F). Dentre os grupos expostos ao Sb, não foram observadas alterações significativas. Em exposição de oito dias, não houve alterações significativas na atividade da SOD quando relacionadas aos grupos controles e entre as concentrações de Sb (FIGURA 4F).

A quantidade de LPO não apresentou alterações significativas dos grupos expostos ao Sb em relação aos grupos controles em exposição aguda (FIGURA 3G). Dentre as concentrações redução significativa da LPO foram observadas entre as concentrações de 0,0005 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹, 0,0005 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹, 0,0001 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb (FIGURA 3G). Elevação da quantidade da LPO foi obtida apenas nas concentrações de 0,001 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ de BBP em exposição crônica (FIGURA 4G). Dentre os grupos expostos ao Sb não ocorreram alterações significativas (FIGURA 4G).

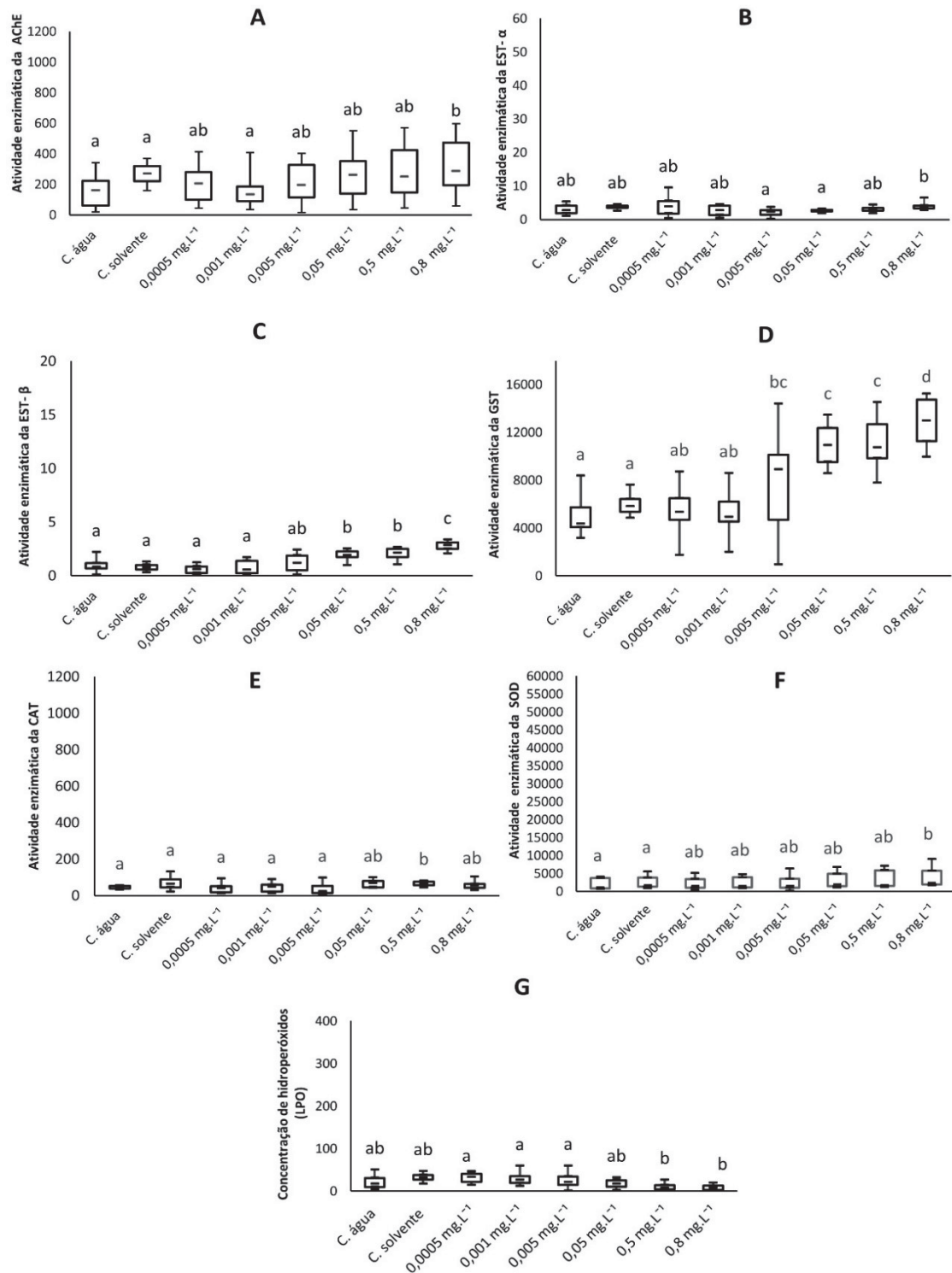


FIGURA 3. Mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo da atividade enzimática em larvas de *C. sancticaroli* após exposição aguda (48 horas) a diferentes concentrações de antimônio e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). Letras diferentes indicam alterações significativas para $p < 0,0001$ (Kruskal-Wallis com *aposteriori* de Dunnett). (A) acetilcolinesterase (AChE) ($\mu\text{moles/mgptn/min}$). (B) esterase alfa (EST- α) ($\text{nmol}\alpha\text{-naftol/mgptn/min}$). (C) esterase beta (EST- β) ($\text{nmol}\beta\text{-naftol/mgptn/min}$). (D) glutationa s-transferase (GST) ($\mu\text{moles/mg ptn/min}$). (E) catalase (CAT) ($\mu\text{mol/min/mg de proteína}$). (F) superóxido dismutase (SOD) (U desod/mg de proteína). (G) peroxidação lipídica (LPO) ($\text{nmol de hidroperóxidos/mg de proteína}$).

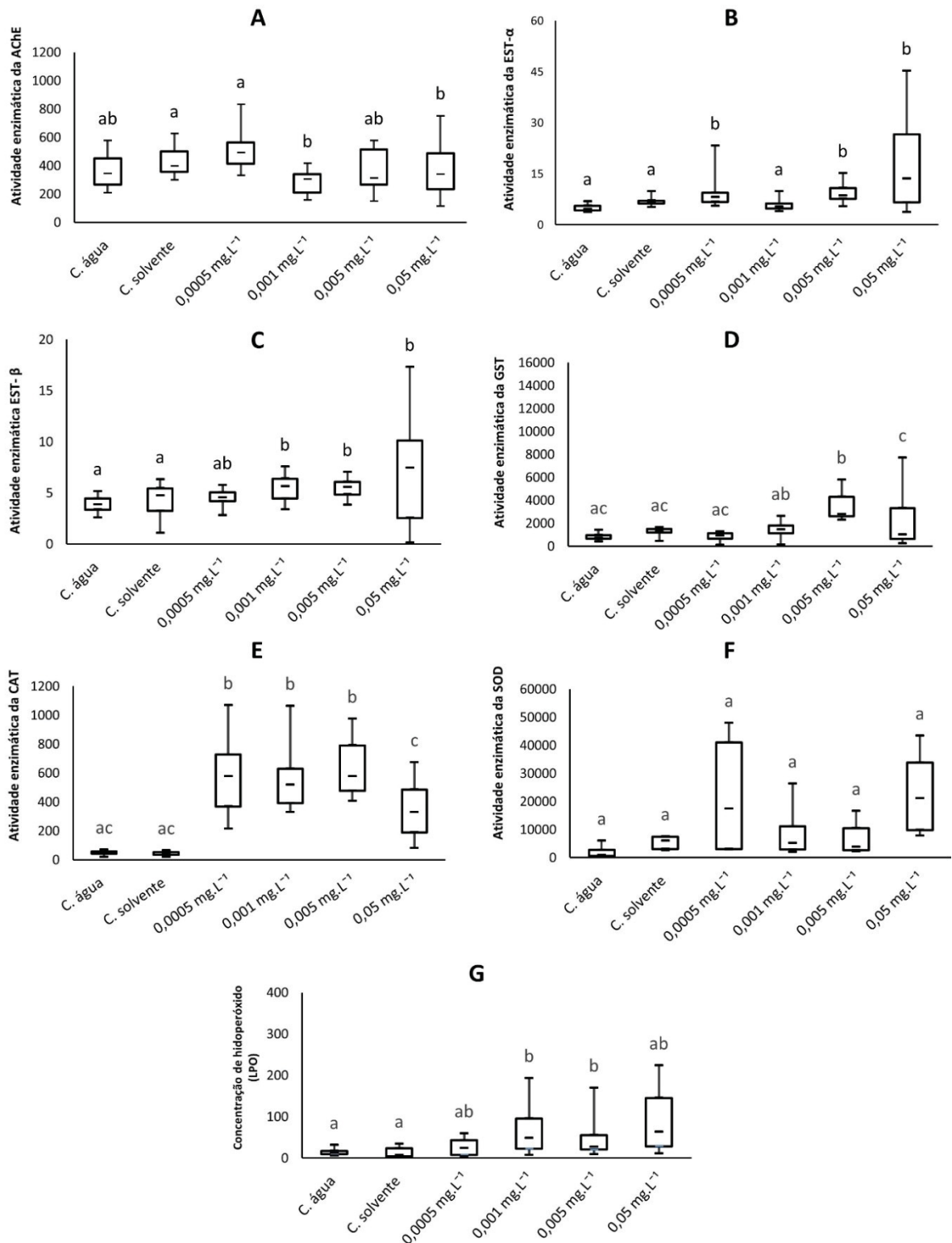


FIGURA 4. Mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo da atividade enzimática em larvas de *C. sancticarioli* após exposição sucronica (oito dias) a diferentes concentrações de antimônio e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). Letras diferentes indicam alterações significativas para $p < 0,0001$ (Kruskall-Wallis com *aposteriori* de Dunnett). (A) acetilcolinesterase (AChE) $\mu\text{moles/mgptn/min}$. (B) esterase alfa (EST-A) $(\text{nmol}\alpha\text{-naftol/mgptn/min})$. (C) esterase beta (EST-B) $(\text{nmol}\beta\text{naftol/mgptn/min})$. (D) glutationa S-transferase (GST) $(\mu\text{moles/mgptn/min})$. (E) catalase (CAT) $(\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{mg de proteína})$. (F) superóxido dismutase (SOD) $(\text{udesod/mg de proteína})$. (G) peroxidação lipídica (LPO) $(\text{nmol de hidropéroxidos/mg de proteína})$.

3.5. Parâmetros biológicos

Reduções significativas no comprimento da cápsula cefálica foram observadas em todas as concentrações de Sb avaliadas, em relação aos grupos controles (FIGURA 5). As concentrações entre $0,0005 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentaram respostas semelhantes não tendo sido verificada diferença significativa entre elas. Para as maiores concentrações ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$) também não houve alteração significativa entre elas. Entretanto, o aumento da concentração em 10x ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) ocasionou redução significativa da cápsula cefálica (FIGURA 5). A redução da cápsula cefálica representou 14,95% do tamanho da estrutura na concentração $0,0005 \text{ mg.L}^{-1}$, chegando a 47,11% de redução na concentração de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de Sb, em relação aos grupos controles (TABELA 3).

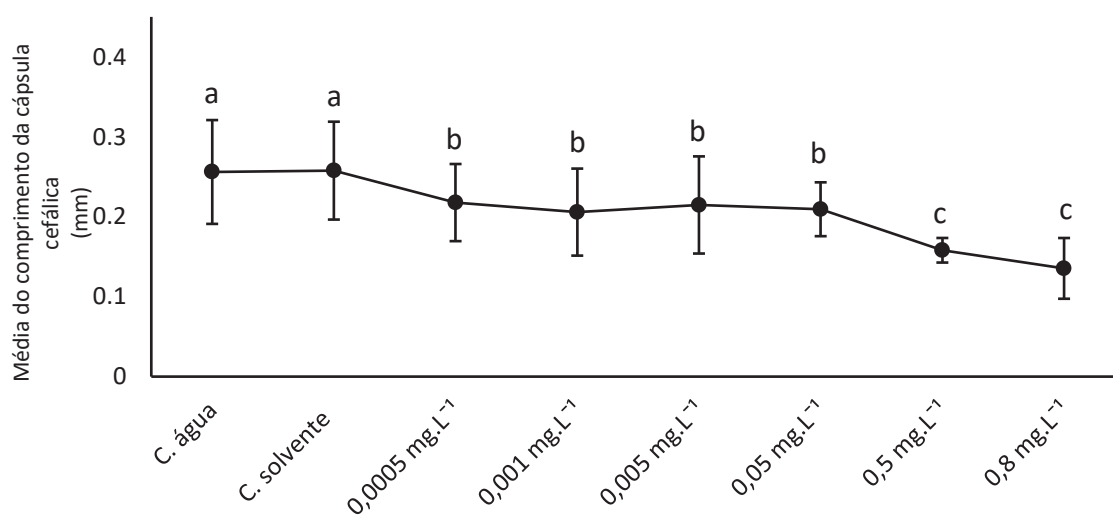


FIGURA 5. Média e desvio padrão do comprimento da cápsula cefálica (mm) de larvas de *Chironomus sancticaroli* (n =30) após exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de antimônio e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA com *aposteriori* de Tukey $p \leq 0,05$).

As medidas mínimas e máximas das cápsulas cefálicas encontradas para cada instar para os grupos controles e grupos expostos, após a exposição subcrônica ao Sb estão dispostas na TABELA 4. A avaliação dos instares larvais demonstrou distribuição diferenciada em todas as concentrações avaliadas em relação aos grupos controles (TABELA 5). Entre os grupos expostos as concentrações de $0,0005 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,05$ e $0,5$ de Sb apresentaram distribuição iguais dos instares larvais, enquanto que $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ foi semelhante apenas a concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Sb (TABELA 5).

TABELA 3. Porcentagem de redução da cápsula cefálica (n = 30) de larvas de *Chironomus sancticaroli* em exposição subcrônica (oito dias) a diferentes concentrações de Sb, em relação aos grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1).

[] mg.L ⁻¹	Redução do tamanho da estrutura (%)
0,0005	14,95
0,001	19,61
0,005	16,17
0,05	18,21
0,5	38,25
0,8	47,11

Ao final da exposição subcrônica (oito dias) os grupos controles apresentaram somente larvas de terceiro e quarto instar. Larvas de primeiro instar foram encontradas nas concentrações de 0,005 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹, e 0,8 mg.L⁻¹ de BBP. Larvas de segundo instar estavam presentes nas concentrações de 0,0005 mg.L⁻¹, 0,001 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ de Sb (TABELA 5). Larvas de terceiro instar foram observadas em porcentual maior de 40% em todas as concentrações analisadas. Larvas de quarto instar apresentaram redução porcentual com aumento da concentração não sendo observadas nas maiores concentrações, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb (TABELA 5).

TABELA 4. Valores mínimos e máximos do comprimento da cápsula cefálica (mm) para cada instar (mm) (n = 30) de larvas de *C. sancticaroli* expostas a oito dias a diferentes concentrações de Sb e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). O símbolo (-) representa ausência de larvas.

[] mg.l ⁻¹	1° instar	2° instar	3° instar	4° instar
C. água	-	-	0,160-0,250	0,268-0,370
C. solvente	-	-	0,178-0,178	0,268-0,357
0,0005	-	0,143-0,143	0,161-0,178	0,268-0,268
0,001	-	0,107-1,140	0,161-0,250	0,268-0,304
0,005	0,089-0,089	0,107-0,143	0,161-0,250	0,268-0,357
0,05	-	-	0,161-0,250	0,357-0,357
0,5	0,089-0,089	0,143-0,143	0,160-0,178	-
0,8	0,089-0,089	-	0,161-0,178	-

TABELA 5. Porcentagem de larvas de *C. sancticaroli* (n = 30) de cada instar por grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1) e expostas a diferentes concentrações de Sb, após exposição subcrônica (8 dias). Letras diferentes indicam resultado significativo, $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney par a par).

[] mg.l ⁻¹	Porcentagem de larvas				Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)
	1° instar	2° instar	3° instar	4° instar	
C. água	0.0	0.0	23.3	76.7	a
C. solvente	0.0	0.0	26.7	73.3	a
0,0005	0.0	6.7	53.3	40.0	b
0,001	0.0	10.0	63.3	26.7	bc
0,005	3.3	16.7	60.0	20.0	c
0,05	0.0	0.0	96.7	3.3	c
0,5	3.3	13.3	83.3	0.0	cd
0,8	40.0	0.0	60.0	0.0	d

O ciclo de vida não apresentou alterações, não sendo observado alterações significativas para a emergência dos machos e fêmeas em relação aos grupos controles após 25 dias de exposição ao Sb. Entre os grupos expostos também não foram observadas alterações significativas para machos e fêmeas em exposição ao Sb. A emergência dos grupos controles teve início em média no 11° dia, enquanto que para os grupos expostos a emergência teve início em média no 10° dia para 0,001 mg.L⁻¹, 11° para 0,0005 mg.L⁻¹, 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ e no 13° dia para 0,8 com finalização no 20° dia de exposição ao Sb para os grupos controles e 21° para os grupos expostos.

O parâmetro número total de adultos não apresentou redução significativa para todas as concentrações de Sb após 25 de exposição (TABELA 6). Dentre os grupos expostos ao Sb 0,0005, 0,001 e 0,005 apresentaram respostas semelhantes, enquanto que nas concentrações a partir de 0,005 foi observada redução significativa para o número de adultos com aumento da concentração, sendo observado concentração dependente (TABELA 6).

Para o número de adultos por dia não foi observada diferença significativa em relação aos grupos controles. Entre os grupos expostos ao Sb por 25 dias também não foram observadas alterações significativas (FIGURA 6).

TABELA 6. Média e desvio padrão da emergência dos adultos (n = 300) e do início da emergência de machos (n=3) e fêmeas (n=3) de *C. sancticaroli* após a exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de Sb e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). O símbolo (-) indica ausência de diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$, com *aposteriori* de Tukey)

Concentração (mg.L ⁻¹)	Média de emergência de adultos	ANOVA (p<0,05)	Dias de emergência			
			Machos (média)	ANOVA (p<0,05)	Fêmeas (média)	ANOVA (p<0,05)
C. água	290 ± 0,1	a	11,33± 2	-	12,66±0,5	-
C. solvente	298 ± 0,2	a	11,33± 2	-	12,66±0,5	-
0,0005 mg.l ⁻¹	262,0 ±0,5	b	11,66±0,5	-	12,33±0,5	-
0,001 mg.l ⁻¹	258,0±0,2	b	10,66± 2	-	12,66±0,5	-
0,005 mg.l ⁻¹	254,6± 1,5	b	11,66±0,5	-	11,66±0,5	-
0,05 mg.l ⁻¹	190,0± 1,2	c	11,66±0,5	-	11,66±0,5	-
0,5 mg.l ⁻¹	88,0± 1,4	d	11,66±1,5	-	13,33±1,1	-
0,8 mg.l ⁻¹	40,0 ± 0,3	e	13±1,4	-	14,5±0,7	-

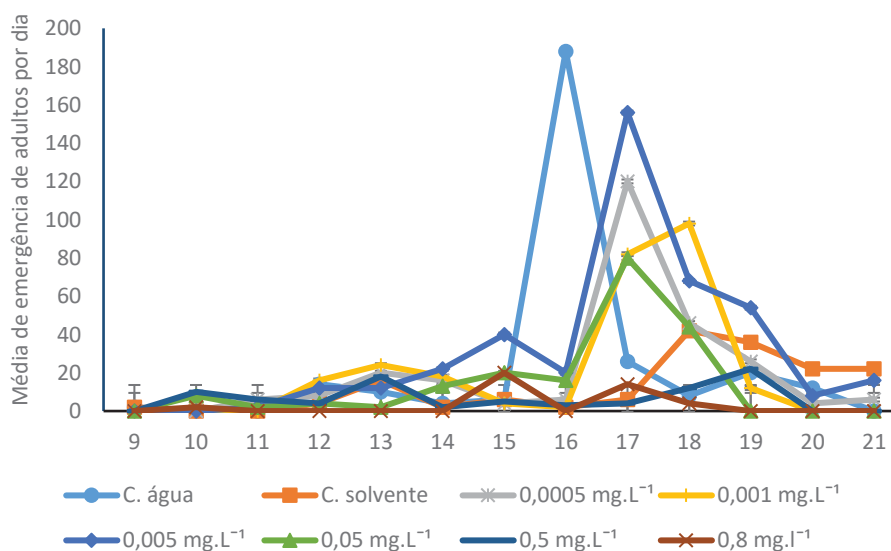


FIGURA 6. Média diária e desvio padrão da emergência de adultos (n = 3) de *C. sancticaroli* em exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de Sb e grupos controle água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1).

Reduções significativas no tamanho das asas dos adultos de *C. sancticaroli* foram observadas nas concentrações 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ de Sb para machos e fêmeas (FIGURA 8). Entre os grupos expostos as asas das fêmeas apresentaram redução significativa

com aumento da concentração entre 0,005 mg.L⁻¹ e 0,8, mg.L⁻¹ observando-se concentração dependente (FIGURA 8).

Para os machos as asas apresentaram redução percentual acima de 50% nas concentrações, 0,05 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ de Sb, atingindo 94,52% em 0,8 mg.L⁻¹ de Sb (TABELA 7). Para as fêmeas o aumento da concentração ocasionou redução da estrutura nas concentrações acima de 0,005 mg.L⁻¹, com queda de 94,49% do tamanho da estrutura em 0,8 mg.L⁻¹ de Sb (TABELA 7).

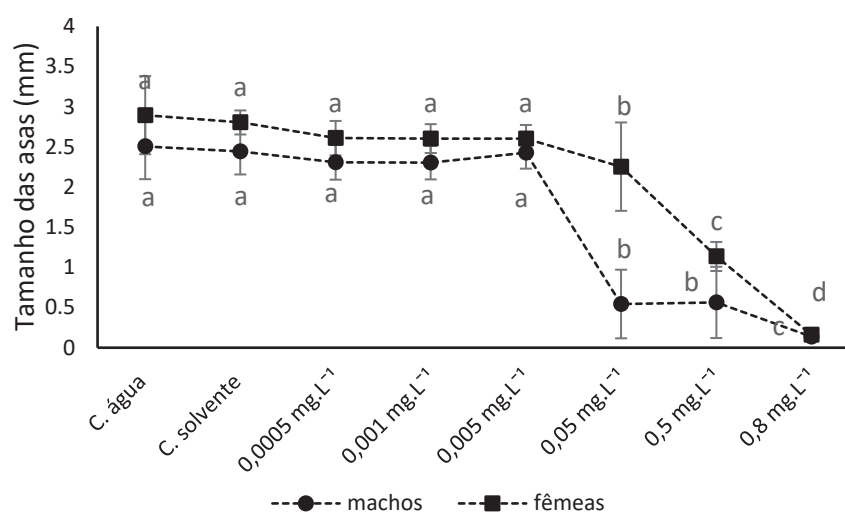


FIGURA 7. Média e desvio padrão do tamanho das asas de machos (n = 30) e fêmeas (n = 30) de *C. sancticaroli* expostas por 25 dias a diferentes concentrações de Sb e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA com *a posteriori* de Tukey, $p \leq 0,05$).

TABELA 7. Porcentagem de redução do tamanho das asas de machos (n = 30) e fêmeas (n = 30) de *C. sancticaroli*, após exposição crônica a diferentes concentrações de Sb em relação aos grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1).

[] mg.l ⁻¹	Redução da estrutura (%)	
	Machos	Fêmeas
0,0005	7.85	9.87
0,001	8.02	10.05
0,005	3.18	10.03
0,05	78.20	22.12
0,5	77.48	60.75
0,8	94.52	94.49

A fecundidade potencial das fêmeas apresentou queda significativa nas maiores concentrações em relação aos grupos controles ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ a $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$) em exposição de 25 dias ao Sb (FIGURA 9). Dentre os grupos expostos foi observado redução da fecundidade potencial com aumento da concentração a partir de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de Sb.

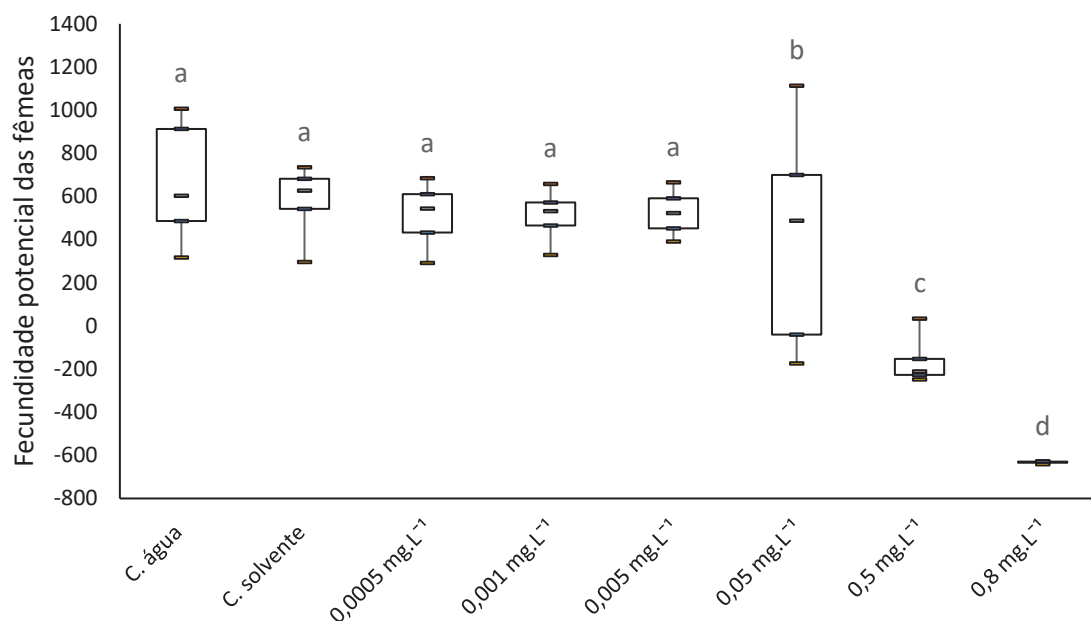


FIGURA 8. Mediana, primeiro e terceiro quartil e mínimo e máximo da fecundidade potencial das fêmeas ($n=30$) após exposição crônica (25 dias) a diferentes concentrações de Sb e grupos controles água e solvente (Etanol P.A. e ácido clorídrico, 25:1). Letras diferentes indicam diferença significativa (Kruskall-Wallis, $p < 0,0001$ com *a posteriori* de Dunnett).

4 DISCUSSÃO

Os efeitos tóxicos do antimônio sobre os invertebrados aquáticos ainda são escassos. A avaliação dos efeitos do antimônio em concentrações passíveis de serem encontradas no ambiente sobre *C. sancticaroli* demonstrou a toxicidade do metaloide do DNA a população.

A mortalidade das larvas apresentou aumento porcentual em concentrações nominais acima de $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$. Isto indica que o antimônio atua ocasionando mortalidade das larvas das larvas de quarto ínstarde *C. sancticaroli* em concentrações acima $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Em crustáceos, mortalidade de 50% foram relatados para *Macrobrachium nipponense* De Haan, 1849 e *Moina macrocopa* Straus, 1820 expostos a 2 mg.l^{-1} (YANG, 2014) e 12 mg.l^{-1} de Sb (NAM et al., 2009) e em *Daphnia magna* Straus, 1820, expostas ao ATO por 48 horas a $3,01 \text{ mg.L}^{-1}$

(WAAIJERS et al., 2013). Isto demonstra elevada sensibilidade das larvas de Chironomidade em exposição ao Sb.

Em exposição aguda a mensuração do antimônio apresentou valores reais abaixo do estimado para todas as concentrações, com redução significativa nas maiores concentrações (0,5 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹) em relação ao período final. Em exposição crônica as concentrações abaixo de 0,5 mg.l⁻¹ apresentaram valores reais abaixo do estimado. Reduções significativas da concentração real em relação ao período final ocorreram em 0,05 mg.L⁻¹ em exposição crônica.

Fatores de solubilidade e presença de sedimento podem alterar a disponibilidade do antimônio na água. ATO é um composto hidrofílico, mas a solubilidade pode ser influenciada pela presença de ânions no ambiente, apresentando maior fator de diluição (25, 6 mg.L⁻¹) em pH igual a sete (WHO, 2003). Na água, o Sb pode estar associado a partículas sedimentares e matéria orgânica presente no ambiente, ocasionando a redução da disponibilidade na coluna de água (RAKSHIT et al., 2011; AHMAD et al., 2014). O Sb também pode se acumular em tecidos vascularizados dos organismos, o que também pode alterar a disponibilidade do metalóide ao longo do tempo (GEBEL et al., 1997). Acumulação do Sb em macroinvertebrados como crustáceos e insetos foram observadas por Duran et al. (2007).

No ambiente já foram observados concentrações de antimônio entre 0,0010 mg.L⁻¹ e 7,97 mg.L⁻¹ em águas superficiais no Brasil (VIGLIO; SILVA, 2011) e concentrações menores que 0,001 mg.l⁻¹ para águas não poluídas (NAKAMURA; TOKUNAGA, 1996; FILELLA et al., 2002; NAM et al., 2009). No Brasil a Resolução 357 do CONAMA determina concentração máxima no ambiente de 0,005 mg.L⁻¹ de Sb (CONAMA 2005). Dessa forma a avaliação de concentrações reais entre 0,0004 mg.L⁻¹ a 0,439 mg.L⁻¹ em exposição aguda e 0,0002 mg.L⁻¹ a 1,432 mg.L⁻¹ em exposição subcrônica e crônica, representam concentrações possíveis de serem encontradas nos corpos de água, indicando elevada relevância para o estudo da toxicidade do antimônio, podendo-se estabelecer a relação entre as concentrações reais e efeitos tóxicos ocasionados pela exposição ao metalóide.

Efeitos genotóxicos do Sb foram observados em exposição aguda (0,05 mg.L⁻¹; 0,8 mg.L⁻¹) e crônica (0,05 mg.L⁻¹). Esses danos ao longo do tempo podem ocasionar alterações na estrutura genética da espécie, estando associado também a alterações populacionais como sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos (LEE; STEINERT, 2003; LEE et al., 2006; JHA, 2008). Isto pode alterar a dinâmica da espécie em ambientes impactados pela presença do antimônio. Em *C. tentans* danos ao DNA foram observados em exposição de 10 dias a sedimento contaminado com SbO₅ em concentração de 5000 µg.Kg⁻¹ (OBERHOLSTER et al., 2011).

O mecanismo de genotoxicidade do antimônio ainda não é bem elucidado. Alterações no material genético ocasionados pelo aumento do estresse oxidativo gerado em presença do antimônio já foram observados em células epiteliais de trabalhadores, expostos ao SbO_3 , em células embrionárias e em linfócitos humanos expostos *in vitro* ao íon Sb^{3+} (ELLIOTT et al., 1998; CAVALLO et al., 2002; JIANG et al., 2016). Dessa forma, os danos ao DNA associados à elevada atividade da SOD podem indicar alterações no material genético associado ao estresse oxidativo em exposição aguda em $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$.

Entretanto, Schaumlöffel & Gebel (1998) demonstraram que em linfócitos humanos incubados com suplemento contendo SOD ($125\text{-}300 \text{ U.ml}^{-1}$) e CAT ($200\text{-}500 \text{ U.ml}^{-1}$) e expostos a Sb, não apresentaram inibição dos danos ao DNA, sugerindo que o estresse oxidativo não seria o principal mecanismo de indução dos danos, podendo ser ocasionado pela incorporação do antimônio à molécula de material genético. A facilidade do antimônio transpor a membrana celular e a baixa eficácia do sistema de biotransformação, devido à fraca ligação à glutatona, facilita a reabsorção do antimônio pelo organismo, o que pode ocasionar danos ao material genético (GEBEL et al., 1997). Takahashi et al. (2002) relataram também, que o Sb inibiu o sistema de reparo do DNA em células de camundongos expostos a radiação, elevando os danos ao material genético. Dessa forma, os danos ao DNA ocasionados pelo antimônio poderiam estar associados a diferentes mecanismos, já que na concentração de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de Sb, em exposição aguda e crônica, não ocorreu aumento da atividade de enzimas de defesa ao estresse oxidativo.

Alterações bioquímicas ocasionadas pelo Sb foram evidenciadas em exposição aguda e subcrônica. A AChE apresentou aumento da atividade em $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ em exposição aguda. Essa enzima atua na regulação do impulso nervoso degradando o neurotransmissor acetilcolina (AZEVEDO-PEREIRA et al., 2011). O aumento da atividade da AChE pode representar resposta ao estresse, que se reflete na produção de proteínas como uma adaptação dos organismos às condições alteradas (PAVLOV, 1996).

Elevada atividade da AChE já foi observada em organismos expostos, principalmente, por curto período a metais, como em larvas de *C. riparius* expostas a sedimentos contaminado com cobre, chumbo e cádmio (DURAN et al., 2012), tecido de cérebro de *zebrafish* (Chordata: Cyprinidae) expostos ao mercúrio por 24 horas e mexilhões expostos por 72 horas ao cádmio e por 12 horas ao chumbo (BAINY et al., 2006; RICHETTI et al., 2011). Os metais atuam interagindo com o receptor da acetilcolina afetando a afinidade da ligação do neurotransmissor com o receptor. Isto ocasiona acúmulo da acetilcolina e, conseqüentemente, a indução da síntese da AChE de modo a reestabelecer os níveis do neurotransmissor na fenda

sináptica, como resposta a curtos períodos de exposição (BAINY et al., 2006). Dessa forma, como o Sb é um metalóidee possui propriedades químicas semelhantes aos metais possivelmente atua no mesmo mecanismo, ocasionando aumento da AChE em curto período de exposição (SCHÜRMAN et al., 2010).

Alteração da via de biotransformação, de fase I e fase II, foi observada em ambos períodos de exposição de forma diferenciada para EST- α , EST- β e GST. Isto indica que as enzimas EST- β e GST, em exposição aguda, e EST- α e EST- β em exposição crônica, estão atuando na metabolização do Sb, o que pode auxiliar a evitar efeitos tóxicos sobre os organismos (HERRERO et al., 2015).

As EST- α e EST- β são enzimas de fase I que atuam em presença de inseticidas, estando associadas à resistência de mosquitos (MONTELLA et al., 2012). Aumento da atividade da EST- α ocorreu na concentração de 0,0005 mg.L⁻¹ e nas duas mais elevadas em exposição crônica. Aumento da atividade da EST- β foi observada em concentrações de 0,05 mg.L⁻¹ até a mais elevada, em exposição aguda e entre 0,001 mg.L⁻¹ a 0,05 mg.L⁻¹ em exposição crônica. Isto indica que as esterases estão atuando na metabolização do antimônio, apresentando sensibilidade na presença do Sb em exposição aguda (EST- β) e crônica (EST- α ; EST- β) nas concentrações mais elevadas.

A GST tem função fundamental na desintoxicação dos organismos, atuando como catalizador da reação de conjugação entre diferentes componentes, como xenobiótico e espécies reativas de oxigênio, e a molécula de glutathione reduzida (FROVA, 2006; RAKOTONDRAVELO et al., 2006). Aumento da atividade da GST foi observado nas quatro maiores concentrações em exposição aguda e apenas em uma concentração (0,005 mg.l⁻¹) em exposição crônica. Esses dados corroboram com GEBEL (1997) que propõe que a metabolização do Sb está associada à conjugação com a glutathione elevando assim, a atividade da GST. Isto indica que a GST está atuando na metabolização do Sb, auxiliando na desintoxicação do organismo. Elevada atividade da GST também foi observada em camundongos expostos ao íon Sb³⁺ por 13 semanas (POON; CHU, 2000). Em *Chironomus riparius* aumento da atividade da GST foi observado em exposição a sedimentos contaminados com metais (DURAN et al., 2012).

Em insetos, a SOD e a CAT representam a primeira defesa do organismo contra o estresse oxidativo, gerado em presença de contaminantes ambientais (FELTON; SUMMERS, 1995). Aumento da atividade da SOD (0,8 mg.L⁻¹) e CAT (0,5 mg.L⁻¹) foram observados em exposição aguda e da CAT em exposição crônica nas concentrações entre 0,0005 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹. Isto indica que a presença do antimônio estimulou a ativação de enzimas do sistema de

defesa antioxidante de larvas de *C. sancticaroli* com maior elevação da atividade da CAT em exposição crônica.

A SOD possui a função de degradar o ânion superóxido, gerado a partir da reação de conjugação peróxido de hidrogênio, o qual apresenta elevada toxicidade para a célula, podendo provocar danos de peroxidação lipídica (GILLE; SIGLER, 1995; LUSHCHAK, 2011). Em exposição aguda, elevada atividade da SOD foi observada em 0,8 mg.L⁻¹. A CAT atua na inibição do peróxido de hidrogênio, tendo a função associada, principalmente à SOD (QU et al., 2014). Aumento da atividade da CAT observada em exposição aguda e crônica é possível que seja resposta para compensar o aumento do peróxido de hidrogênio nas células (LASZCZYCA et al., 2004). Esses resultados sugerem também, a elevada capacidade da CAT de inibir o peróxido de hidrogênio em exposição ao antimônio. Da mesma forma, o aumento da atividade da CAT associado aos danos de peroxidação lipídica em 0,001 mg.l⁻¹ podem indicar a presença de estresse oxidativo. Aumento da atividade da CAT também foram observada em *C. tentans* em 10 dias de exposição ao SbO₃ em 5000 µg.kg⁻¹ (OBERHOLSTER et al., 2011).

Danos de LPO foram observados em 0,001 mg.l⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹ em exposição crônica, que reforça a hipótese da indicação da presença de estresse oxidativo nas células, provocados pelo Sb. Esses danos são ocasionados, principalmente, por peróxido de hidrogênio que oxidam lipídios insaturados formando peróxidos, o que ocasiona alterações na funcionalidade das membranas biológicas, podendo chegar a níveis teciduais (ABUJA; ALBERTINI, 2001; NIKI, 2009; LUSHCHAK, 2011; QU et al., 2014). Os produtos da LPO também podem provocar danos ao material genético (DOTAN et al., 2004). Dessa forma, sugere-se que o Sb pode provocar alterações em elevado nível de organização biológica, nesta concentração.

A avaliação da biologia demonstrou que o Sb atuou diretamente sobre o desenvolvimento dos organismos, apresentando reduções do tamanho da cápsula cefálica de 14,95% e 47,11% na menor e maior concentração avaliada, respectivamente. A análise dos instares larvais reforça a indicação de efeitos do Sb sobre o desenvolvimento das larvas, não apresentando larvas de quarto instar em concentrações a partir de 0,5 mg.l⁻¹. Esses dados indicam que o Sb reduziu o crescimento das larvas de *C. sancticaroli*, com intensificação do efeito de acordo com o aumento da concentração de Sb. Isto demonstra elevada sensibilidade do parâmetro de crescimento das larvas em exposição ao Sb pode ser utilizada como indicador para os efeitos tóxicos do metaloide.

O crescimento das larvas está diretamente relacionado a capacidade reprodutiva dos organismos adultos, devido que os tecidos gaméticos começam a se desenvolver durante o estágio de quarto instar larval, podendo ser afetados pelos mesmos agentes estressores que provocam a queda do desenvolvimento dos organismos (SIBLEY et al., 1997). Dessa forma, a redução do crescimento das larvas de *C. sancticaroli*, indicam a presença de efeitos tóxicos elevados níveis de organização biológica, ocasionados pela exposição ao Sb, corroborando com a redução da fecundidade potencial das fêmeas em elevadas concentrações do metaloide.

O Sb na forma de $SbCl_3$ apresentou propriedades estrogênicas em ensaios com células humanas, demonstrando a atuação do metaloide como desregulador endócrino (CHOE et al., 2003). Dessa forma, a inibição do crescimento das larvas pode estar relacionada a uma possível desregulação endócrina ocasionados pelo antimônio. Entretanto, o mecanismo da toxicidade do Sb em invertebrados ainda não foi determinado.

O ciclo de vida não apresentou alterações para machos e fêmeas. Para o número de adultos emergidos redução significativa foi observado em todas as concentrações avaliadas, que indica elevada mortalidade das larvas em exposição crônica ao Sb. Estes resultados, também, apontam que os efeitos tóxicos podem repercutir em nível populacional, alterando a dinâmica de reprodução de *C. sancticaroli*, devido a redução do número de organismos que participam do processo de reprodução (SIBLEY et al., 1997), ocasionando consequentemente prejuízos para as próximas gerações.

O atraso no desenvolvimento das larvas ocasionou consequentemente a redução do tamanho dos adultos. Machos apresentaram asas menores nas três concentrações mais elevadas chegando a redução de 94,52% em $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$, enquanto que as fêmeas tiveram redução da estrutura nas mesmas concentrações, atingindo redução de 94,49% em $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$. Isto demonstra que o Sb ocasiona a emergência de adultos menores com aumento da concentração. Esses dados também indicam que os machos apresentaram maior sensibilidade na presença do antimônio devido a elevada queda no tamanho das asas já em $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$.

O tamanho dos organismos adultos está relacionado ao número de gametas produzido pelos machos e fêmeas (STRIXINO, 1980; SIBLEY et al., 1997; LILLEY et al., 2012). Dessa forma, adultos menores repercutem no sucesso reprodutivo da espécie, ocasionando redução da densidade populacional ao longo das gerações, em ambientes impactados pela presença de Sb. Isto indica também, que o Sb provoca efeitos tóxicos em níveis populacionais.

A emergência de fêmeas menores, nas duas concentrações mais elevadas, refletiu na queda da fecundidade potencial das fêmeas nas concentrações $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Isto representa redução da produção potencial de ovos produzidos pelas fêmeas (STRIXINO, 1980),

ocasionando prejuízos para as próximas gerações, devido a redução da densidade populacional, assim como provoca alterações da dinâmica do meio aquático já que as larvas de Chironomidae representam importante elo para os consumidores primários, participam da ciclagem de nutrientes e decomposição da matéria orgânica (HAN et al., 2007).

A toxicidade do antimônio sobre os invertebrados aquáticos ainda é pouco conhecida. Os resultados demonstram dados relevantes sobre a toxicidade do Sb em diferentes níveis de organização biológica em *C. sanctiaroli*, importante componente dos ecossistemas aquáticos na região neotropical, apresentando elevado impacto sobre o desenvolvimento, emergência e reprodução dos organismos. Isto, pode auxiliar a estabelecer o modo de ação do composto e o risco ambiental ocasionado pela presença do metalóide.

No Brasil, a resolução 357 do CONAMA (2005) indica o limite máximo de 0,005 mg.l⁻¹ para a presença de antimônio em águas doces e potáveis. Os dados demonstraram efeitos bioquímicos e, principalmente, no desenvolvimento das larvas de *C. sancticaroli* em concentrações reais iguais ou abaixo da estabelecida. Dessa forma, a presença dessas concentrações no ambiente pode ocasionar elevados efeitos tóxicos aos invertebrados aquáticos podendo alterar a estrutura e dinâmica das populações. Considerando os resultados obtidos, acompanhado da prudência, indica-se a necessidade de revisão dos limites apontados há aproximadamente 13 anos.

5 CONCLUSÕES

O estudo dos efeitos do Sb sobre *C. sancticaroli* em diferentes níveis de organização biológica demonstrou que o metalóide apresenta potencial genotóxico, em exposição aguda, alterou a via de biotransformação e de defesa ao estresse oxidativo em exposição aguda e subcrônica, sugerindo estresse oxidativo. Sobre os parâmetros biológicos os efeitos foram mais severos, ocasionando redução do crescimento, do tamanho dos adultos e fecundidade potencial das fêmeas. Dessa forma, pode-se estabelecer que o Sb apresenta elevada toxicidade sobre *C. sancticaroli* ocasionando efeitos do DNA a nível populacional, mesmo em concentrações permitidas no ambiente.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro method. *Enzymol.* 105:121–126, 1984.
- ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, v. 306, n. 1-2, p. 1–17, 2001.
- AHMAD, M.; LEE, S. S.; LIM, J. E.; et al. Speciation and phytoavailability of lead and antimony in a small arms range soil amended with mussel shell, cow bone and biochar: EXAFS spectroscopy and chemical extractions. **Chemosphere**, v. 95, p. 433–441, 2014.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 636, p. 154–171, 2008.
- AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholinesterase activity to behaviour. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1210–1215, 2011.
- AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M. Behaviour and growth of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) under imidacloprid pulse and constant exposure scenarios. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 219, n. 1-4, p. 215–224, 2011.
- BAINY, A.; MEDEIROS, M.; MASCIO, P. DI; ALMEIDA, E. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. **Biotemas**, v. 19, n. 1, p. 35–39, 2006.
- BOECK, M. DE; KIRSCH-VOLDERS, M.; LISON, D. Cobalt and antimony: Genotoxicity and carcinogenicity. **Mutation Research**, v. 533, n. 1-2, p. 135–152, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- CAMPOS, D.; GRAVATO, C.; QUINTANEIRO, C.; SOARES, A. M. V. M.; PESTANA, J. L. T. Responses of the aquatic midge *Chironomus riparius* to DEET exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 172, p. 80–85, 2016.
- CAVALLO, D.; IAVICOLI, I.; SETINI, A.; et al. Genotoxic risk and oxidative DNA damage in workers exposed to antimony trioxide. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 40, n. 3, p. 184–189, 2002.
- CHOE, S. Y.; KIM, S. J.; KIM, H. G.; et al. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. **Science of the Total Environment**, v. 312, n. 1-3, p. 15–21, 2003.
- CHOI, J. Ecotoxicological Biomonitoring at Different Levels of Biological Organization and Its Application in *Chironomus* spp. **Journals in Environmental Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2005.

CHOI, J.; ROCHE, H.; CAQUET, T. Characterization of superoxide dismutase activity in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae — a potential biomarker. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 124, p. 73–81, 1999.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 200–227, 2004.

Dornfeld, C.B. Utilização de *Chironomus sp* (Diptera, Chironomidae) para a Avaliação da Qualidade de Sedimentos e Contaminação por Metais. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental – Universidade Federal de São Carlos), São Carlos, São Paulo, 2006.

DURAN, M.; MICHAILOVA, P.; SARI, A.; Ilkova, J.; Sen, A.; Karadurmus, E. Assessment of the sediment toxicity in Bulgarian and Turkish Rivers using the biomarkers in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae). **Acta Zoologica Bulgarica**, v. 64, n. Suppl. 4, p. 167–173, 2012.

ELLIOTT, B. M.; MACKAY, J. M.; CLAY, P.; ASHBY, J. An assessment of the genetic toxicology of antimony trioxide. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 415, n. 1-2, p. 109–117, 1998.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

FELTON, G. W.; SUMMERS, C. B. Antioxidant systems in insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 29, n. 2, p. 187–197, 1995.

FILELLA, M.; BELZILE, N.; CHEN, Y. W. Antimony in the environment: A review focused on natural waters I. Occurrence. **Earth-Science Reviews**, v. 57, n. 1-2, p. 125–176, 2002.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. **Biomolecular Engineering**, v. 23, n. 4, p. 149–169, 2006.

GEBEL, T. Aresnic and antimony: Comparative approach on mechanistic toxicology. **Chemico-Biological Interactions**, v. 107, n. 3, p. 131–144, 1997.

GEBEL, T.; CHRISTENSEN, S.; DUNKELBERG, H. Comparative and environmental genotoxicity of antimony and arsenic. **Anticancer research**, v. 17, n. 4A, p. 2603–7, 1997.

GILLE, G.; SIGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 131–52, 1995.

HAHN, N. S.; FUGI, R. Alimentação de peixes em reservatórios brasileiros: alterações e consequências nos estágios iniciais do represamento. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n.4, p.469-480. 2007.

HERRERO, O.; PLANELLÓ, R.; AQUILINO, M.; MORCILLO, G. Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius* (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad. **Revista de Toxicología**, v. 31, p. 176–186, 2014.

HAHN, T.; SCHULZ, R. Ecdysteroid synthesis and imaginal disc development in the midge *Chironomus riparius* as biomarkers for endocrine effects of tributyltin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 1052–1057, 2002.

HEIJERICK, D., AND M. VANGHELUWE (International Antimony Association. Analysis of the result of 28 days – Chronic sediment test with Midge *Chironomus riparius* using $SbCl_3$ as test substance. Laboratory of Environmental Toxicology, Ghent University. Brussels, Belgium. 2005.

HERRERO, Ó.; PLANELLÓ, R.; MORCILLO, G. Chemosphere The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy metabolism, and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. **Chemosphere**, v. 128, p. 266–277, 2015b.

HEXT, P. M.; PINTO, P. J.; RIMMEL, B. A. Subchronic feeding study of antimony trioxide in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 205–209, 1999. John

HUANG, H.; SHU, S. C.; SHIH, J. H.; KUO, C. J.; CHIU, I. D. Antimony trichloride induces DNA damage and apoptosis in mammalian cells. **Toxicology**, v. 129, n. 2-3, p. 113–123, 1998.

HUSSAIN, S. A.; JANE, D. E.; TABERNER, P. V. Lack of inhibition of human plasma cholinesterase and red cell acetylcholinesterase by antimony compounds including stibine. **Human & Experimental Toxicology**, v. 17, p. 140–144, 1998.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207–221, 2008.

JIANG, X.; AN, Z.; LU, C.; et al. The protective role of Nrf2-Gadd45b against antimony-induced oxidative stress and apoptosis in HEK293 cells. **Toxicology Letters**, v. 256, p. 11–18, 2016.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **Mammalian Mutagenicity**. v. 3, p. 103-105, 1995.

KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T.; SIMINI, M.; et al. Toxicity benchmarks for antimony, barium, and beryllium determined using reproduction endpoints for *Folsomia candida*, *Eisenia fetida*, and *Enchytraeus crypticus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 754–762, 2006.

LASZCZYCA, P.; AUGUSTYNIAK, M.; BABCZYŃSKA, A.; BEDNARSKA, K.; KAFEL A.; MIGULA, P.; WILCZEK, G.; Witas, I. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). **Environment International**, v. 30, n. 7, p. 901–910, 2004.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 544, n. 1, p. 43–64, 2003.

LEE, S. W.; CHOI, J. Multi-level ecotoxicity assay on the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) exposed to octachlorostyrene. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 269–274, 2009.

LEE, S.-B.; CHOI, J. Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instarlarvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 11, p. 3006–3014, 2006.

LEE, S.-B.; CHOI, J. Effects of bisphenol A and ethynyl estradiol exposure on enzyme activities, growth and development in the fourth instarlarvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, n. 1, p. 84–90, 2007.

LEE, S.-M.; LEE, S.-B.; PARK, C.-H.; CHOI, J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, n. 6, p. 1074–1081, 2006.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011. Elsevier B.V.

MARINKOVIĆ, M.; VERWEIJ, R. A.; NUMMERDOR, G. A.; et al. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to compounds with different modes of action. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 4, p. 1645–51, 2011.

MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 437–449, 2012.

MORAIS, S.; PESENTI, E. C.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 323–328, 2014.

NAM, S. H.; YANG, C. Y.; AN, Y. J. Effects of antimony on aquatic organisms (Larva and embryo of *Oryzias latipes*, *Moina macrocopa*, *Simocephalus mixtus*, and *Pseudokirchneriella subcapitata*). **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 889–893, 2009.

NICACIO, G.; JUEN, L. Chironomids as indicators in freshwater ecosystems: An assessment of the literature. **Insect Conservation and Diversity**, v. 8, n. 5, p. 393–403, 2015.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 469–484, 2009.

OBERHOLSTER, P. J.; MUSEE, N.; BOTHA, A. M.; et al. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 416–423, 2011.

OBERHOLSTER, P. J.; MUSEE, N.; BOTHA, A. M.; et al. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 416–423, 2011b.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals, p. 1–21, 2004. Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals>. Acesso em: 20/08/2014

PALACIO-CORTÉS, A. M.; SIGNORINI-SOUZA, I. DE L.; YOSHIO HARA, E. L.; et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) effects on *Chironomus sancticaroli* larvae after short-term exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 308–315, 2017.

PAVLOV, D. F. Stress induced dynamics of fish brain acetylcholineesterase activity. Institute of Biology of Inland Waters. 1996.

PINCHUK, I.; SHOVAL, H.; DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, n. 6, p. 638–647, 2012.

POON, R.; CHU, I. Effects of trivalent antimony on human erythrocyte glutathione-S-transferases. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 14, n. 3, p. 169–176, 2000.

QU, R.; FENG, M.; SUN, P.; WANG, Z. A Comparative Study on Antioxidant Status Combined with Integrated Biomarker Response in *Carassius auratus* Fish Exposed to Nine Phthalates. **Environmental toxicology**, p. 1125–1134, 2014.

RAKOTONDRAVELO, M. L.; ANDERSON, T. D.; CHARLTON, R. E.; ZHU, K. Y. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 360–366, 2006.

REBECHI, D.; RICHARDI, V. S.; VICENTINI, M.; et al. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 3, p. 296–301, 2014.

RICHARDI, V. S.; REBECHI, D.; ARANHA, J. M. R.; NAVARRO-SILVA, M. A. Determination of larval instars in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) using novel head capsule structures. **Zoologia**, v. 30, n. 2, p. 211–216, 2013.

RICHETTI, S. K.; ROSEMBERG, D. B.; VENTURA-LIMA, J.; MONSERRAT, J. M.; BOGO, M.R., BONAM, C. D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 1, p. 116–122, 2011.

SCHAUMLÖFFEL, N.; GEBEL, T. Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. **Mutagenesis**, v. 13, n. 3, p. 281–286, 1998.

SEPPERUMAL, U.; SAMINATHAN, S. Antioxidant enzymatic response to Butylbenzylphthalate exposures in a fresh water fish *Oreochromis mossambicus*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v. 3, n. 4, p. 1007–1013, 2014.

SERVIA, M. J.; PÉRY, A. R. R.; HEYDORFF, M.; GARRIC, J.; LAGADIC, L. Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 3, p. 229–240, 2006.

SIBLEY, P. K.; BENOIT, D. A.; ANKLEY, G. T. The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: Relationship to reproduction and demographic endpoints. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 336–345, 1997.

SILVA DE ASSIS, H. C. Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen. Ph.D. Thesis, University of Berlin, Berlin, Germany, 1998.

STRIXINO, T. S. 1980. Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sabcarlensis* sp. n. (Diptera: Chironomidae). Tese de doutorado (Universidade Federal de São Carlos), São Paulo.

STRIXINO, T. & G. STRIXINO. 1982. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, n. 2, p. 183-189.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.

TAKAHASHI, S.; SATO, H.; KUBOTA, Y.; et al. Inhibition of DNA-double strand break repair by antimony compounds. **Toxicology**, v. 180, n. 3, p. 249–256, 2002.

VALLE, D.; MONTELLA, I. R. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Brasil. **Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 1, p. 128, 2006.

VICENTINI, M.; MORAIS, G. S.; REBECCHI-BAGGIO, D. R.; RICHARDI, V. S.; SANTOS, G. S.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. Benzo (a) pyrene Exposure Causes Genotoxic and Biochemical Changes in the Midge Larvae of *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). **Neotropical Entomology**, 2017.

WAAIJERS, S. L.; HARTMANN, J.; SOETER, A. M.; et al. Toxicity of new generation flame retardants to *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 463-464, p. 1042–1048, 2013.

WHO. Antimony in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, p. 1–9, 2003.

YANG, J. Comparative acute toxicity of gallium (III), antimony (III), indium (III), cadmium (II), and copper (II) on freshwater swamp shrimp (*Macrobrachium nipponense*), p. 2–5, 2014.

CONCLUSÕES

A determinação dos efeitos do butil benzil ftalato e antimônio sobre *C. sancticaroli* demonstrou que ambos são tóxicos para *C. sancticaroli*, em exposição aguda e crônica. A avaliação da toxicidade do BBP e Sb em diferentes níveis de organização biológica demonstrou que estes poluentes provocam efeitos do nível molecular ao populacional.

O BBP e Sb apresentaram potencial genotóxico em exposição aguda e crônica, sendo que o BBP apresentou maior toxicidade em longo período de exposição, sugerindo estresse oxidativo. Entretanto, para o Sb o mecanismo de toxicidade ao DNA não é bem conhecido, necessitando de novos estudos.

Os marcadores bioquímicos indicam que o BBP possui potencial neurotóxico, altera a via de desintoxicação e de defesa ao estresse oxidativo e não provoca danos de peroxidação lipídica em exposição aguda. Em exposição de oito dias, o BBP altera a via de desintoxicação e de defesa ao estresse oxidativo, não provocando danos de peroxidação lipídica. Para o Sb efeito neurotóxico foi observado em exposição aguda (0,8 mg.l⁻¹). A via de biotransformação e de defesa ao estresse oxidativo apresentaram alterações em exposição aguda e crônica, enquanto que danos de peroxidação lipídica foram observados apenas em exposição crônica (0,001 mg.l⁻¹, 0,005 mg.l⁻¹).

As avaliações dos parâmetros biológicos evidenciaram que o BBP e o Sb atuam sobre o desenvolvimento das larvas de *C. sancticaroli*, ocasionando a emergência de machos menores em exposição ao BBP e machos e fêmeas menores em exposição ao Sb. O BBP apresentou efeitos mais severos sobre a emergência não ocorrendo adultos nas concentrações mais elevadas. Para o Sb foi observado queda da fecundidade potencial das fêmeas. Esses dados indicam que o BBP e o Sb afetam *C. sancticaroli* em níveis elevados de organização biológica. Dessa forma, em ambientes impactados pelo BBP e Sb gera redução do sucesso reprodutivo da espécie, ocasionando redução da densidade populacional, ocasionando a dinâmica ambiental, já que os Chironomidae são importantes na ciclagem de nutrientes, degradação da matéria orgânica e servem de alimento para diferentes espécies de peixes.

A determinação das concentrações reais de antimônio permitiu estabelecer que o metalóide ocasiona efeitos em concentrações iguais ou abaixo do limite estabelecido pelo CONAMA (2005) de 0,005 mg.L⁻¹, para água doce superficial, principalmente sobre o desenvolvimento indicando a necessidade dos limites apontados há aproximadamente 13 anos.

O antimônio ocasionou efeitos tóxicos em concentrações iguais ou abaixo do limite de 0,005 mg.L estabelecido pelo CONAMA (2005)

A avaliação em diferentes níveis de organização biológica foi relevante no estudo da toxicidade do BBP e de Sb, indicando a necessidade de utilização novos biomarcadores no estudo da toxicidade desses poluentes, como os danos ao DNA, e atividade da AChE, EST- α , EST- β .

Os resultados apresentados tiveram como objetivo integrar os efeitos em diferentes níveis de organização biológica, apontando a elevada toxicidade desses poluentes, podendo gerar elevado impacto sobre os corpos de água.

REFERÊNCIAS

- ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, v. 306, n. 1-2, p. 1–17, 2001.
- AHMAD, M.; LEE, S. S.; LIM, J. E.; et al. Speciation and phytoavailability of lead and antimony in a small arms range soil amended with mussel shell, cow bone and biochar: EXAFS spectroscopy and chemical extractions. **Chemosphere**, v. 95, p. 433–441, 2014.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 636, p. 154–171, 2008.
- ARAMBOUROU, H.; BEISEL, J. N.; BRANCHU, P.; DEBAT, V. Exposure to sediments from polluted rivers has limited phenotypic effects on larvae and adults of *Chironomus riparius*. **Science of the Total Environment**, v. 484, n. 1, p. 92–101, 2014.
- AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholinesterase activity to behaviour. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1210–1215, 2011.
- AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M. Behaviour and growth of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) under imidacloprid pulse and constant exposure scenarios. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 219, n. 1-4, p. 215–224, 2011.
- BAINY, A.; MEDEIROS, M.; MASCIO, P. DI; ALMEIDA, E. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. **Biotemas**, v. 19, n. 1, p. 35–39, 2006.
- BARRERA, M. C.; ROJAS, L. J.; WEISS, A.; et al. Profiling gene expression of antimony response genes in *Leishmania (Viannia) panamensis* and infected macrophages and its relationship with drug susceptibility. **ActaTropica**, v. 176, p. 355-363 2017.
- BENSON, R. Hazard to the developing male reproductive system from cumulative exposure to phthalate esters—dibutyl phthalate, diisobutyl phthalate, butylbenzyl phthalate, diethylhexyl phthalate, dipentyl phthalate, and diisononyl phthalate. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 90–101, 2009.
- BILA, MAIA D.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.
- BOECK, M. DE; KIRSCH-VOLDERS, M.; LISON, D. Cobalt and antimony: Genotoxicity and carcinogenicity. **Mutation Research**, v. 533, n. 1-2, p. 135–152, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- CALLISTO, M.; ESTEVES, F. D. A. Biomonitoramento da macrofauna bentônica de Chironomidae (Diptera) em dois igarapés amazônicos sob influência das atividades de uma mineração de bauxita. **Oecologia Brasiliensis**, 1998.

- CAMPOS, D.; GRAVATO, C.; QUINTANEIRO, C.; SOARES, A. M. V. M.; PESTANA, J. L. T. Responses of the aquatic midge *Chironomus riparius* to DEET exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 172, p. 80–85, 2016.
- CAREW, M. E.; PETTIGROVE, V. J.; METZELING, L.; HOFFMANN, A. A. Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. **Frontiers in Zoology**, v. 10, n. 1, p. 45, 2013.
- CAVALLO, D.; IAVICOLI, I.; SETINI, A.; et al. Genotoxic risk and oxidative DNA damage in workers exposed to antimony trioxide. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 40, n. 3, p. 184–189, 2002.
- CHOE, S. Y.; KIM, S. J.; KIM, H. G.; et al. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. **Science of the Total Environment**, v. 312, n. 1-3, p. 15–21, 2003.
- CHOI, J. Ecotoxicological Biomonitoring at Different Levels of Biological Organization and Its Application in *Chironomus* spp. **Journals in Environmental Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2005.
- CHOI, J.; ROCHE, H.; CAQUET, T. Characterization of superoxide dismutase activity in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae — a potential biomarker. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 124, p. 73–81, 1999.
- CHOI, J.; ROCHE, H.; CAQUET, T. Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* mg. (diptera, chironomidae) larvae: Potential biomarkers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 495–500, 2000.
- CORBI, J. J.; S. T. STRIXINO. Ciclo de Vida de Duas Espécies de Goeldichironomus (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 1, p. 72-75.
- CRANSTON, P. The Cironomidae: The biology and ecology of non-biting midges. In: Armitage, P., P. S. Cranston & L. C. V. Pinder (Ed.). *The Cironomidae: The biology and ecology of non-biting midges*. London: Chapman & Hall. 1995.
- CRANE, M.; SILDANCHANDRA, W.; KHEIR, R.; CALLAGHAN, A. Relationship between biomarker activity and developmental endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 361–369, 2002.
- DATKHILE, K. D.; MUKHOPADHYAYA, R.; DONGRE, T. K.; NATH, B. B. Increased level of superoxide dismutase (SOD) activity in larvae of *Chironomus ramosus* (Diptera: Chironomidae) subjected to ionizing radiation. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 4, p. 500–506, 2009.
- DAY, K. E.; SCOTT, I. M. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. **Aquatic Toxicology**, v. 18, n. 2, p. 101–113, 1990.
- DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 200–227, 2004.

- DURAN, M.; MICHAILOVA, P.; SARI, A.; Ilkova, J.; Sen, A.; Karadurmus, E. Assessment of the sediment toxicity in Bulgarian and Turkish Rivers using the biomarkers in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae). **Acta Zoologica Bulgarica**, v. 64, n. Suppl. 4, p. 167–173, 2012.
- ELLIOTT, B. M.; MACKAY, J. M.; CLAY, P.; ASHBY, J. An assessment of the genetic toxicology of antimony trioxide. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 415, n. 1-2, p. 109–117, 1998.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.
- EMA, M.; MIYAWAKI, E. Effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzyl phthalate during late pregnancy. **Reproductive Toxicology**, v. 16, p. 71–76, 2002.
- EMA, M.; MURAI, T.; ITAMI, T.; KAWASAKI, H. Evaluation of the teratogenic potential of the plasticizer butyl benzyl phthalate in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 10, n. 5, p. 339–343, 1990.
- ERKEKOGLU, P.; KOCER-GUMUSEL, B. Genotoxicity of phthalates. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, n. 9, p. 616–626, 2014.
- FELTON, G. W.; SUMMERS, C. B. Antioxidant systems in insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 29, n. 2, p. 187–197, 1995.
- FILELLA, M.; BELZILE, N.; CHEN, Y. W. Antimony in the environment: A review focused on natural waters I. Occurrence. **Earth-Science Reviews**, v. 57, n. 1-2, p. 125–176, 2002.
- FOSTER, P. M. D. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, p. 140–147, 2006.
- FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. **Biomolecular Engineering**, v. 23, n. 4, p. 149–169, 2006.
- GEBEL, T. Aresnic and antimony: Comparative approach on mechanistic toxicology. **Chemico-Biological Interactions**, v. 107, n. 3, p. 131–144, 1997.
- GEBEL, T.; CHRISTENSEN, S.; DUNKELBERG, H. Comparative and environmental genotoxicity of antimony and arsenic. **Anticancer research**, v. 17, n. 4A, p. 2603–7, 1997.
- GILLE, G.; SIGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 131–52, 1995.
- HAHN, N. S.; FUGI, R. Alimentação de peixes em reservatórios brasileiros: alterações e consequências nos estágios iniciais do represamento. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n.4, p.469 - 480. 2007.

HAHN, T.; SCHULZ, R. Ecdysteroid synthesis and imaginal disc development in the midge *Chironomus riparius* as biomarkers for endocrine effects of tributyltin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 1052–1057, 2002.

HE, M.; YANG, C.; GENG, R.; et al. Monitoring of phthalates in foodstuffs using gas purge microsyringe extraction coupled with GC-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 879, p. 63–68, 2015.

HERRERO, O.; PLANELLÓ, R.; AQUILINO, M.; MORCILLO, G. Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius* (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad. **Revista de Toxicología**, v. 31, p. 176–186, 2014.

HERRERO, Ó.; PLANELLÓ, R.; MORCILLO, G. Chemosphere The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy metabolism, and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. **Chemosphere**, v. 128, p. 266–277, 2015a.

HERRERO, Ó.; PLANELLÓ, R.; MORCILLO, G. The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy metabolism, and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. **Chemosphere**, v. 128, p. 266–277, 2015b.

HEXT, P. M.; PINTO, P. J.; RIMMEL, B. A. Subchronic feeding study of antimony trioxide in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 205–209, 1999. John Wiley & Sons, Ltd.

HORN, O.; NALLI, S.; COOPER, D.; NICELL, J. Plasticizer metabolites in the environment. **Water Research**, v. 38, p. 3693–3698, 2004.

HUANG, H.; SHU, S. C.; SHIH, J. H.; KUO, C. J.; CHIU, I. D. Antimony trichloride induces DNA damage and apoptosis in mammalian cells. **Toxicology**, v. 129, n. 2-3, p. 113–123, 1998.

HUSSAIN, S. A.; JANE, D. E.; TABERNER, P. V. Lack of inhibition of human plasma cholinesterase and red cell acetylcholinesterase by antimony compounds including stibine. **Human & Experimental Toxicology**, v. 17, p. 140–144, 1998.

IKELE, C. B.; MGBENKA, B. O.; OLUAH, N. S. Histopathological effects of diethyl phthalate *Clarias Gariepinus juveniles*. **Animal Research International**, v. 8, n.3, p. 1431-1438, 2016.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207–221, 2008.

JIANG, X.; AN, Z.; LU, C.; et al. The protective role of Nrf2-Gadd45b against antimony-induced oxidative stress and apoptosis in HEK293 cells. **Toxicology Letters**, v. 256, p. 11–18, 2016.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **Mammalian Mutagenicity**, v. 3, p. 103-105, 1995.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 10, p. 5751–5754, 1982.

KRANZFELDER, P.; FERRINGTON, L. C. Temporal and spatial variability of Chironomidae (Diptera) species emergence in a Neotropical estuary. **Freshwater Science**, v. 35, n. 2, p. 631–643, 2016.

KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T.; SIMINI, M.; et al. Toxicity benchmarks for antimony, barium, and beryllium determined using reproduction endpoints for *Folsomia candida*, *Eisenia fetida*, and *Enchytraeus crypticus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 754–762, 2006.

LAPWORTH, D. J.; BARAN, N.; STUART, M. E.; WARD, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 287–303, 2012.

LASZCZYCA, P.; AUGUSTYNIAK, M.; BABCZYŃSKA, A.; BEDNARSKA, K.; KAFEL A.; MIGULA, P.; WILCZEK, G.; Witas, I. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). **Environment International**, v. 30, n. 7, p. 901–910, 2004.

LAUGHLIN, R. B.; NEFF, J. M.; HRUNG, Y. C.; GOODWIN, T. C.; GIAM, C. S. The effects of three phthalate esters on the larval development of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* (holthuis). Department of Biology. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 72, n.9, p. 323–336, 1978.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 544, n. 1, p. 43–64, 2003.

LEE, S. W.; CHOI, J. Multi-level ecotoxicity assay on the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) exposed to octachlorostyrene. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 269–274, 2009.

LEE, S.-B.; CHOI, J. Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instarlarvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 11, p. 3006–3014, 2006.

LEE, S.-B.; CHOI, J. Effects of bisphenol A and ethynyl estradiol exposure on enzyme activities, growth and development in the fourth instarlarvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, n. 1, p. 84–90, 2007.

LEE, S.-M.; LEE, S.-B.; PARK, C.-H.; CHOI, J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, n. 6, p. 1074–1081, 2006.

LEI, X. G.; ZHU, J.-H.; CHENG, W.-H.; et al. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, 2015.

LIU, D.; PAN, L.; LI, Z.; CAI, Y.; MIAO, J. Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 251–259, 2014.

- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011.
- MANKIDY, R.; WISEMAN, S.; MA, H.; GIESY, J. P. Biological impact of phthalates. **Toxicology Letters**, v. 217, p. 50–58, 2013.
- MARINKOVIĆ, M.; VERWEIJ, R. A.; NUMMERDOR, G. A.; et al. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to compounds with different modes of action. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 4, p. 1645–51, 2011.
- USEPA. Preliminary Materials for the Integrated Risk Information System (IRIS) Toxicological Review of Butyl Benzyl Phthalate (BBP), p. 1–215, 2014.
- MELA, M.; NETO, F. F.; YAMAMOTO, F. Y.; et al. Mercury distribution in target organs and biochemical responses after subchronic and trophic exposure to Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 245–256, 2014.
- MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 437–449, 2012.
- MORAIS, S.; PESENTI, E. C.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sancticaroli* (Diptera : Chironomidae). **Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 323–328, 2014.
- MORALES, M.; PLANELLÓ, R.; MARTÍNEZ-PAZ, P., HERRERO, O.; CORTÉS, E., GUITARTE, J. L. J., MOECILLO, G. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: Expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 153, n. 1, p. 150–158, 2011.
- NAIR, P. M. G.; PARK, S. Y.; LEE, S. W.; CHOI, J. Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 31–37, 2011.
- NAM, S. H.; YANG, C. Y.; AN, Y. J. Effects of antimony on aquatic organisms (Larva and embryo of *Oryzias latipes*, *Moina macrocopa*, *Simocephalus mixtus*, and *Pseudokirchneriella subcapitata*). **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 889–893, 2009.
- NICACIO, G.; JUEN, L. Chironomids as indicators in freshwater ecosystems: An assessment of the literature. **Insect Conservation and Diversity**, v. 8, n. 5, p. 393–403, 2015.
- NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 469–484, 2009.
- NYBOM, I.; ABEL, S.; WAISSI, G.; et al. Effects of Activated Carbon on PCB Bioaccumulation and Biological Responses of *Chironomus riparius* in Full Life Cycle Test. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 252–5260, 2016.
- OBERHOLSTER, P. J.; MUSEE, N.; BOTHA, A. M.; et al. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 416–423, 2011.

- OBERHOLSTER, P. J.; MUSEE, N.; BOTHA, A. M.; et al. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 416–423, 2011.
- OECD. Guidelines for the testing of chemicals. p. 1–21, 2004.
- OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. Endocrine disruption in invertebrates. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 11-12, 2003.
- OTERO, P.; SAHA, S. K.; MOANE, S.; BARON, J., CANCY, G., MURRAY, P. Improved method for rapid detection of phthalates in bottled water by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical**, v. 997, p. 229–235, 2015.
- PALACIO-CORTÉS, A. M.; SIGNORINI-SOUZA, I. DE L.; YOSHIO HARA, E. L.; 1. DISNER, R. G., REBECHI, D. GRASSI, M. T.; CESTARI, M. C.; NAVARRO-SILVA, M. A. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) effects on *Chironomus sancticaroli* larvae after short-term exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 308–315, 2017.
- PARK, K.; KWAK, I. S. Assessment of potential biomarkers, metallothionein and vitellogenin mRNA expressions in various chemically exposed benthic *Chironomus riparius* larvae. **Ocean Science Journal**, v. 47, n. 4, p. 435–444, 2012.
- PARK, K.; KWAK, I.-S. Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. **Chemosphere**, v. 74, p. 89–95, 2008.
- PARK, K.; KWAK, I.-S. Disrupting effects of antibiotic sulfathiazole on developmental process during sensitive life-cycle stage of *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, v. 190, p. 25–34, 2018.
- PARK, S. Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Science Direct**, v. 33, p. 817–822, 2007.
- PARK, S. Y.; 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.
- PAUMEN, M. L.; BORGMAN, E.; KRAAK, M. H. S.; GESTEL, C. A. M. VAN; ADMIRAAL, W. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to polycyclic aromatic compound exposure. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 1, p. 225–232, 2008.
- PAVLOV, D. F. Stress induced dynamics of fish brain acetylcholinesterase activity. 1996.
- PENTTINEN, O.-P.; HOLOPAINEN, I. J. Physiological energetics of a midge, *Chironomus riparius* Meigen (Insecta, Diptera): normoxic heat output over the whole life cycle and response of larva to hypoxia and anoxia. **Oecologia**, v. 103, p. 419–424, 1995.
- PINCHUK, I.; SHOVAL, H.; DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, n. 6, p. 638–647, 2012.

PLANELLÓ, R.; HERRERO, O.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 62–70, 2011.

PLANELLÓ, R.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptors genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. **Science direct**, v. 71, p. 1870–1876, 2008.

POON, R.; CHU, I. Effects of trivalent antimony on human erythrocyte glutathione-S-transferases. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 14, n. 3, p. 169–176, 2000.

QU, R.; FENG, M.; SUN, P.; WANG, Z. A Comparative Study on Antioxidant Status Combined with Integrated Biomarker Response in *Carassius auratus* Fish Exposed to Nine Phthalates. **Environmental toxicology**, p. 1125–1134, 2014.

RAKOTONDRAVELO, M. L.; ANDERSON, T. D.; CHARLTON, R. E.; ZHU, K. Y. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 360–366, 2006.

REBECHI, D.; RICHARDI, V. S.; VICENTINI, M.; et al. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 3, p. 296–301, 2014.

REBECHI-BAGGIO, D.; RICHARDI, V. S.; VICENTINI, M.; et al. Factors that alter the biochemical biomarkers of environmental contamination in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, p. 341–346, 2016.

RICHARDI, V. S.; REBECHI, D.; ARANHA, J. M. R.; NAVARRO-SILVA, M. A. Determination of larval instars in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) using novel head capsule structures. **Zoologia**, v. 30, n. 2, p. 211–216, 2013.

RICHETTI, S. K.; ROSEMBERG, D. B.; VENTURA-LIMA, J.; MONSERATTI, J. M.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 1, p. 116–122, 2011.

RODRIGUES, A. C. M.; GRAVATO, C.; QUINTANEIRO, C.; et al. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 506–513, 2015.

ROH, J.-Y.; JUNG, I.-H.; LEE, J.-Y.; CHOI, J. Toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology**, v. 237, p. 126–133, 2007.

RUSYN, I.; KADIISKA, M. B.; DIKALOVA, A.; KONO, H.; YIN, M.; TSUCHIAYA K.; MASON, R. P.; PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J.; SEGAL, B. H.; HOLLAND, S. M.; THURMAN. Phthalates Rapidly Increase Production of Reactive Oxygen Species in Vivo: Role of Kupffer Cells. **Molecular pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 744–750, 2001.

SANSEVERIANO, A. M.; NESSIMIAN, J. L. Assimetria Flutuante Em Organismos Aquáticos E Sua Aplicação Para Avaliação De Impactos Ambientais. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 382–405, 2008.

SCHAUMLÖFFEL, N.; GEBEL, T. Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. **Mutagenesis**, v. 13, n. 3, p. 281–286, 1998.

SEPPERUMAL, U.; SAMINATHAN, S. Antioxidant enzymatic response to Butylbenzylphthalate exposures in a fresh water fish *Oreochromis mossambicus*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v. 3, n. 4, p. 1007–1013, 2014.

SERVIA, M. J.; PÉRY, A. R. R.; HEYDORFF, M.; GARRIC, J.; LAGADIC, L. Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 3, p. 229–240, 2006.

SHEN, H. Y. Simultaneous screening and determination eight phthalates in plastic products for food use by sonication-assisted extraction/GC-MS methods. **Talanta**, v. 66, n. 3, p. 734–739, 2005.

SIBLEY, P. K.; BENOIT, D. A.; ANKLEY, G. T. The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: Relationship to reproduction and demographic endpoints. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 336–345, 1997.

SILVA DE ASSIS, H. C. Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen. Ph.D. Thesis, University of Berlin, Berlin, Germany, 1998.

STRIXINO, T. S. 1980. Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sabcarlensis* sp. (Diptera: Chironomidae). Tese de doutorado (Universidade Federal de São Carlos), São Paulo.

STRIXINO, T. & G. STRIXINO. 1982. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, n. 2, p. 183–189.

STAPLES, C. A.; ADAMS, W. J.; PARKERTON, T. F.; et al. Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 875–891, 1997.

STAPLES, C. A.; PARKERTON, T. F.; PETERSON, D. R. A risk assessment of selected phthalate esters in North American and Western European surface waters. **Chemosphere**, v. 40, n. 8, p. 885–891, 2000.

STAPLES, C. A.; PETERSON, D. R.; PARKERTON, T. F.; ADAMS, W. J. The environmental fate of phthalate esters: A literature review. **Chemosphere**, v. 35, n. 4, p. 667–749, 1997.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.

TAKAHASHI, S.; SATO, H.; KUBOTA, Y.; et al. Inhibition of DNA-double strand break repair by antimony compounds. **Toxicology**, v. 180, n. 3, p. 249–256, 2002.

US-EPA. I. Phthalates. Teach Chemical Summary, p. 1–25, 2007. Disponível em: <http://epa.gov/teach>. Acesso em: 16/03/2015

US-EPA. United States Environmental Protection Agency. U S environmental Protection Agency, p. 1–16, 2012. Disponível em: <http://epa.gov/teach>. Acesso em: 29/09/2016

VALLE, D.; MONTELLA, I. R. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Brasil. **Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 1, p. 128, 2006.

VICENTINI, M.; MORAIS, G. S.; REBECCHI-BAGGIO, D. R.; RICHARDI, V. S.; SANTOS, G. S.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. Benzo (a) pyrene Exposure Causes Genotoxic and Biochemical Changes in the Midge Larvae of *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). **Neotropical Entomology**, v. 46. n.6, p.658-665. 2017.

VITALI, M.; CREMISINI, C.; GUIDOTTI, M.; MACILENT, G. Phthalate esters in freshwaters as markers of contamination sources- a site study in Italy. **Pergamon Environment International**, v. 23, n. 3, p. 337–347, 1997.

WAAIJERS, S. L.; HARTMANN, J.; SOETER, A. M.; et al. Toxicity of new generation flame retardants to *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 463-464, p. 1042–1048, 2013.

WATTS, M. M.; PASCOE, D.; CARROLL, K. Chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). **Aquatic Toxicology**, v. 55, n. 1-2, p. 113–124, 2001.

WHO. Antimony in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Who, p. 1–9, 2003.

WIEK, A.; LARSON, K. L. Water, People, and Sustainability—A Systems Framework for Analyzing and Assessing Water Governance Regimes. **Water Resources Management**, v. 26, n. 11, p. 3153–3171, 2012. Springer Netherlands.

YANG, J. Comparative acute toxicity of gallium (III), antimony (III), indium (III), cadmium (II), and copper (II) on freshwater swamp shrimp (*Macrobrachium nipponense*). **Biological Research**, v.47, n.13. 2014.

YEAP, H. L.; ENDERSBY, N. M.; JOHNSON, P. H.; RITCHIE, S. A.; HOFFMANN, A. A. Body size and wing shape measurements as quality indicators of *Aedes aegypti* mosquitoes destined for field release. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 1, p. 78–92, 2013. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.

ZHANG, C.; YANG, X.; ZHEN, H.; ZHONG, Q.; GUO, J.; HU, X. J.; XIONG, L.; LIU, D. Influence of BBP exposure on nervous system and antioxidant system in zebrafish. **Ecotoxicology**, v. 23, p. 1854–1857, 2014.