

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**Avaliação de enzimas detoxificantes após tratamento
subcrônico com imidacloprido em ratos wistar**

Nícolas Guimarães dos Santos

Porto Alegre 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Nícolas Guimarães dos Santos

**Avaliação de enzimas detoxificantes após tratamento
subcrônico com imidacloprido em ratos wistar**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul como requisito à obtenção do grau de
Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Arbo

Porto Alegre, 2023

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	04
LISTA DE ABREVIATURAS	05
RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
1 Introdução	08
1.1 Agrotóxico.....	08
1.2 Imidacloprido.....	09
2 Materiais e Métodos.....	11
2.1 Animais	11
2.2 Tratamento	11
2.3 Eutanásia	11
2.4 Dosagem de proteínas totais (Método de Lowry).....	12
2.5 Atividade enzimática da Glutathione S-Transferase (GST)	12
2.6 Atividade enzimática da Catalase (CAT)	12
2.7 Atividade enzimática da Glutathione Peroxidase (GPx).....	12
2.8 Análise estatística	12
3 Resultados	13
3.1 Glutathione S-Transferase (GST).....	13
3.2 Catalase (CAT).....	13
3.3 Glutathione Peroxidase (GPx)	14
4 Discussão.....	15
5 Conclusão.....	16
6 Referência	17
7 Carta de aprovação.....	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do imidacloprido	09
Figura 2 – Níveis de GST após 45 dias de tratamento subcrônico com imidacloprido	13
Figura 3 – Níveis de CAT no sangue total avaliados após tratamento subcrônico de 45 dias com imidacloprido	14
Figura 4 – Atividade da GPx em sangue total avaliados após tratamento subcrônico de 45 dias com imidacloprido	14

LISTA DE ABREVIATURAS

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

CREAL - Centro de Reprodução e Experimentação de Animal de Laboratório

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

GSH - Glutathiona reduzida

GST – Glutathiona s-transferase

CAT – Catalase

GPx – Glutathiona peroxidase

IMI – Imidacloprido

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GSSG – Glutathiona oxidada

RESUMO

Os neonicotinóides estão na lista dos inseticidas mais comercializados no mundo, são vendidos em mais de 120 países e estão entre os inseticidas mais eficazes para o controle de insetos devido a sua seletividade. O imidacloprido (IMI), principal representante deste grupo químico, tem ação agonista em receptores nicotínicos de acetilcolina pós-sinápticos, essa ação agonista causa a abertura dos canais de sódio, o que gera uma hiperexcitação nas membranas neuronais, provoca paralisias e posteriormente a morte dos insetos. No entanto, estudos realizados com IMI demonstraram a existência de toxicidade em peixes, aves e mamíferos, ou seja, pode apresentar algum risco a espécies não-alvo. Tendo em vista essa toxicidade, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade de enzimas detoxificantes após tratamento subcrônico com imidacloprido em ratos wistar. Para isto, foram utilizados ratos wistar, machos, adultos (n=10 animais/grupo). O grupo controle recebeu água destilada, os demais grupos foram tratados respectivamente com 1,5, 5 e 15 mg/kg de IMI por via oral durante 45 dias. Após eutanásia, o sangue total com heparina foi coletado da veia cava para quantificação das atividades das enzimas catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona s-transferase (GST). Foi observado aumento significativo da atividade da CAT ($p < 0,05$, ANOVA/Bonferroni), já as demais enzimas não apresentaram diferença significativa na atividade. Sendo assim, o tratamento subcrônico com IMI alterou as defesas antioxidantes dos animais, entretanto mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos relacionados ao estresse oxidativo causado pelo IMI.

PALAVRAS-CHAVE: neonicotinoide; imidacloprido; ratos; CAT.

ABSTRACT

Neonicotinoids are on the list of the most commercialized insecticides in the world, they are sold in more than 120 countries and are among the most effective insecticides for insect control due to their selectivity. Imidacloprid (IMI), the main representative of this chemical group, has an agonist action on postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors, which induces the opening of sodium channels, leading to hiperexcitation of neuronal membranes, paralysis and, finally, insect death. However, studies carried out with IMI registered the existence of toxicity in fish, birds and mammals, therefore, it may present some risk to non-target species. In view of this toxicity, the present study aimed to evaluate the activity of detoxifying enzymes after subchronic treatment with IMI in wistar rats. For this, adult male Wistar rats (n=10 animals/group) were used. The control group received distilled water, the other groups were treated respectively with 1.5, 5 and 15 mg/kg of IMI orally for 45 days. After euthanasia, whole blood with heparin was collected from the vena cava to quantify the activities of the enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione s-transferase (GST). A significant increase in CAT activity was observed ($p<0.05$, ANOVA/Bonferroni), the other enzymes did not show a significant difference in activity. Therefore, subchronic treatment with IMI altered the antioxidant defenses of animals, however more studies are needed to elucidate the treatment related to oxidative stress caused by IMI.

KEYWORDS: neonicotinoid; imidacloprid; rats; CAT.

1. Introdução

1.1. Agrotóxicos

Os agrotóxicos são compostos químicos utilizados pela agricultura para eliminar, repelir ou controlar organismos que possam trazer prejuízos para a produção de alimentos (Gomez et al. 2020). Do ponto de vista econômico, o uso de agrotóxicos baseia-se no aumento da produção do cultivo, melhoria na qualidade da produção e a redução do custo em mão-de-obra e energia (QUEIROZ e SILVA, 2021). No Brasil, em 2021, foram comercializadas aproximadamente 719,5 mil toneladas de ingredientes ativos, o que confere um aumento de 5,03% em relação ao ano de 2020, em que foram comercializadas 686,35 mil toneladas segundo relatório do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (“Relatórios de comercialização de agrotóxicos”, [s.d.]).

A comercialização no estado do Rio Grande do Sul representa aproximadamente 10,6% deste total, correspondendo a 76.081,85 toneladas. As classes de agrotóxicos com maior comercialização no estado são herbicidas, representando 61,7% do total, seguidos por fungicidas com 19,03% e inseticidas com 10,8% (“Relatórios de comercialização de agrotóxicos”, [s.d.]). Entre os agrotóxicos com aplicação inseticida, os neonicotinóides são os inseticidas sintéticos que tem sido extensivamente utilizados na agricultura para proteger cultivos contra ataques de insetos e parasitas (BASS e FIELD, 2018). Os neonicotinoides são aplicados para diferentes fins, abrangendo a agricultura, horticultura, silvicultura, piscicultura, fruticultura e medicina veterinária (NAUEN et al., 2008; SIMON-DELSO et al., 2015).

Atualmente, os neonicotinoides são comercializados em mais de 120 países e estão entre os inseticidas mais eficazes para o controle de insetos no mundo. Estão disponíveis no mercado alguns compostos como: imidacloprido (IMI), principal representante deste grupo químico que foi comercializado cerca de 9.026,25 toneladas, tiametoxam 4.173,93 toneladas, acetamiprido 3.554,9 toneladas, clotianidina 753,94 toneladas, no Brasil em 2021, entre outros. Esses agrotóxicos estão sendo cada vez mais utilizados em relação a outros inseticidas, como os organofosforados e carbamatos, os quais, nos últimos anos, tem apresentado diminuição da eficácia devido à maior resistência dos organismos-alvo (BASS, et al., 2015). No Brasil, em 2021, as vendas de inseticida representaram 129.457,26 toneladas de ingredientes ativos. No ano de 2020, o IMI foi o nono ingrediente ativo de agrotóxico mais comercializado no país com o total de vendas de 9.401,65 toneladas, representando 6,97% desse montante (IBAMA, 2020).

1.2. Imidacloprido

O IMI [1-(6-cloro-3-piridinilmetil)-N-nitroimidazolidim-2-ilideneamino] (Fig.1), foi descoberto por Shinzo Kagabu (TOMIZAWA & CASIDA, 2011) e lançado no mercado na década de 1990, sendo o primeiro agrotóxico neonicotinoide registrado na United States Environmental Protection Agency (US EPA) (MIKOLIĆ, KARAČONJI, 2018). Apresenta número CAS 138261-41-3 e classificação toxicológica de classe III, se enquadrando como produto perigoso ao meio ambiente. (“I13 - Imidacloprido — Português (Brasil)”, [s.d.]

Dispõe de uso permitido em diversos cultivos no Brasil, como abacaxi, alface, arroz, banana, batata, brócolis, cenoura, feijão, fumo, tomate, soja, milho, trigo entre outros, tendo diversas modalidades de aplicações como em sementes, foliar (muda), solo e tronco (ANVISA, 2022). O IMI tem relativamente baixo tempo de meia-vida no solo variando de 40 a 997 dias com alta atividade inseticida em uma taxa de aplicação muito baixa (HOPWOOD et al. 2012). Apesar da sua elevada utilização no território nacional, o IMI apresentou em diversos estudos alta toxicidade a organismos não-alvo como minhocas e abelhas (“Perfil Ambiental - Imidacloprido - 02_10_2019.pdf”, [s.d.]). Devido a possível relação com a mortalidade elevada de abelhas e do Distúrbio de Colapso de Colônia, o IMI foi proibido em países da Europa como Itália, Alemanha e França (HENRY et al., 2012; BÚRIGO et al., 2015).

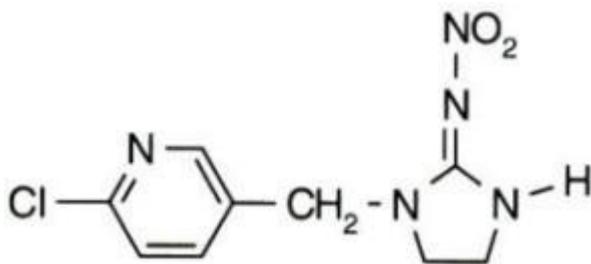


Figura 1: Fórmula estrutural do imidacloprido (IMI). Fonte: ANVISA, 2022

O IMI é agonista de receptores nicotínicos de acetilcolina pós-sinápticos (nAChRs) (TOMIZAWA & YAMAMOTO, 1995; TOMIZAWA & CASIDA, 2003, 2005, 2011), essa ação agonista ocasiona abertura dos canais de sódio induzida por IMI, ocasionando uma hiperexcitação nas membranas neuronais, causando paralisias e posteriormente a morte dos insetos (SIMON-DELISO et al., 2015). Os neonicotinoides possuem alta seletividade por nAChRs de insetos comparado com de mamíferos e toxicidade relativamente baixa para vertebrados, essa seletividade se explica pela diferença de estrutura e propriedades das subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina pós-sinápticos em espécies-alvo (NAUEN et al. 1999; LANSDELL E MILLAR 2000; MATSUDA et al., 2001; TOMIZAWA E CASIDA, 2003, 2005). Além disso, a seletividade do IMI por receptores de insetos é ainda maior do que outras classes de agrotóxicos como por exemplo metilcarbamatos, organofosforados e organoclorados. Há relatos de toxicidade relativamente baixa em mamíferos, demonstrando uma significativa margem de segurança (TOMIZAWA & CASIDA, 2005; SHEETS, 2010), devido a sua baixa penetração pela barreira

hematoencefálica de mamíferos (YAMAMOTO et al., 1995; SHEETS, 2010).

No entanto, estudos a longo prazo realizados com IMI demonstraram a existência de toxicidade em animais, tais como peixes-zebra (CROSBY et al., 2015), lagartos (WANG et al., 2018), frango de postura (KAMMON et al., 2010), pequenas aves como codornas (OSMAN et al., 2023), camundongos (ARFAT et al., 2014) e ratos (KAPOOR et al., 2014; LONARE et al., 2014; AHMED e NASR, 2015; MAHAJAN et al., 2018; TONIETTO et al., 2021). Há ainda relatos de intoxicação em seres humanos em razão de exposição ocupacional (AGARWAL & SRINIVAS, 2007) e por tentativas de suicídio (SHADNIA & MOGHADDAM, 2008; RH, 2017).

Durante o processo de metabolização de xenobióticos pode haver geração de diversos radicais livres, que atuam como mediadores oxidativos ou redutores de reações biológicas. A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção dos mesmos (BARBOSA, 2010).

O sistema detoxificante é composto por enzimas endógenas e compostos exógenos, divididos como enzimáticos e não enzimáticos, compreendendo compostos como GST, GPx e CAT. Sendo assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o comportamento das defesas detoxificantes endógenas frente a este xenobiótico, a fim de elucidar a toxicidade para seres não-alvo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos (60 dias) provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animal de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL – UFRGS). Os animais foram alojados no biotério do CREAL, situado no Campus do Vale – UFRGS, em ambiente de temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade monitorada, com livre acesso a água e alimento e com ciclo claro/escuro de 12h (7h – 19h). Este projeto foi aprovado pelo CEUA/UFRGS em novembro de 2019 sob o número 37572. Os animais foram mantidos em caixa moradia de polipropileno com as dimensões de 40cm x 33cm x 17,8 cm de altura, cobertas por tampas elevadas de arame de ferro carbono perfilado, com tratamento de zincagem e eletropolimento. Cada gaiola alojou até 3 ratos, de acordo com as especificações da Resolução Normativa (RN) N° 15 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.2. Tratamento

Para o tratamento foi utilizado o agrotóxico Much 600®, um inseticida no qual o princípio ativo é o IMI. As doses de IMI foram preparadas semanalmente e calculadas para administração por 45 dias consecutivos. Os protocolos foram baseados no teste de toxicidade oral após doses repetidas da Organization for Economic Cooperation & Development (OECD, 1995). A definição das doses foi baseada na NOEL (No Observed Effect Level) do IMI que é 16,9 mg/kg (MAHAJAN et al, 2018). Os grupos experimentais foram constituídos de 10 animais e divididos em: controle, que recebeu água destilada, e três grupos experimentais que foram tratados respectivamente com 1,5, 5 e 15 mg/kg de IMI por via oral durante 45 dias.

2.3. Eutanásia

Os animais foram eutanasiados no 45º dia após os tratamentos por meio de anestesia com injeção intraperitoneal da associação de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e exsanguinação. O sangue total foi coletado através da punção da veia cava em tubos contendo EDTA como anticoagulante.

2.4. Dosagem de proteínas totais

As proteínas totais foram dosadas pelo método de Lowry, (1951). O método é baseado nas ligações das proteínas com os íons cobre (Cu^{2+}) formando uma cor azul.

2.5. Atividade enzimática da glutathiona S-transferase (GST)

A atividade da glutathiona S-transferase (GST) foi determinada no sangue total de acordo com o método descrito por Habig et al. (1974), a 340 nm durante 5 min a 37°C com medições a cada 20 segundos. O resultado foi expresso em U/mg de proteína.

2.6. Atividade enzimática da catalase (CAT)

A atividade enzimática da catalase (CAT) foi medida em sangue total de acordo com Aebi (1984). Este método é baseado na decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de CAT a 240 nm durante 5 min com leituras a cada 20 segundos a 37°C. O resultado foi expresso em U/mg de proteína.

2.7. Atividade enzimática da glutathiona peroxidase (GPx)

Glutathiona peroxidase (GPx) é o nome geral para uma família de diversas isoenzimas que catalisam a redução de H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos a água ou álcoois correspondentes usando glutathiona reduzida (GSH) como um doador de elétrons ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$) (Margis R et al., 2008). A atividade da GPx foi determinada em sangue total de acordo com o método descrito por Paglia e Valentine (1967) a 360 nm por 6 min a 37°C com leituras a cada 20 segundos. O resultado foi expresso em μmol de NADPH/min/mg de proteína.

2.8. Análise estatística

As variáveis foram expressas como média \pm erro padrão da média e analisadas com teste de análise de variância de uma via (ANOVA), seguidos do pós-teste de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas prevendo um nível de significância mínimo de 5%. As análises foram realizadas no programa GraphPad versão 5.0 para Windows.

3. Resultados

3.1. Glutathione S-transferase (GST)

Não foi verificada diferença significativa na atividade da GST nos animais tratados com IMI quando comparado ao grupo controle, como mostrado na figura 2.

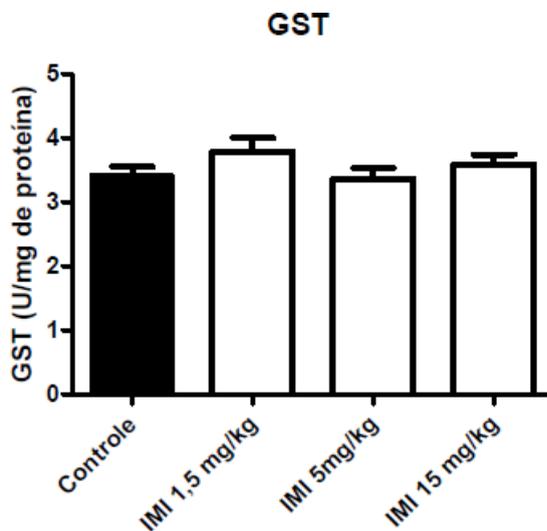


Figura 2: Atividade da GST após 45 dias de tratamento subcrônico com imidacloprido (IMI). Os valores são expressos em média \pm erro padrão (10 animais/grupo). Dados analisados por ANOVA ($p > 0.05$).

3.2. Catalase (CAT)

Foi observado aumento significativo da atividade da CAT em sangue total no grupo que recebeu 5 mg/kg de IMI quando comparado ao controle. As demais doses de tratamento não apresentaram diferença significativa, como mostrado na figura 3.

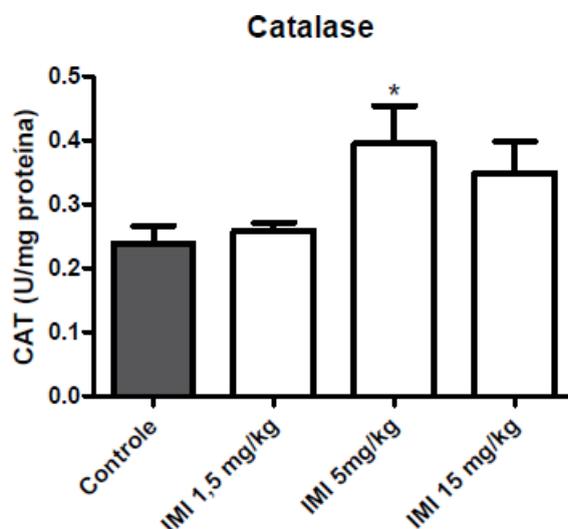


Figura 3: Atividade da CAT no sangue total avaliados após tratamento subcrônico de 45 dias com imidacloprido (IMI). As colunas representam média \pm erro padrão (10 animais/grupo). * Dados analisados por ANOVA de uma via e pós teste de Bonferroni considerando significância $p < 0,05$.

3.3. Glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx avaliada em sangue total não apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo controle, como demonstrado na figura 4.

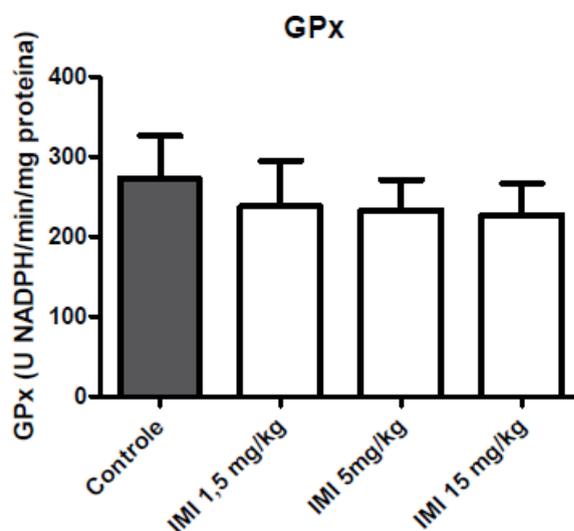


Figura 4: Atividade da GPx em sangue total avaliados após tratamento subcrônico de 45 dias com imidacloprido (IMI). Os valores são expressos em média \pm erro padrão (10 animais/grupo). Dados analisados por ANOVA e pós teste de Bonferroni.

4. Discussão

O presente estudo demonstra que houve um aumento significativo na atividade detoxificante da enzima CAT em sangue total de ratos após 45 dias de tratamento com 5mg/kg de IMI por via oral. Esta enzima é responsável pela decomposição de H₂O₂ em H₂O e O₂, assim, o aumento da atividade enzimática pode estar relacionado a um aumento na produção de radicais livres de oxigênio, estimulando atividades de enzimas antioxidantes (TORRES et al., 2002). No entanto, no estudo de KATICÍ et al. (2021) a atividade da CAT diminuiu no plasma de ratos após 28 dias de exposição oral a 0,06 mg/kg de IMI, porém o reagente utilizado foi de grau analítico, o que pode configurar diferença no perfil de toxicidade. A não alteração da CAT na dose de 15 mg/kg pode ser explicado devido ao acúmulo excessivo de radicais livres, que podem exceder a capacidade dos sistemas de defesa antioxidantes (GARAWANI et al. 2021). Os danos induzidos pelo IMI podem se manifestar na redução da produção endógena de enzimas detoxificantes.

O sistema antioxidante desempenha um papel crucial em repelir xenobióticos e outros estímulos que induzem a produção do ânion superóxido, a forma parental intracelular das EROs que é uma molécula altamente ativa e, portanto, causa vários danos celulares (Ge et al., 2015). Estudos anteriores mostraram que em minhocas da espécie *Eisenia fetida*, foi observado aumento da atividade da GST após 7 dias de exposição a doses de 0,10 e 0,50 mg/kg e inibição enzimática na dose de 1,00 mg/kg (WANG et al., 2016). Os efeitos tóxicos do IMI também foram avaliados no fígado de ratos após 28 dias de tratamento com dose de 16mg/kg e foi encontrada uma redução da atividade de GST em comparação com o grupo controle (MAHAJAN et al., 2018). No entanto, neste estudo não foi encontrado diferença significativa na atividade de GST que é uma enzima catalizadora da reação de conjugação de um xenobiótico com a GSH a fim de evitar danos celulares. Este resultado é corroborado por um estudo prévio do nosso grupo (TONIETTO et al., 2022) em que o IMI não alterou os níveis de tióis totais em eritrócitos, portanto, não houve aumento de conjugação com GSH.

Foi avaliada também a atividade da GPx, enzima que participa da detoxificação catalisando a oxidação mediada por glutathiona reduzida (GSH), em glutathiona oxidada (GSSG) (Slaninova et al., 2009). Diversos estudos demonstram diminuição na atividade de GPx devido a xenobióticos (KAPOOR et al. 2009; MANSOUR e MOSSA, 2009), porém como TONIETTO et al. (2022) não demonstraram alterações nos níveis de tióis totais em eritrócitos de ratos tratados com estas mesmas doses de IMI, a hipótese formada é de que este seria o motivo pelo qual não houve alteração na atividade de GPx. Em doses mais altas o excesso de EROs pode levar a danos celulares, e por conta disso prejudicar não só a atividade, mas também a expressão proteica destas enzimas endógenas podendo inibir a ação ou simplesmente inativar a atividade destas enzimas detoxificantes.

5. Conclusão

Os achados obtidos no presente estudo demonstram que em 45 dias tratamento via oral com IMI, a única enzima que apresentou diferença significativa foi a CAT na dose de 5mg/kg, sendo um indício do aumento da quantidade de peróxido de hidrogênio no sangue do animal causada pela metabolização do inseticida. Portanto, mais estudos são necessários, incluindo avaliação das atividades enzimáticas em órgãos, além do sangue, e da expressão proteica para corroborar com a teoria de que há aumento de espécies reativas de oxigênio devido a exposição ao IMI.

6. Bibliografia

AEBI H. Catalase in vitro. *Métodos Enzymol* 1984; 105: 121–126.

AGARWAL, R.; SRINIVAS, R. Severe neuropsychiatric manifestations and rhabdomyolysis in a patient with imidacloprid poisoning. *The American Journal of Emergency Medicine*, v. 25, n. 7, p. 844–845, set. 2007.

ARFAT, Y. et al. Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. *Toxicology Reports*, v. 1, p. 554–561, 1 jan. 2014.

BASS, C. et al. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 121, p. 78–87, jun. 2015.

BASS, C.; FIELD, L. M. Neonicotinoids. *Current Biology*, v. 28, n. 14, p. R772–R773, 23 jul. 2018.

BARBOSA, KBF, Costa, NMB, Alfenas, R. de CG, De Paula, SO, Minim, VPR, & Bressan, J. Estresse oxidativo: conceito, engenharia e fatores modulatórios. *Revista De Nutrição*, 2010.

CROSBY, E. B. et al. Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 49, p. 81–90, 1 maio 2015.

EL-GARAWANI, et al. O papel da exposição combinada ao ácido ascórbico no estresse oxidativo induzido por imidaclopride e na genotoxicidade em tilápia do Nilo. *Sci Rep* 11 , 14716 (2021).

GE, W. et al. Estresse oxidativo e danos ao DNA induzidos por imidaclopride em zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Química Alimentar* (2015).

GLORIEUX C, CALDERON PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem*. 2017 Sep.

GOMEZ, S.D. et al. Trophoblast toxicity of the neonicotinoid insecticide acetamiprid and an acetamiprid-based formulation. *Toxicology*. 431(December 2019).

HABIG WH, PABST MJ, JAKOBY WB. Glutathione S transferases. A primeira etapa enzimática na formação do ácido mercaptúrico. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130–7139.

HENRY, M. et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* (New York, N.Y.), v. 336, n. 6079, p. 348–350, 20 abr. 2012.

HOPWOOD J. et al. (2012) São neonicotinoides que matam abelhas. Uma revisão da pesquisa sobre os efeitos dos inseticidas neonicotinóides nas abelhas, com recomendações para ação. Xerces Society for Invertebrate Conservation, Portland, OR, p 32.

I13 - Imidacloprido — Português (Brasil). Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h-i/4400json-file-1/view>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

I13 – Imidacloprido — Português (Brasil). Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h-i/4400json>>

file-1/view>. Acesso em: 9 mar. 2023.

KAMMON, A. et al. Patho-biochemical studies on hepatotoxicity and nephrotoxicity on exposure to chlorpyrifos and imidacloprid in layer chickens. *Veterinarski Arhiv*, v. 80, p. 663–672, 1 set. 2010.

KAPOOR U. et al. Efeito do Imidacloprid em enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica em ratos fêmeas para derivar seu nível sem efeito observado (NOEL) , *The Journal of Toxicological Sciences* , 2010 , Volume 35 , Edição 4 , Páginas 577-581.

KATIĆ A. et al. Effects of low-level imidacloprid oral exposure on cholinesterase activity, oxidative stress responses, and primary DNA damage in the blood and brain of male Wistar rats. *Chem Biol Interact.* 2021 Apr.

LANSDHELL, S. J.; MILLAR, N. S. The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, α -bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology*, v. 39, n. 4, p. 671–679, 15 mar. 2000.

LONARE, M. et al. Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: a protective effect of curcumin. *Neurochemistry International*, v. 78, p. 122–129, dez. 2014.

MARGIS R, DUNAND C, TEIXEIRA FK, MARGIS-PINHEIRO M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J.* 2008 Aug.

MAHAJAN, L. et al. Toxic effects of imidacloprid combined with arsenic: Oxidative stress in rat liver. *Toxicology and Industrial Health*, v. 34, n. 10, p. 726–735, out. 2018.

MATSUDA, K. et al. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 22, n. 11, p. 573–580, 1 nov. 2001.

MIKOLIĆ, A.; KARAČONJI, I. B. Imidacloprid as reproductive toxicant and endocrine disruptor: investigations in laboratory animals. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, v. 69, n. 2, p. 103–108, 31 maio 2018.

NAUEN, R.; JESCHKE, P.; COPPING, L. In Focus: neonicotinoid insecticides. *Pest Management Science*, v. 64, n. 11, p. 1081, nov. 2008.

OSMAN KA, Shaaban MMI, Ahmed NS. Biomarkers of imidacloprid toxicity in Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2023 Jan.

PAGLIA DE, VALENTINE WN. Estudos de caracterização quantitativa e qualitativa da glutathione peroxidase eritrocitária. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 159–169.

QUEIROZ, LUCAS & SILVA, DANIEL. (2021). Inseticidas Neonicotinóides: uma ameaça aos corpos hídricos brasileiros.

Relatórios de comercialização de agrotóxicos. IBAMA. Disponível em:<<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>> . Acesso em: 9 mar. 2023.

Relatórios de comercialização de agrotóxicos. IBAMA. Disponível em: <http://ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=54>. Acesso em: 9 mar. 2023.

SHADNIA, S.; MOGHADDAM, H. H. Fatal intoxication with imidacloprid insecticide. *The American Journal of Emergency Medicine*, v. 26, n. 5, p. 634.e1–4, jun. 2008.

SHEETS, L. P. Chapter 95 - Imidacloprid: A Neonicotinoid Insecticide. Em: KRIEGER, R. (Ed.). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*. New York: Academic Press, 2010. p. 2055–2064.

SINGH A, LEPPANEN C. Known Target and Nontarget Effects of the Novel Neonicotinoid Cycloxaprid to Arthropods: A Systematic Review. *Integr Environ Assess Manag*. 2020
RH, R. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCES IN CASE REPORTS*. p. 4, [s.d.].

SIMON-DELISO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 22, n. 1, p. 5–34, jan. 2015.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. *Annual review of entomology*, v. 48, p. 339–64, 1 fev. 2003.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 45, p. 247–268, 2005.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 7, p. 2883–2886, 13 abr. 2011a.

TONIETTO BD. et al. Imidacloprid-based commercial pesticide causes behavioral, biochemical, and hematological impairments in Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2022 Aug;94:103924. Epub 2022 Jul 3.

TORRES, MA. Et al. Estresse oxidativo no mexilhão *Mytella guyanensis* de manguezais poluídos na Ilha de Santa Catarina Brasil. *Poluição Marinha. Touro.* , 44 (2002) , pp . 923 - 932

WANG, Y. et al. The metabolism distribution and effect of imidacloprid in chinese lizards (*Eremias argus*) following oral exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 165, p. 476–483, 15 dez. 2018.

WANG, J. et al. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*, *Chemosphere*, Volume 144, 2016, Pages 510-517.



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37572

Título: Avaliação de mecanismos bioquímicos e moleculares relacionados a neurotoxicidade de inseticidas neonicotinoides e herbicidas utilizados no RS

Vigência: 06/01/2020 à 30/12/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARCELO DUTRA ARBO - coordenador desde 06/01/2020
MIRNA BAINY LEAL - pesquisador desde 06/01/2020
SOLANGE CRISTINA GARCIA - pesquisador desde 06/01/2020
Gabriela Göethel - pesquisador desde 06/01/2020
BRUNA DUCATTI TONIETTO - Aluno de Mestrado desde 06/01/2020
NÍCOLAS GUIMARÃES DOS SANTOS - Aluno de Especialização desde 06/01/2020
YASMIN VENDRUSCOLO PITON - Aluno de Especialização desde 06/01/2020
Larissa Vivian Cestonaro - Aluno de Doutorado desde 06/01/2020

Equipe Externa:

Diana Dias da Silva - pesquisador desde 06/01/2020
Bruno Dutra Arbo - pesquisador desde 06/01/2020
Eliane Dallegrave - pesquisador desde 06/01/2020
Luciana Grazziotin Rossato-Grando - pesquisador desde 06/01/2020

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 14/10/2019 - Sala 56 do prédio 11209-Salas de aula do Campus Centro UFRGS - R. Sarmiento Leite, 425 - Centro Histórico, Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 48 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), 60 dias, machos, provenientes de Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar do CEUA e do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS); de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 31 de Outubro de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética