

NÁDYLLA RÉGIS XAVIER DE OLIVEIRA

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E FISIOLÓGICAS EM BARATAS  
D'ÁGUA, *Belostoma anurum* (HEMIPTERA: BELOSTOMATIDAE)  
DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O48a  
2019

Oliveira, Nádylla Régis Xavier de, 1994-  
Alterações comportamentais e fisiológicas em baratas  
d'água, *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae)  
decorrentes da exposição ao cádmio / Nádylla Régis Xavier de  
Oliveira. – Viçosa, MG, 2019.  
viii, 69f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Belostoma anurum*. 2. Toxicologia ambiental. 3. Insetos  
predadores. 4. Stress oxidativo. 5. Insetos aquáticos. 6. Cádmio.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 595.754

NÁDYLLA RÉGIS XAVIER DE OLIVEIRA

ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E FISIOLÓGICAS EM BARATAS  
D'ÁGUA, *Belostoma anurum* (HEMIPTERA: BELOSTOMATIDAE)  
DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das exi-  
gências do Programa de Pós-Graduação  
em Entomologia, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2019.



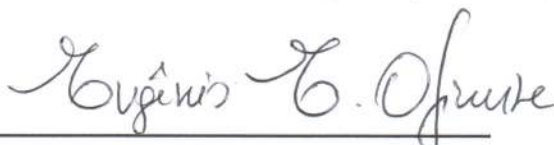
---

Graziela Domingues de Almeida  
Lima



---

Mariella Bontempo Duca de Freitas  
(Coorientadora)



---

Eugênio Eduardo de Oliveira  
(Orientador)

# Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por nunca ter me desamparado e me dado a força necessária para enfrentar mais esse desafio na minha vida.

Agradeço ao Departamento de Entomologia e à Universidade Federal de Viçosa, pela educação e por permitir a condução deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço ao Professor e Orientador Eugênio Eduardo de Oliveira pelos ensinamentos passados ao longo da trajetória, por ter aceitado me orientar antes mesmo de conhecer o meu trabalho, e por acima de tudo ter me permitido fazer parte do time BrainPhy.

Agradeço à minha coorientadora professora Mariella Bontempo Duca de Freitas por ter me recebido tão bem em seu laboratório e permitido a realização das análises necessárias dos experimentos, além de ter aceitado essa posição de coorientação.

Agradeço a Dra. Graziela Domingues de Almeida Lima por todas as palavras de incentivo e por participar da banca de defesa.

Agradeço à equipe do BrainPhy por ter me recebido bem no time desde o início, pela amizade e por compartilhar todos os momentos no laboratório. Sobretudo agradeço àqueles que acompanharam diretamente a execução deste trabalho: Álvaro Domingues, que me ajudou na condução de vários experimentos como estagiário, e a Wilson Valbon, Viviana Bohórquez, Johan Perez e Luis Viteri que me salvaram nos momentos mais tensos.

Agradeço à Renata Freitas e Jerusa Oliveira que me ajudaram direta e indiretamente com todas as análises de estresse oxidativo. Agradeço pela ajuda tanto na condução das análises, como intelectualmente e principalmente pela amizade.

Agradeço a todos os meus amigos que, perto ou longe, sempre emanaram energias positivas, tornando o caminho mais fácil.

Em especial, agradeço a toda minha família, às minhas mães Narda Régis e Claudênia da Costa e minha Vó Lourdes Régis por todo amor e apoio em todas as decisões e por tornar a distância menos difícil.

A todos vocês o meu muito obrigada!

## Resumo

OLIVEIRA, Nádylla Régis Xavier de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Alterações comportamentais e fisiológicas em baratas d'água, *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae) decorrentes da exposição ao cádmio.** Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira. Coorientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

O ecossistema aquático muitas vezes é o depósito final de diversos xenobióticos resultantes de atividades humanas. Esses xenobióticos são produzidos por meio da eliminação de resíduos industriais, fertilizantes químicos, pesticidas e outras fontes. Entre esses estão os metais pesados, que apresentam consideráveis impactos em comunidades aquáticas devido principalmente à sua capacidade de bioacumulação e biomagnificação. Esses contaminantes, no geral, têm a capacidade de causar impactos ambientais, mesmo assim ainda são escassos os estudos que venham a descrever os potenciais efeitos na entomofauna aquática. Dentre essa entomofauna, alguns grupos de insetos se destacam devido atuarem como inimigos naturais de artrópodes vetores de doença e pequenos vertebrados, além de se enquadrarem como modelos de estudos da contaminação de ambientes aquáticos. Mediante isso, esta dissertação foi realizada com o objetivo de avaliar a suscetibilidade da barata d'água, *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae) ao metal pesado cádmio, bem como as possíveis alterações fisiológicas e comportamentais em insetos expostos a concentrações subletais deste metal. Além disso, foi avaliado o impacto sobre o comportamento predatório e os biomarcadores de estresse oxidativo quando consideradas diferentes vias de exposição (i.e., água/contato e dieta/ingestão). Ninfas de segundo instar de *B. anurum* foram expostas a concentrações crescentes de cádmio para estimar curvas de concentração-mortalidade para 24 e 96 horas de exposição e para todos os experimentos o controle consistiu de ninfas expostas apenas água destilada. Após isso, foi selecionada a concentração referente à CL<sub>10</sub> da curva de 24h (0,19 mg/L) para avaliação da sobrevivência, habilidade predatória e biomarcadores de estresse oxidativo compondo assim o primeiro set de experimentos. No segundo set de experimentos, um grupo de ninfas de segundo instar foi exposto à CL<sub>10</sub> da curva de 96h (0,004 mg/L) para avaliar a exposição por contato. Um outro grupo de ninfas foi exposto à água destilada e ao mesmo tempo receberam larvas de *Aedes aegypti* previamente contaminadas com cádmio (4 mg/L), para avaliar a exposição pela dieta. Possibilitando dessa maneira avaliar a influência das vias de exposição sobre a predação e os biomarcadores de estresse oxidativo de *B. anurum*. No primeiro set de experimentos a exposição a 0,19 mg/L por 24h não foi capaz de afetar a habilidade predatória dos insetos expostos, porém houve aumento do biomarcador malondialdeído (MDA), mostrando que a concentração testada foi capaz de induzir peroxidação lipídica em ninfas de *B. anurum*. Além disso, ninfas que ficaram constantemente expostas tiveram uma redução na sobrevivência em comparação ao controle, de modo que no quarto dia de exposição todas estavam mortas. Já para o segundo set de experimentos (i.e., diferentes vias

de exposição) a habilidade predatória foi afetada em todas as vias testadas. Ninfas expostas por contato da densidade intermediária predaram mais do que o controle, e quando a via de exposição foi à dieta, as ninfas que receberam as larvas contaminadas na menor densidade predaram menos que o controle. Apenas a exposição pela dieta foi capaz de gerar alterações sobre as enzimas antioxidantes e no marcador de peroxidação lipídica. Os resultados obtidos mostram que a exposição ao cádmio por 24h foi capaz de ocasionar redução na sobrevivência e alterações fisiológicas de ninfas de *B. anurum*, e que ambas as vias de exposição influenciam a habilidade predatória desta espécie, porém apenas a exposição pela dieta se mostrou capaz de alterar os biomarcadores de estresse oxidativo, apontando assim que a via pela dieta parece ser mais citotóxica para *B. anurum*. Este conjunto de alterações observadas em insetos expostos ao Cd pode, em conjunto, ocasionar diminuições populacionais desse inseto predador e potenciais desequilíbrios ecológicos.

## Abstract

OLIVEIRA, Nádylla Régis Xavier de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Behavioral and physiological changes in giant water bugs, *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae) due exposure to cadmium.** Advisor: Eugênio Eduardo de Oliveira. Co-Advisor: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

The aquatic ecosystem is often the final deposit of various xenobiotics resulting from human activities. These xenobiotics are produced by the elimination of industrial waste, chemical fertilizers, pesticides and other sources. Among these are heavy metals, which have considerable impacts on aquatic communities mainly due to their ability to bioaccumulate and biomagnify. These contaminants, in general, have the capacity to cause environmental impacts, however, there are still few studies that will describe the potential effects in the aquatic entomofauna. Among this entomofauna, some groups of insects can be highlighted due to their role as natural enemies of arthropod vectors of disease and small vertebrates, besides being included as models of studies of the contamination of aquatic environments. Therefore, this dissertation was carried out with the objective of evaluating the susceptibility of the giant water bugs, *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae) to the heavy metal cadmium, as well as the possible physiological and behavioral changes in insects exposed to sublethal concentrations of this metal. In addition, the impact on predatory behavior and the oxidative stress biomarkers when considered different routes of exposure (i.e., water / contact and diet / intake) was evaluated. Second instar nymphs of *B. anurum* were exposed to increasing concentrations of cadmium to estimate concentration-mortality curves for 24 and 96 hours of exposure and for all experiments the control consisted of nymphs exposed only distilled water. After that, the LC10 concentration of the 24 hour curve (0.19 mg / L) was evaluated for survival, predator ability and oxidative stress biomarkers, thus composing the first set of experiments. In the second set of experiments, a group of second instar nymphs were exposed to the LC10 of the 96h curve (0.004 mg / L) to assess contact exposure. Another group of nymphs were exposed to distilled water and at the same time received *Aedes aegypti* larvae previously contaminated with cadmium (4 mg / L) to evaluate dietary exposure. It is possible to evaluate the influence of exposure pathways on the predation and oxidative stress biomarkers of *B. anurum*. In the first set of experiments exposure to 0.19 mg / L per 24 hours was not able to affect the predatory ability of exposed insects. However, there was an increase in the biomarker malondialdehyde (MDA), showing that the concentration tested was able to induce lipid peroxidation in nymphs of *B. anurum*. In addition, nymphs that were constantly exposed had a reduction in survival compared to control, so that on the fourth day of exposure all were dead. Already for the second set of experiments (i.e., different routes of exposure) the predatory ability was affected in all tested routes. Nymphs exposed by contact with the intermediate density predated more than control, and when the route of exposure was diet, nymphs that received the contaminated larvae at the lowest density predated less than the control.

Only dietary exposure was able to generate alterations on the antioxidant enzymes and on the marker of lipid peroxidation. The results show that the exposure to cadmium for 24h is able to cause a reduction in the survival and physiological changes of *B. anurum* nymphs, and that both routes of exposure influence the predatory ability of this species, but only dietary exposure was shown capable of altering the oxidative stress biomarkers, thus indicating that the route through the diet seems to be more cytotoxic for *B. anurum*. This set of observed changes in insects exposed to Cd may, together, cause population declines of this predatory insect and potential ecological imbalances.



# Sumário

<b>Introdução geral</b>	<b>1</b>
Referências . . . . .	4
<b>Capítulo 1 - Suscetibilidade e alterações nas habilidades de predação e nos biomarcadores de estresse oxidativo de <i>Belostoma anurum</i> expostas ao cádmio</b>	<b>7</b>
Resumo . . . . .	8
Abstract . . . . .	8
1.1 Introdução . . . . .	9
1.2 Material e Métodos . . . . .	11
1.2.1 <i>Obtenção e criação dos insetos</i> . . . . .	11
1.2.2 <i>Metal pesado - Cádmio</i> . . . . .	12
1.2.3 <i>Bioensaio de concentração-mortalidade</i> . . . . .	12
1.2.4 <i>Bioensaio de sobrevivência</i> . . . . .	12
1.2.5 <i>Bioensaio de habilidade predatória</i> . . . . .	13
1.2.6 <i>Marcadores de estresse oxidativo</i> . . . . .	14
1.2.7 <i>Análise estatística</i> . . . . .	16
1.3 Resultados . . . . .	16
1.3.1 <i>Bioensaio de concentração-mortalidade</i> . . . . .	16
1.3.2 <i>Bioensaio de sobrevivência</i> . . . . .	17
1.3.3 <i>Bioensaio de habilidade predatória</i> . . . . .	18
1.3.4 <i>Marcadores de estresse oxidativo</i> . . . . .	25
1.4 Discussão . . . . .	27
1.5 Agradecimentos . . . . .	29
1.6 Referências . . . . .	29
<b>Capítulo 2 - Efeito das diferentes vias de exposição ao cádmio na habilidade predatória e nos biomarcadores de estresse oxidativo de ninfas de <i>Belostoma anurum</i> (Hemiptera: Belostomatidae)</b>	<b>35</b>
Resumo . . . . .	36
Abstract . . . . .	37
2.1 Introdução . . . . .	38
2.2 Material e Métodos . . . . .	39
2.2.1 <i>Obtenção e criação dos insetos</i> . . . . .	39
2.2.2 <i>Metal pesado - Cádmio</i> . . . . .	40
2.2.3 <i>Bioensaio de concentração-mortalidade</i> . . . . .	40

## Sumário

2.2.4	<i>Bioensaio de predação</i> . . . . .	41
2.2.4.1	Bioensaio de predação com exposição por contato . . .	41
2.2.4.2	Bioensaio de predação com exposição pela dieta . . . .	41
2.2.5	<i>Marcadores de estresse oxidativo</i> . . . . .	42
2.2.6	<i>Análise estatística</i> . . . . .	44
2.3	Resultados . . . . .	44
2.3.1	<i>Bioensaio de concentração-mortalidade</i> . . . . .	44
2.3.2	<i>Bioensaio de predação</i> . . . . .	45
2.3.2.1	Bioensaio de predação com exposição por contato . . .	45
2.3.2.2	Bioensaio de predação com exposição pela dieta . . . .	52
2.3.3	<i>Marcadores de estresse oxidativo</i> . . . . .	58
2.4	Discussão . . . . .	59
2.5	Agradecimentos . . . . .	63
2.6	Referências . . . . .	63
	<b>Conclusões gerais</b>	<b>69</b>

# Introdução geral

Atividades humanas como mineração, queima de combustíveis fósseis, eliminação de resíduos industriais, esgotos e aplicação de fertilizantes e defensivos químicos são responsáveis pela liberação constante de metais pesados no meio ambiente. Essa contaminação pode ocasionar potenciais riscos em diferentes ecossistemas, incluindo o ecossistema aquático (Jiang and Yan 2017; Aydoğan et al. 2016). Entre os poluentes já conhecidos, os metais pesados tem sido foco de diversas pesquisas, isso em decorrência principalmente das características que apresentam, entre elas temos que são persistentes e tendem a permanecer assim um longo período de tempo seja no ambiente ou no organismo, além disso, são tóxicos para os organismos vivos e podem ser bioacumulados (Aydoğan et al. 2016).

Entre os metais pesados mais conhecidos e estudados, o cádmio merece destaque devido principalmente à sua ocorrência relativamente comum em corpos d'água e em concentrações altas o suficiente para causar efeitos adversos nos organismos vivos (Lari et al. 2017). Além de apresentar alto potencial de toxicidade devido à sua longa meia vida biológica, que é aproximadamente 30 anos (Suwazono et al. 2009). Somado a isso, são diversos os distúrbios biológicos induzidos pelo cádmio, entre estes estão, estresse oxidativo, aumento da peroxidação lipídica e alterações enzimáticas, além de causar alterações em padrões comportamentais como forrageamento, nado e outros (Huang et al. 2006; López et al. 2006; Wallace et al. 2000).

Os insetos aquáticos, por apresentarem suscetibilidade diferencial a diversos grupos de contaminantes e ser um dos grupos mais representativo entre os invertebrados aquáticos, são utilizados como modelos para avaliar as alterações causadas por esses compostos (Santos et al. 2017; Valbon et al. 2018; Gutiérrez et al. 2016a; Gutiérrez et al. 2016; Gutiérrez et al. 2017), ajudando assim a compreender parte das perturbações ecológicas ocorridas no ambiente aquático (Aura et al. 2011). Mesmo sendo organismos modelo e abundantes nesse ambiente, ainda são poucos os estudos envolvendo

as alterações fisiológicas e comportamentais nesse grupo de insetos expostos a contaminantes (Baird and Van den Brink 2007; Brix et al. 2005). Visto que a exposição a contaminantes pode gerar diversos efeitos negativos além da mortalidade, tendo como exemplo redução da sobrevivência e alterações no forrageamento (Valbon et al. 2018; Gutiérrez et al. 2016a). Assim, o estudo desses efeitos é essencial para o entendimento das diferentes respostas biológicas de insetos aquáticos frente à exposição aos contaminantes (Rivadeneira et al. 2013).

Em ambientes aquáticos, insetos das famílias Notonectidae e Belostomatidae, ambos pertencentes à ordem Hemiptera, merecem destaque devido a sua importância como predadores de outros insetos e pequenos vertebrados em ecossistemas lóticos e lênticos (Consoli et al. 1989; Pereira et al. 1993; Toledo 2003; Shaalan and Canyon 2009; Valbon et al. 2018; Gutiérrez et al. 2016). Assim, esses insetos são comumente utilizados em bioensaios ecotoxicológicos, pois são importantes como organismos bioindicadores de poluição, predadores e agentes de controle biológico natural de mosquitos vetores de doenças como *Anopheles gambiae* (vetor da malária), *Aedes aegypti* (vetor da principalmente da dengue) e *Culex* spp. (vetor da filariose, encefalite e outras doenças) (Clark 1992; Saha et al. 2007; Shaalan and Canyon 2009; Gutiérrez et al. 2016a; Valbon et al. 2018; Leon 1998; Gutiérrez et al. 2016).

Uma forma de avaliar os distúrbios fisiológicos desencadeados por metais pesados em insetos aquáticos é por meio de bioensaios que avaliam o estresse oxidativo (Xie and Buchwalter 2011). Como esses organismos podem bioacumular metais pesados por meio de diferentes fontes, como a água, sedimento e pela ingestão de alimento contaminado, cada via teria seu impacto sobre o sistema antioxidante do organismo e consequentemente na geração de estresse oxidativo (Aydoğan et al. 2016). Esses contaminantes no geral tem a capacidade de alterar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) de forma transitória ou crônica, além do aumento ou diminuição das enzimas antioxidantes celulares (Monaghan et al. 2009; Lushchak 2011; Nishida 2011).

Os EROs são produzidos e eliminados continuamente pelo organismo, sendo na maioria das vezes produtos secundários do metabolismo do oxigênio (Lushchak 2011), porém por alguns distúrbios essa produção pode ser aumentada ocasionando o que denominamos de estresse oxidativo (Lushchak 2011). Deste modo a alteração na sua

produção implica em perturbações no metabolismo e regulação celular, levando a dano de proteínas e DNA e peroxidação lipídica (Livingstone 2003). Essas respostas fisiológicas são utilizadas como biomarcadores não específicos em espécies aquáticas, uma vez que são úteis para identificar áreas contaminadas (Geracitano et al. 2004; Amado et al. 2006).

Além de causar estresse oxidativo como mencionado anteriormente, os poluentes ambientais também podem causar alterações sensoriais, hormonais, neurológicas e metabólicas em insetos aquáticos, e a união dessas alterações muitas vezes levam a mudanças comportamentais, resultando em respostas comportamentais anormais (Scott and Sloman 2004). Alterações no comportamento locomotor podem influenciar diretamente a capacidade predatória de inimigos naturais de insetos, podendo ocasionar um desequilíbrio em comunidades ecológicas, incluindo comunidades aquáticas (Reynaldi et al. 2011; Gutiérrez et al. 2017; Valbon et al. 2018; Gutiérrez et al. 2016).

A grande maioria dos estudos ecotoxicológicos envolvendo insetos aquáticos apresentam como ponto final a obtenção de concentrações letais e a avaliação da mortalidade dos indivíduos após um curto período de exposição (Stark and Banks 2003). No entanto, informações acerca das possíveis alterações comportamentais e fisiológicas em insetos aquáticos predadores ainda são escassas (Dodson et al. 1995; Garaventa et al. 2010).

Mediante isso, as experimentações científicas conduzidas na presente dissertação tiveram como objetivo avaliar a suscetibilidade de *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae), um importante predador de mosquitos vetores de doenças, ao metal pesado cádmio, bem como os efeitos subletais da exposição e a influência deste no comportamento predatório e nos biomarcadores de estresse oxidativo. Além disso, testar duas rotas de exposição, e conhecer o impacto dessas formas de exposição sobre o comportamento predatório e nos biomarcadores de estresse oxidativo de *B. anurum*. Deste modo, os resultados descritos no presente estudo contribuem para a avaliação de riscos decorrentes da exposição deste inseto predador aquático ao cádmio.

## Referências

- Amado, L. L., R. B. Robaldo, L. Geracitano, J. M. Monserrat, and A. Bianchini (2006, feb). Biomarkers of exposure and effect in the brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (teleostei: Paralichthyidae) from the patos lagoon estuary (southern brazil). *Marine Pollution Bulletin* 52(2), 207–213.
- Aura, C. M., P. O. R. Raburu, and J. Herrmann (2011). Macroinvertebrates' community structure in rivers kipkaren and sosiani, river nzoia basin, kenya. *Journal of Ecology and The Natural Environment*.
- Aydoğan, Z., A. Gürol, and Ü. İncekara (2016). The investigation of heavy element accumulation in some hydrophilidae (coleoptera) species. *Environmental monitoring and assessment* 188(4), 204.
- Baird, D. J. and P. J. Van den Brink (2007, June). Using biological traits to predict species sensitivity to toxic substances. *Ecotoxicology and environmental safety* 67, 296–301.
- Brix, K. V., D. K. DeForest, M. Burger, and W. J. Adams (2005, dec). Assessing the relative sensitivity of aquatic organisms to divalent metals and their representation in toxicity datasets compared to natural aquatic communities. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 11(6), 1139–1156.
- Clark, F. (1992, dec). A study of a population of *Micronecta scutellaris* stal (Hemiptera : Corixidae) in lake naivasha, kenya. *Hydrobiologia* 248(2), 115–124.
- Consoli, R. A., M. H. Pereira, A. L. Melo, and L. H. Pereira (1989). *Belostoma micantulum* Stal, 1858 (Hemiptera: Belostomatidae) as a predator of larvae and pupae of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae) in laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84(4), 577–578.
- Dodson, S. I., T. Hanazato, and P. R. Gorski (1995). Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and chaoborus kairomone. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14(1), 43–50.
- Garaventa, F., C. Gambardella, A. D. Fino, M. Pittore, and M. Faimali (2010, jan). Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. *Ecotoxicology* 19(3), 512–519.
- Geracitano, L., R. Bocchetti, J. Monserrat, F. Regoli, and A. Bianchini (2004, jul). Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. *Marine Environmental Research* 58(1), 1–17.
- Gutiérrez, Y., G. S. Ramos, H. V. V. Tomé, E. E. Oliveira, and A. L. Salaro (2017, aug). Bti-based insecticide enhances the predatory abilities of the backswimmer *Buenaotarsalis* (Hemiptera: Notonectidae). *Ecotoxicology* 26(8), 1147–1155.

- Gutiérrez, Y., H. P. Santos, J. E. Serrão, and E. E. Oliveira (2016, mar). Deltamethrin-mediated toxicity and cytomorphological changes in the midgut and nervous system of the mayfly *Callibaetis radiatus*. *PLOS ONE* 11(3), e0152383.
- Gutiérrez, Y., H. V. Tomé, R. N. Guedes, and E. E. Oliveira (2016a, nov). Deltamethrin toxicity and impaired swimming behavior of two backswimmer species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(5), 1235–1242.
- Huang, Y.-H., C.-M. Shih, C.-J. Huang, C.-M. Lin, C.-M. Chou, M.-L. Tsai, T. P. Liu, J.-F. Chiu, and C.-T. Chen (2006). Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 98(3), 577–589.
- Jiang, D. and S. Yan (2017). Effects of Cd, Zn or Pb stress in *Populus alba berolinensis* on the development and reproduction of *Lymantria dispar*. *Ecotoxicology* 26(10), 1305–1313.
- Lari, E., P. Gauthier, E. Mohaddes, and G. G. Pyle (2017, jul). Interactive toxicity of Ni, Zn, Cu, and Cd on *Daphnia magna* at lethal and sub-lethal concentrations. *Journal of Hazardous Materials* 334, 21–28.
- Leon, B. (1998, sep). Influence of the predatory backswimmer, *Notonecta maculata*, on invertebrate community structure. *Ecological Entomology* 23(3), 246–252.
- Livingstone, D. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire* 154(6), 427–430.
- López, E., C. Arce, M. Oset-Gasque, S. Cañadas, and M. González (2006, mar). Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radical Biology and Medicine* 40(6), 940–951.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology* 101, 13–30.
- Monaghan, P., N. B. Metcalfe, and R. Torres (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters* 12(1), 75–92.
- Nishida, Y. (2011). The chemical process of oxidative stress by copper (ii) and iron (iii) ions in several neurodegenerative disorders. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* 142(4), 375–384.
- Pereira, M., R. Silva, A. Azevedo, A. Melo, and L. Pereira (1993, oct). Predation of *Biomphalaria glabrata* during the development of *Belostoma anurum* (Hemiptera, Belostomatidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 35(5), 405–409.
- Reynaldi, S., M. Meiser, and M. Liess (2011, jul). Effects of the pyrethroid fenvalerate on the alarm response and on the vulnerability of the mosquito larva *Culex pipiens molestus* to the predator *Notonecta glauca*. *Aquatic Toxicology* 104(1-2), 56–60.

- Rivadeneira, P. R., M. Agrelo, S. Otero, and G. Kristoff (2013, apr). Different effects of subchronic exposure to low concentrations of the organophosphate insecticide chlorpyrifos in a freshwater gastropod. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90, 82–88.
- Saha, N., G. Aditya, A. Bal, and G. K. Saha (2007, mar). A comparative study of predation of three aquatic heteropteran bugs on *Culex quinquefasciatus* larvae. *Limnology* 8(1), 73–80.
- Santos, H. P., Y. Gutiérrez, E. E. Oliveira, and J. E. Serrão (2017, oct). Sublethal dose of deltamethrin damage the midgut cells of the mayfly *Callibaetis radiatus* (Ephemeroptera: Baetidae). *Environmental Science and Pollution Research* 25(2), 1418–1427.
- Scott, G. R. and K. A. Sloman (2004, jul). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68(4), 369–392.
- Shalan, E. A.-S. and D. V. Canyon (2009, December). Aquatic insect predators and mosquito control. *Tropical biomedicine* 26, 223–261.
- Stark, J. D. and J. E. Banks (2003, jan). Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review of Entomology* 48(1), 505–519.
- Suwazono, Y., T. Kido, H. Nakagawa, M. Nishijo, R. Honda, E. Kobayashi, M. Dochi, and K. Nogawa (2009, mar). Biological half-life of cadmium in the urine of inhabitants after cessation of cadmium exposure. *Biomarkers* 14(2), 77–81.
- Toledo, L. F. (2003, dec). Predation on seven south american anuran species by water bugs (Belostomatidae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology* 2(2), 105.
- Valbon, W. R., F. M. Cruz, G. S. Ramos, H. V. V. Tome, and E. E. Oliveira (2018, January). Sublethal exposure to deltamethrin reduces the abilities of giant water bugs to prey upon *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 191, 350–356.
- Wallace, W. G., T. M. H. Brouwer, M. Brouwer, and G. R. Lopez (2000, apr). Alterations in prey capture and induction of metallothioneins in grass shrimp fed cadmium-contaminated prey. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(4), 962–971.
- Xie, L. and D. B. Buchwalter (2011). Cadmium exposure route affects antioxidant responses in the mayfly *Centroptilum triangulifer*. *Aquatic toxicology* 105(3-4), 199–205.



**Capítulo 1 - Suscetibilidade e alterações  
nas habilidades de predação e nos  
biomarcadores de estresse oxidativo de  
*Belostoma anurum* expostas ao cádmio**

## Suscetibilidade e alterações nas habilidades de predação e nos biomarcadores de estresse oxidativo de *Belostoma anurum* expostas ao cádmio

### Resumo

O cádmio é considerado um dos metais pesados mais tóxicos e são comumente originados de atividades humanas como mineração, produção de baterias e pigmento de cor em tintas. O cádmio ao chegar em ambientes aquáticos pode gerar alterações comportamentais e fisiológicas nos organismos ali presentes. Entre os organismos temos os insetos aquáticos, estes que desempenham diversas funções, podendo atuar como inimigos naturais de vetores de doenças e pequenos vertebrados e, além disso, se enquadram como modelos de avaliação da qualidade desses ecossistemas. Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar a suscetibilidade e os efeitos subletais sobre a habilidade predatória e nos biomarcadores de estresse oxidativo da barata-d'água, *Belostoma anurum* expostas ao cádmio. Para isso, ninfas de *B. anurum* obtidas da criação estabelecida em laboratório foram expostas a concentrações crescentes de cádmio (0,1 a 30 mg/L) para a estimar a curva de concentração-mortalidade. Após isso, foi escolhida a concentração de cádmio corresponde a CL<sub>10</sub> (0,19 mg/L) e foi avaliado a sobrevivência (com recuperação e sem recuperação), a habilidade predatória (densidades avaliadas 3, 6 e 9 larvas) após 24 horas de exposição, e os biomarcadores de estresse oxidativo (Superóxido dismutase, Catalase, Glutathione-S-Transferase, Óxido nítrico e Malondialdeído). Houve redução na sobrevivência das ninfas expostas apenas no bioensaio sem recuperação. A habilidade predatória não foi afetada em nenhuma das densidades testadas, mesmo sendo observado um pico de consumo nas avaliações intermediárias dos insetos expostos da maior densidade. Entre os biomarcadores de estresse oxidativo apenas o malondialdeído (MDA) foi afetado, apresentando o valor aproximadamente três vezes maior nos insetos expostos. Os resultados mostram que a concentração utilizada do metal pesado cádmio não foi capaz de alterar a habilidade predatória das ninfas expostas, porém foi capaz de reduzir a sobrevivência e causar danos oxidativos aos lipídios em *B. anurum*, o que pode acarretar em desequilíbrios populacionais destes insetos predadores.

**Palavras-chave:** ecotoxicologia, habilidade predatória, estresse oxidativo, predador aquático.

### Abstract

Cadmium is considered one of the most toxic heavy metals and is commonly originated from human activities like mining, battery production and color pigment in paints. Cadmium when arriving in aquatic environments can generate behavioral and physiological changes in the organisms present. Among the organisms we have aquatic

insects, which perform several functions, and can act as natural enemies of diseases vectors and small vertebrates and, in addition, are considered models for assessing the quality of these ecosystems. Therefore, the objective of this study was to evaluate the susceptibility and the sublethal effects on the predatory ability and on the oxidative stress biomarkers of giant water bug, *Belostoma anurum* exposed to cadmium. For this, *B. anurum* nymphs obtained from laboratory establishment were exposed to increasing concentrations of cadmium (0.1 to 30 mg / L) to estimate the concentration-mortality curve. After that, the concentration of cadmium corresponding to LC10 (0.19 mg / L) was chosen and survival was assessed (with recovery and without recovery), predatory ability (evaluated densities 3, 6 and 9 larvae) after 24 hours of exposure, and oxidative stress biomarkers (Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione-S Transferase, Nitric Oxide and Malondialdehyde). There was a reduction in the survival of nymphs exposed only in the bioassay without recovery. The predatory ability was not affected in any of the densities tested, even though a peak of consumption was observed in the intermediate evaluations of exposed insects of the highest density. Among the oxidative stress biomarkers only malondialdehyde (MDA) was affected, presenting the value approximately three times higher in the exposed insects. The results show that the concentration of the heavy metal cadmium was not able to alter the predatory ability of the exposed nymphs, but it was able to reduce the survival and cause oxidative damage to the lipids in *B. anurum*, which can lead to population imbalances of these insects predators.

**Key words:** ecotoxicology, predatory ability, oxidative stress, aquatic predator.

## 1.1 Introdução

Nos últimos anos, o número de compostos xenobióticos liberados em ecossistemas aquáticos aumentou de maneira alarmante, de modo a complicar a situação principalmente dos organismos ali presentes (Schwarzenbach 2006). A grande maioria desses compostos são originados de atividades humanas, como liberação de efluentes industriais e urbanos, processos agrícolas, derrames acidentais de lixo e produtos químicos. Muitos destes compostos são representados por agrotóxicos, material orgânico e metais pesados (Rashed 2001; Chandran et al. 2005; Arias et al. 2007).

O cádmio é considerado um dos metais pesados mais tóxicos para os organismos (Jaishankar et al. 2014). Essa elevada toxicidade é decorrente de algumas características como a alta afinidade pelos grupos funcionais contendo enxofre (SH) presente nas proteínas (Nieboer and Richardson 1980), e que pode levar a inativação das mesmas caso o grupo contendo enxofre esteja no seu sítio ativo. Além disso, o cádmio pode

interferir na regulação de metais essenciais, como zinco e cobre e no metabolismo do cálcio (o cádmio é competidor com o cálcio pela abertura do seu canal pois apresentam o diâmetro bastante semelhante) (Lucu and Obersnel 1996; Sidoumou et al. 1997).

Os compostos tóxicos, ao chegarem ao ambiente aquático, são capazes de interagir com os organismos presentes, podendo dessa forma causar inúmeras alterações tanto comportamentais como fisiológicas, que podem ter como consequência final graves desequilíbrios ecológicos (Livingstone 1993). O impacto dos estressores nas comunidades depende de diversos fatores, entre eles a sensibilidade à exposição ao estressor e a via de exposição utilizada (Whaley et al. 1989; Martin et al. 2007; Xie and Buchwalter 2011).

Avaliações da toxicidade dos metais devem ser realizadas para o melhor entendimento do impacto que os mesmos possuem sobre os ecossistemas aquáticos. Alguns estudos mostraram que biomarcadores de estresse oxidativo são importantes para o monitoramento de ambientes aquáticos (Bainy et al. 1996; Ventura et al. 2002; Chandran et al. 2005; Zanette et al. 2008; Nicholson and Lam 2005). A utilização de enzimas como marcadores das condições ambientais decorre do fato de que a grande maioria dos compostos tóxicos possuem elevada afinidade pelos aminoácidos que formam as enzimas, como é o caso do cádmio pelo grupamento sulfidril (SH).

Além da utilização dos biomarcadores enzimáticos, as manifestações comportamentais começaram a receber atenção como uma importante consequência de exposições subletais (Weber and Spieler 1994). Os comportamentos observados na maioria das vezes são as alterações na locomoção, natação, evitação da presa ao predador e comportamento alimentar (Kraus and Kraus 1986; Weis and Khan 1991). Entre eles o comportamento alimentar ou forrageamento tem se mostrado muito útil na avaliação da toxicidade subletal de compostos (Weis and Khan 1991; Sandheinrich and Atchison 1990). Alterações no forrageamento podem trazer consequências diretas no fitness do organismo em questão, e isso pode resultar em um efeito cascata nas interações com os outros organismos presentes no ecossistema (Wallace et al. 2000).

Entre os representantes dos ecossistemas aquáticos temos os insetos aquáticos. Esses organismos são de relevante importância devido às funções que desempenham no ambiente, podendo atuar como inimigos naturais de vetores de doenças e pequenos vertebrados e além disso, se enquadram como modelos de avaliação da qualidade

de ambientes aquáticos (Toledo 2003; Shaalan and Canyon 2009; Halstead et al. 2015; Figueiredo de Andrade et al. 2010).

Devido a importância que os insetos aquáticos apresentam para a estruturação das comunidades aquáticas e por estarem também em contato direto com os contaminantes, é necessário o conhecimento dos efeitos subletais tanto sobre o comportamento como nos biomarcadores de estresse oxidativo. Com isso, o trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a toxicidade da exposição aguda ao metal pesado cádmio e os efeitos subletais na sobrevivência e na habilidade predatória, bem como nos marcadores de estresse oxidativo da barata d'água, *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae) após exposição a esse metal.

## 1.2 Material e Métodos

### 1.2.1 Obtenção e criação dos insetos

*Belostoma anurum*: Os insetos foram obtidos a partir da criação já estabelecida no Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados da Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG) sob condições controladas ( $27 \pm 2$  °C,  $60 \pm 20\%$  UR, fotofase de 12h) (Valbon et al. 2018). Os adultos foram mantidos em aquário (30 x 40 x 60 cm) para que a cópula ocorresse livremente, após isso as fêmeas depositam os ovos no hemiólito de machos adultos. Os machos com ovos no hemiólito foram individualizados em potes de plásticos perfurados (10,9 x 9,2 x 7,5 cm) colocados em bandejas com água e aquecedor e foram alimentados com *Buenoa* spp. e *Martarega* spp. (Hemiptera: Notonectidae) até a emergência das ninfas. Após a emergência, as ninfas foram individualizadas em frascos de vidro (30 mL) até o quarto instar para evitar o canibalismo. As ninfas, ao atingirem o quarto instar, foram transferidas para recipientes de plástico maiores (100 mL) onde completaram o seu desenvolvimento e ficaram até a fase de adulto. Ninfas do primeiro ao terceiro instar foram alimentadas diariamente com larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), enquanto as de quarto e quinto instar foram alimentadas com *Buenoa* spp. e *Martarega* spp., estes que foram coletados no setor de piscicultura da UFV. Todas as ninfas foram mantidas em água destilada e os adultos de *B. anurum* em água deionada.

*Aedes aegypti*: Larvas de quarto instar (L4) foram obtidas da criação mantida no

insetário do Departamento de Biologia Geral da UFV sob condições controladas ( $25\pm 2$  °C,  $60\pm 20\%$  UR, fotofase de 12h) (Marriel et al. 2016).

### **1.2.2 Metal pesado - Cádmio**

Soluções estoques do metal pesado cádmio (Cloreto de Cádmio Monohidratado Puro® [CdCl<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O 55,83% Cd] Merck Group, Darmstadt, Alemanha) foram diluídas e mantidas em laboratório durante o período experimental. As concentrações do metal pesado foram preparadas mediante a diluição em recipientes de vidro contendo água destilada.

### **1.2.3 Bioensaio de concentração-mortalidade**

Ninfas de segundo instar de *B. anurum* (0-72h após a ecdise) foram expostas individualmente às concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 30 mg/L de cádmio por 24h em recipientes de vidro contendo 100 mL da solução e cobertos com tecido organza. Para cada concentração foram feitas quatro repetições de 10 insetos cada. A mortalidade foi avaliada 24h após a exposição nas concentrações citadas anteriormente. No tratamento controle os insetos foram expostos à água destilada. Insetos sem movimentação após estímulos mecânicos com uma pipeta foram considerados mortos. Os insetos foram mantidos em condições controladas ( $27\pm 2$  °C,  $60\pm 20\%$  UR, fotofase de 12h) no Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados da UFV e durante a exposição os insetos não foram alimentados.

### **1.2.4 Bioensaio de sobrevivência**

A avaliação da sobrevivência foi conduzida seguindo duas metodologias para a realização dos bioensaios. No primeiro bioensaio os indivíduos ficaram constantemente expostos e sem alimentação durante o período de avaliação (32 dias), obtendo dessa forma o que chamamos de sobrevivência sem recuperação, essa metodologia representaria o pior cenário para o inseto. Já para o segundo bioensaio, as ninfas foram expostas por 24h, e após esse período de exposição foram transferidas para água des-

tilada e receberam alimento todos os dias de avaliação até o fim do bioensaio (23 dias), e tivemos dessa maneira uma sobrevivência com recuperação.

Para os bioensaios foram utilizadas ninfas de segundo instar de *B. anurum* (0 - 72h de idade) e foi escolhida a concentração referente à CL<sub>10</sub> (0,19 mg/L) para a avaliação da sobrevivência, essa concentração foi obtida no bioensaio de concentração-mortalidade realizado anteriormente. As ninfas foram expostas individualmente em recipientes de vidro contendo 100 mL da solução e cada inseto foi considerado uma repetição, totalizando 30 repetições para cada tratamento. Os insetos foram mantidos em condições laboratoriais controladas (27±2 °C, 60±20% UR, fotofase de 12h) no Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados da UFV. A avaliação quanto à sobrevivência foi realizada a cada 24h até a ecdise ou morte do inseto. Foram considerados indivíduos mortos àqueles que não responderam ao estímulo mecânico feito com o auxílio de uma pipeta. No controle, as ninfas foram expostas somente a água destilada.

### **1.2.5 Bioensaio de habilidade predatória**

Ninfas de segundo instar de *B. anurum* (0-72h após a ecdise) foram expostas por 24h à concentração de cádmio correspondente a CL<sub>10</sub> (0,19 mg/L) obtida no bioensaio de concentração-mortalidade para 24h. No controle as ninfas foram expostas somente a água destilada. Após a exposição ao metal pesado, os insetos sobreviventes foram transferidos para recipientes de vidro com 100 mL de água destilada e ficaram por uma hora para a recuperação/ aclimatação. Decorrido esse período, foram oferecidas larvas L4 de *A. aegypti* em três densidades (3, 6 e 9 larvas). Foi avaliado o número de larvas predadas em intervalos de 40 minutos durante seis horas, e ao fim de cada avaliação foi restabelecido o número inicial de larvas de cada densidade. A avaliação do número de larvas predadas foi conduzida ao longo de quatro dias e para cada tratamento (concentração cádmio e densidade de larvas) foram feitas 15 repetições (insetos) (Valbon et al. 2018).

### 1.2.6 Marcadores de estresse oxidativo

Ninfas de segundo instar sobreviventes após a exposição a CL<sub>10</sub> da curva de concentração-mortalidade para cádmio de 24h foram armazenadas a -80 °C até a sua utilização. Cada repetição consistiu de sete insetos (peso de aproximadamente 100 mg), totalizando quatro repetições de sete insetos para cada tratamento (controle e CL<sub>10</sub>).

Ninfas de segundo instar foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 7.4) 0.2 M com 1M EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e o homogenato resultante foi centrifugado a 12000 rpm por 20min a 4 °C. O sobrenadante resultante foi passado para outro microtubo e foi utilizado para as análises da atividade das enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione-S-Transferase (GST) e dos níveis de Malondialdeído (MDA) e Óxido nítrico (NO). As análises foram conduzidas no Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros do Departamento de Biologia Animal da UFV.

A atividade da enzima SOD foi medida segundo a metodologia de Dieterich et al. (2000) em leitor de microplacas ( $\lambda = 570$  nm). A reação consiste na capacidade desta enzima em catalisar superóxido  $O_2^-$  a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), diminuindo assim a razão de auto-oxidação do pirogalol. Para isso, foi pipetado 30  $\mu$ L de cada amostra em duplicata, 45  $\mu$ L de tampão no branco, 30  $\mu$ L de tampão no padrão, 99  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio 0,2M (pH 7.0) e 6  $\mu$ L de MTT ( brometo de 3-(4,5-dimitiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) em todos e 15  $\mu$ L de pirogalol (1,2,3-benzenotriol) em todos os poços, com exceção do branco. Posteriormente, a placa foi deixada na estufa por cerca de cinco minutos e após isso foi adicionado 150  $\mu$ L de DMSO (Dime-tilsulfóxido) em todos os poços, e a leitura foi realizada a 570 nm. Os resultados foram expressos em Unidades/ mg proteína<sup>-1</sup>.

A enzima CAT foi mensurada de acordo com o protocolo de Aebi (1984). A atividade de CAT foi estimada pela queda da absorbância durante 60 segundos do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (10 mM) em tampão fosfato de potássio 0.2M (pH 7.0) e do homogenato da amostra em espectrofotômetro (leitura em  $\lambda = 240$  nm). Para a contagem foi utilizado 1000  $\mu$ L de tampão com peróxido (25 mL de tampão fosfato 7,0 pH e 40  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio em béquer com papel alumínio) e 10  $\mu$ L de amostras, as leituras foram feitas nos tempos 0, 30 e 60 segundos. Para encontrar a concentração total de CAT na amostra foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de



hidrogênio  $e^{240} = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  e os resultados foram expressos em Unidades/ mg proteína<sup>-1</sup>.

A atividade enzimática da GST foi quantificada de acordo com Habig et al. (1974), por meio da formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A atividade da enzima foi estimada utilizando CDNB 1 mM em etanol, Glutationa Redutase (GSH) 1 mM, fosfato de potássio (pH 7.0) 100 mM e homogenato das amostras, a mistura resultante foi adicionada no espectrofotômetro e o aumento da absorvância ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) foi verificado em 0, 30, 60 e 90s. O coeficiente de extinção molar do CDNB  $e^{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi utilizado para os cálculos e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1} / \text{g}$ .

A concentração de malondialdeído (produto da peroxidação lipídica) foi estimada como descrito por Wallin et al. (1993). Para isso, 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das amostras foram pipetadas em microtubos e então homogeneizados em 400  $\mu\text{L}$  de solução TBARS (que consiste da mistura de ácido tricloroacético (15%)/ ácido tiobarbitúrico (0,375%)/ ácido clorídrico 0,25 M). Em seguida os microtubos com a solução resultante foram passados no vortéx por 10s e então foram aquecidos em banho-maria a 90 °C por 40min. Depois foi colocado no gelo por cinco minutos e acrescido 600  $\mu\text{L}$  de álcool butílico ou n-butanol, vortéx por mais um minuto e em seguida foi centrifugado por 10min a 3000 rpm. Ao final da centrifugação a fase superior formada foi plaqueada (200  $\mu\text{L}$ ) em leitor de microplacas ( $\lambda = 540 \text{ nm}$ ). A quantificação da concentração de MDA das amostras foi determinada por meio de uma curva padrão a partir das concentrações já estabelecidas de TMPO (1, 1, 3, 3 - tetramethoxypropane). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M} / \text{mg proteína}^{-1}$ .

A quantificação da produção de óxido nítrico foi realizada por meio do teor de nitritos presente nas amostras, pois o nitrito é utilizado como indicador indireto do óxido nítrico. O método utilizado é de Griess, para isso foi necessário adicionar 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra, 100  $\mu\text{L}$  da solução A+B (1% de sulfanilamida e 0,1% de naf-til - etileno-diamina em 2,5% em 2,5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e deixou agir por 10min no escuro em temperatura ambiente. Após isso foi estimado a absorvâncias em leitor de microplacas ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ). A concentração de nitrito das amostras foi estimado a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas (provenientes de sete a oito diluições) de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) e expressas em Unidades mg proteína<sup>-1</sup>.

A concentração de proteína total foi encontrada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão. A concentração de proteína total foi utilizada para expressar a dosagem das enzimas SOD, CAT, GST e das concentrações de MDA em mg de proteína.

### **1.2.7 Análise estatística**

A curva de concentração-mortalidade foi determinada pelo procedimento PROC PROBIT (SAS Institute, 2010). Os dados obtidos de sobrevivência foram analisados utilizando os estimadores de Kaplan-Meier (Log-rank método) com auxílio do software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, Califórnia, EUA). Os dados de predação larval foram submetidos à análise de variância com medida repetida no tempo para determinar o efeito do cádmio, da densidade e do tempo de recuperação (SAS Institute, 2010). O número total de larvas predadas foi submetido à análise pelo Test-t com auxílio do software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, Califórnia, EUA). Dados obtidos para cada parâmetro avaliado no bioensaio de estresse oxidativo foram submetidos à análise pelo Teste-t utilizando o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, Califórnia, EUA).

## **1.3 Resultados**

### **1.3.1 Bioensaio de concentração-mortalidade**

Os resultados encontrados para a estimação da curva de concentração-mortalidade para *B. anurum* foram adequados ao modelo de Probit. Visto que foi obtido baixo valor de  $\chi^2(1,67)$  e alto valor de  $P (>0,05)$ , o valor da  $CL_{50}$  foi de 1,61 (1,14 - 2,61) mg/L de cádmio (Figura 1.1).

A partir desse bioensaio foi escolhida a concentração que representa a  $CL_{10}$  (0,19 mg/L de cádmio) para avaliar as possíveis alterações na sobrevivência, habilidade predatória e nos biomarcadores de estresse oxidativo desse predador aquático quando subletalmente exposto ao metal pesado cádmio por 24 horas (Figura 1.1).

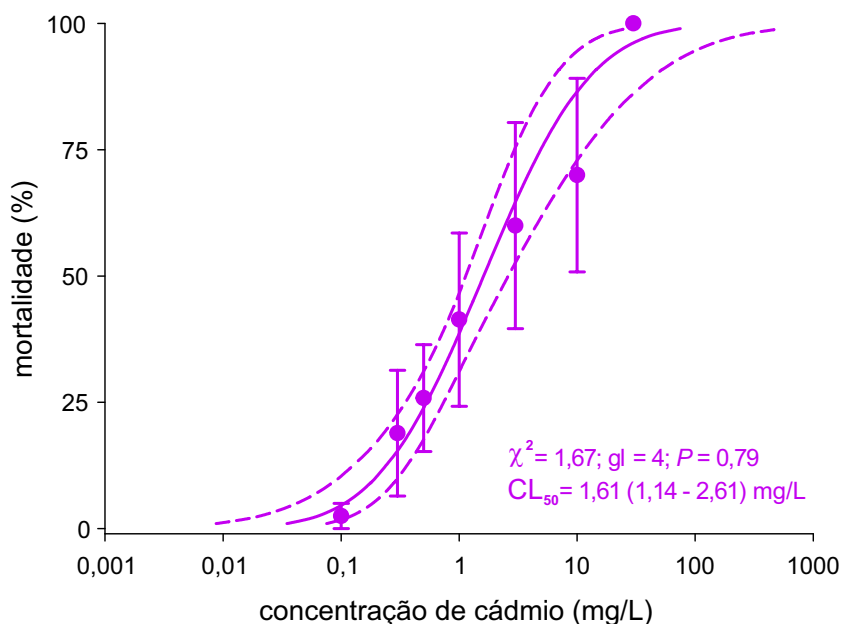


Figura 1.1: Curva concentração-mortalidade de ninfas de *B. anurum* após 24 h de exposição ao cádmio. Os valores da concentração letal (CL) foram estimados baseados no bioensaio de concentração-mortalidade usando análises de Probit. Linhas pontilhadas denotam intervalos de confiança de 95%. Pontos representam a mortalidade média ( $\pm$ EP) de cada tratamento testado.

### 1.3.2 Bioensaio de sobrevivência

A análise de sobrevivência do bioensaio sem recuperação mostrou diferença significativa entre a sobrevivência de *B. anurum* expostos a  $CL_{10}$  e o controle (Long-Rank:  $\chi^2 = 64,16$ ; g.l. = 1;  $P < 0,001$ ), em que houve uma redução da sobrevivência e do tempo de mortalidade (Figura 1.2A). Nenhuma ninfa de *B. anurum* sobreviveu após quatro dias de exposição a 0,19 mg/L de cádmio (Figura 1.2A). O tempo médio de sobrevivência para o controle (284 h) foi aproximadamente 4,5 vezes maior que o tempo de sobrevivência para ninfas expostas ao cádmio (63 h) (Figura 1.2A). No entanto, para o bioensaio com recuperação não houve diferença significativa entre o controle e expostos ao cádmio ( $P > 0,05$ ) (Figura 1.2B).

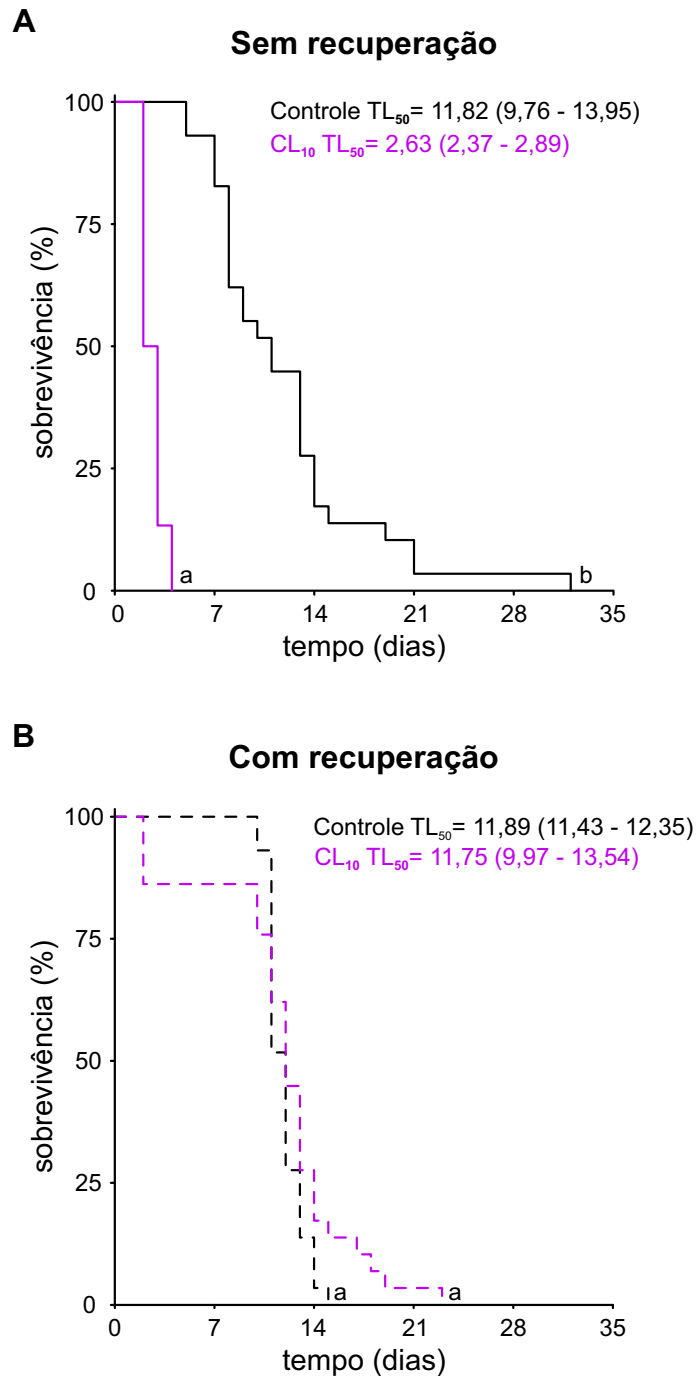


Figura 1.2: Curvas de sobrevivência (A) sem recuperação e (B) com recuperação de ninfas de *B. anurum* expostas ao cádmio e controle. Médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Holm-Sidak.

### 1.3.3 Bioensaio de habilidade predatória

A análise de variância com medida repetida no tempo para o primeiro dia de avaliação mostrou efeito apenas da variável tempo ( $F_{(8,53)} = 4,73$ ;  $P < 0,0002$ ), enquanto as demais variáveis e interações entre elas não foram significativas (Tabela 1.1, Figura 1.3).

Tabela 1.1: Análise de variância com medida repetida no tempo para o número médio de larvas predadas de *A. aegypti* por *B. anurum*, após 24h de exposição ao cádmio.

Fontes de variação	gl	F	P
Entre fatores			
Cádmio (C)	1	1,00	0,321
Densidade (D)	2	0,59	0,555
C x D	2	0,16	0,850
Erro	60	-	-

	gl <sub>den</sub>	gl <sub>num</sub>	Wilks' lambda	F	P
Dentro de cada fator					
Tempo (T)	53	8	0,583	4,73	<0,0002*
T x C	53	8	0,948	0,36	<0,9377
T x D	106	16	0,832	0,64	0,8466
T x C x D	106	16	0,696	1,31	0,2032

Após 24 horas de exposição ao cádmio, os insetos das três densidades tiveram o consumo larval semelhante ao do controle, mantendo-se de maneira constante ao longo do tempo (Figura 1.3). No entanto, na maior densidade, podemos observar que os insetos expostos ao cádmio apresentaram uma redução na predação ao longo das avaliações, porém essa redução não foi significativa (Figura 1.3C).

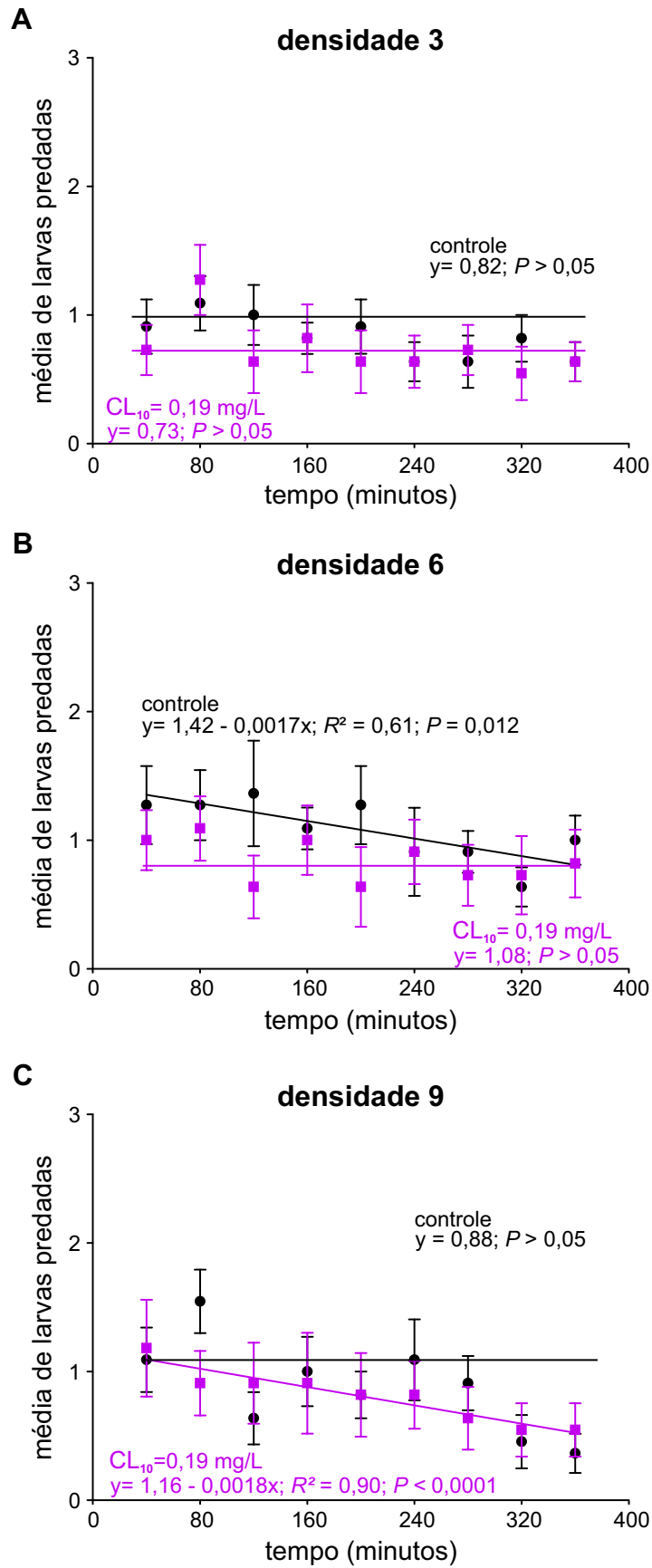


Figura 1.3: Número médio ( $\pm$ EP) de larvas de *A. aegypti* predadas por *B. anurum* em diferentes densidades, após 24h de exposição do predador ao cádmio. (A) densidade três, (B) seis e (C) nove.

A análise de variância com medida repetida no tempo ao longo de todos os dias de avaliação mostrou efeito do tempo ( $F_{(8,53)} = 72,79$ ;  $P = 0,0001$ ), densidade ( $F_{(1,2)} = 8,78$ ;  $P = 0,0005$ ), interação entre tempo e cádmio ( $F_{(8,53)} = 3,52$ ;  $P = 0,02$ ) e entre tempo e densidade ( $F_{(6,116)} = 5,90$ ;  $P = 0,0001$ ) (Tabela 1.2, Figura 1.4).

Tabela 1.2: Análise de variância com medidas repetidas no tempo para a predação diária de larvas predadas de *Aedes aegypti* por *Belostoma anurum*.

Fontes de variação	gl	F	P
Entre fatores			
Cádmio (C)	1	0,05	0,8296
Densidade (D)	2	8,78	0,0005*
C x D	2	0,99	0,3769
Erro	60	-	-

	gl <sub>den</sub>	gl <sub>num</sub>	Wilks' lambda	F	P
Dentro de cada fator					
Tempo (T)	58	3	0,209	72,79	0,0001*
T x C	58	3	0,845	3,52	0,0205*
T x D	116	6	0,587	5,90	0,0001*
T x C x D	116	6	0,916	0,86	0,5236

Ao longo das avaliações, os tratamentos nas menores densidades (i.e. três e seis larvas) tiveram um comportamento predatório similar, onde o número de larvas predadas não diferiram e o consumo ocorreu de forma linear e com redução ao longo dos dias (Figura 1.4A e B). Porém na densidade de nove larvas as ninfas de *B. anurum* expostas apresentaram um pico de consumo no segundo dia de avaliação, apresentando um comportamento diferente do observado nas demais densidades, mostrando uma possível recuperação da habilidade predatória (Figura 1.4C).

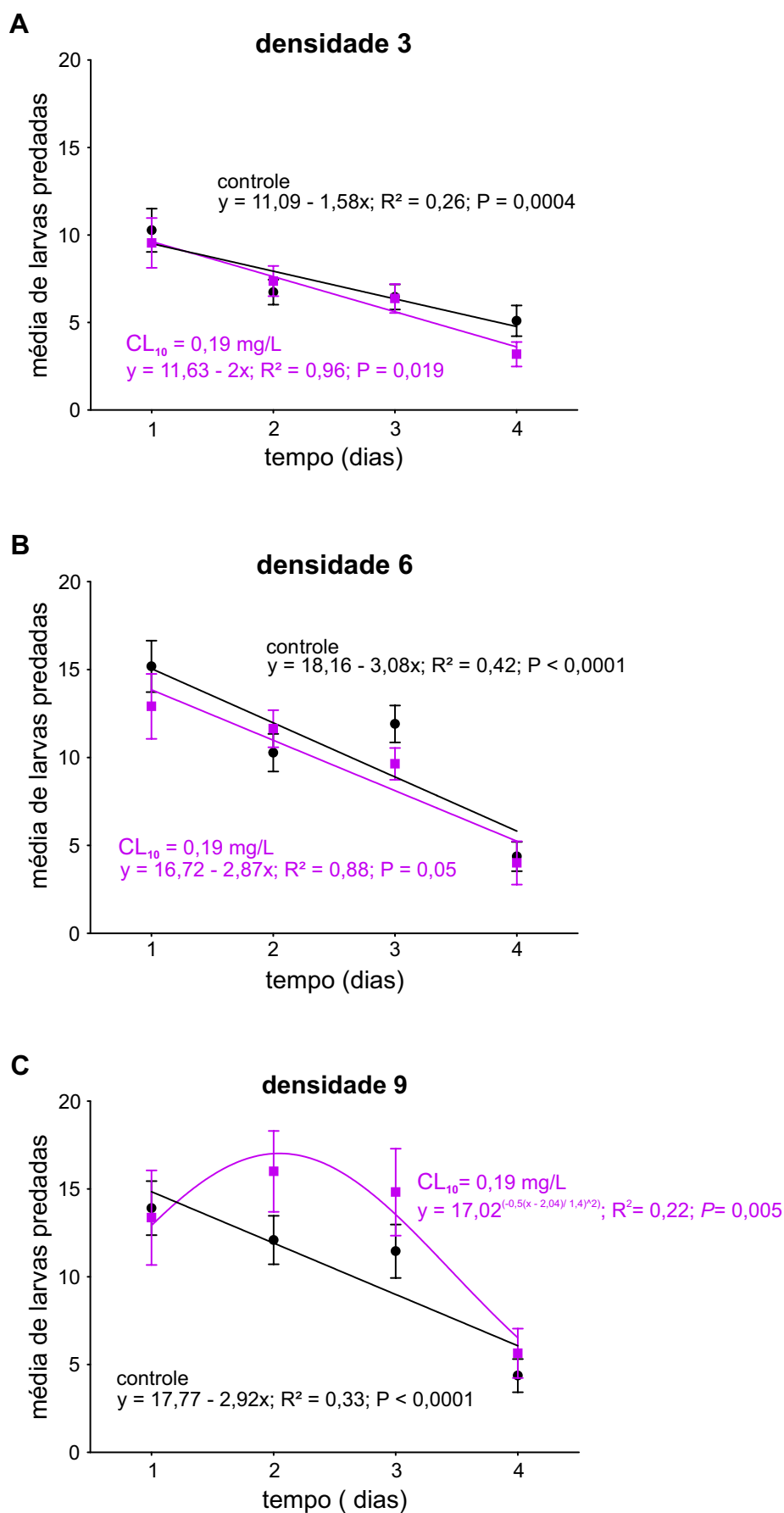


Figura 1.4: Número médio diário ( $\pm EP$ ) de larvas de *A. aegypti* predadas por *B. anurum* em diferentes densidades. (A) densidade três, (B) seis e (C) nove.



No entanto, o consumo total de larvas não foi afetado pelo pico de consumo, de forma que não houve diferença significativa entre os tratamentos para nenhuma das densidades avaliadas (Figura 1.5).

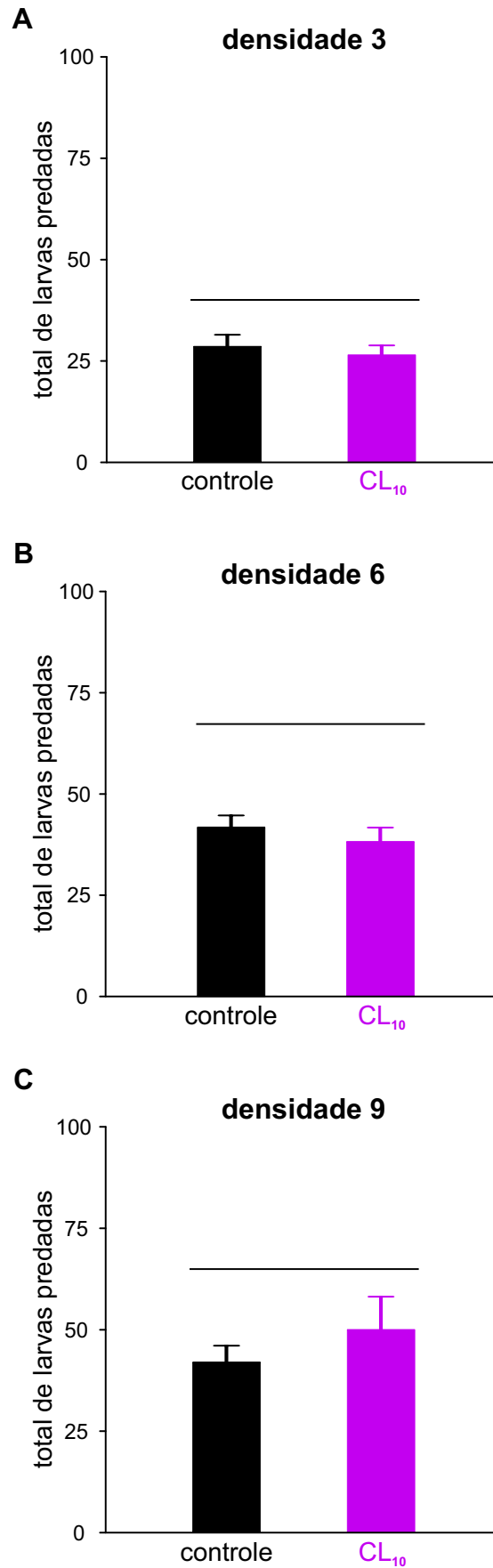


Figura 1.5: Total de larvas ( $\pm EP$ ) de *A. aegypti* predadas por *B. anurum* na densidade três (A), seis (B), e nove (C). Médias seguidas por linhas de mesma altura não diferem estatisticamente entre si.

#### 1.3.4 Marcadores de estresse oxidativo

A mensuração dos marcadores de estresse oxidativo mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos para SOD ( $P= 0,66$ ), CAT ( $P= 0,47$ ), GST ( $P= 0,86$ ) e NO ( $P= 0,58$ ) (Figura 1.6A, B, C e D). No entanto, para o MDA ( $P= 0,001$ ) os insetos que foram expostos ao cádmio por 24h apresentaram um aumento em aproximadamente três vezes ( $20,3\text{nmol/mg/prot}^{-1}$ ) dos valores para esse marcador quando comparados ao controle ( $6,3\text{ nmol/mg/prot}^{-1}$ ) (Figura 1.6E).

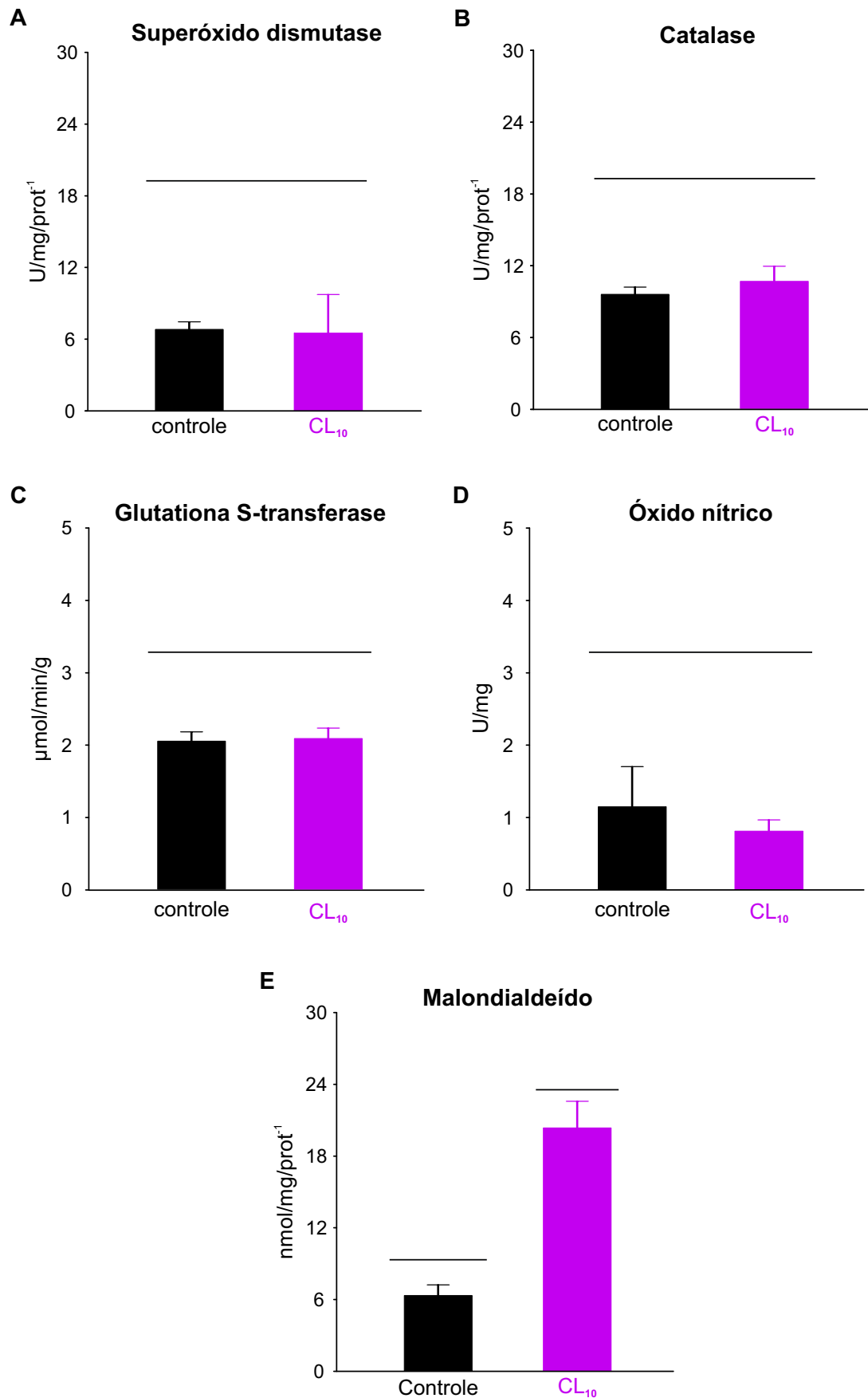


Figura 1.6: Mensuração da atividade das enzimas Superóxido dismutase (A), Catalase (B) e Glutathione S-Transferase (C) e das concentrações de Óxido nítrico (D) e Malondialdeído (E) em ninfas de *B. anurum* expostas ao cádmio e do controle (água destilada). Médias seguidas por linhas de mesma altura não diferem estatisticamente entre si.

## 1.4 Discussão

O presente estudo mostrou que houve redução da sobrevivência das ninfas quando considerado uma exposição que representaria o pior cenário (i.e., exposição prolongada e sem alimento) de exposição, porém a concentração de cádmio testada não alterou o comportamento predatório de ninfas de *B. anurum*. No entanto, essa concentração foi o suficiente para causar uma mudança fisiológica que foi mensurada através do estresse oxidativo.

A sobrevivência das ninfas expostas e do controle variou de acordo com a metodologia de exposição utilizada nos bioensaios, de modo que só houve diferença na sobrevivência entre os tratamentos apenas para o bioensaio sem recuperação, de modo que todas as ninfas estavam mortas em aproximadamente quatro dias. Em contrapartida, um curto período de exposição juntamente com a oferta de alimento foram capazes de reduzir a mortalidade, aumentando assim a sobrevivência de insetos mesmo após a exposição, de modo que não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Baseado nos resultados provavelmente a não alteração do comportamento predatório pode ser devido ao tempo e à via de exposição (i.e., água/contato) escolhidos. Trabalhos envolvendo mudanças comportamentais em vertebrados e invertebrados aquáticos após a exposição ao cádmio mostram que o efeito é mais pronunciado quando se tem um maior tempo de exposição (Brix et al. 2005; Sullivan et al. 1978). Além disso, outros trabalhos envolvendo insetos aquáticos mostraram um maior efeito do cádmio sobre o organismo quando a via de exposição é pela dieta (Xie and Buchwalter 2011; Martin et al. 2007; Timmermans et al. 1992). Este maior efeito da via de exposição pela dieta pode ser em decorrência do cádmio ser absorvido pelos canais de cálcio nos insetos e o intestino ser o local em que o cádmio é mais acumulado e local também que o cálcio é absorvido (Craig et al. 1999; Hare et al. 1991; Seidman et al. 1986).

O consumo de larvas de *A. aegypti* por ninfas de *B. anurum* foi menor quando o predador foi exposto a CL<sub>10</sub> de cádmio, sendo observado esse comportamento para a menor densidade e intermediária. Embora a predação tenha sido menor não foi o suficiente para capturar uma diferença entre os tratamentos, mostrando que o cádmio não afeta o comportamento predatório desse inseto. Na maior densidade o efeito da

exposição ao cádmio foi maior logo após a exposição, ou seja, no primeiro dia de avaliação que corresponde a 24h após a exposição, porém os insetos expostos tiveram uma recuperação na habilidade predatória, passando a predaar mais do que o controle nos dias seguintes, sendo observado um pico no consumo. Esse aumento da predação de insetos que foram expostos não foi o suficiente para mostrar diferença na predação entre ambos os tratamentos. No entanto, podemos sugerir que esse aumento poderia ser uma resposta compensatória a exposição, já que a metabolização e realocação do metal tem um certo custo para o inseto e também por ser a maior densidade e como consequência maior disponibilidade larval (Kliot and Ghanim 2012).

Os insetos possuem um sistema de defesa antioxidante estrategicamente similar ao dos vertebrados (Pardini 1995). As enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx) e Glutathione redutase (GSR) apresentam papel fundamental na proteção contra o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio, que pode ser causado por contaminantes externos como metais pesados, pesticidas, herbicidas e outros (Ahmad 1995). Além disso, os insetos também contam com monooxigenases, esterases e glutathione S-transferase como enzimas detoxificativas para uma ampla gama de compostos (Lagadic et al. 1994).

Os nossos resultados mostram que não houve diferença dos níveis das enzimas antioxidantes entre os tratamentos, porém houve alteração do biomarcador de peroxidação lipídica (MDA) nos insetos expostos ao cádmio. Baseado nisso podemos sugerir que os resultados encontrados podem ser decorrentes do tempo de exposição bem como da dose utilizada. Essas duas variáveis em conjunto poderiam estar fazendo com que o sistema de defesa antioxidante não tenha tido tempo para ser ativado e respondido ao metal na tentativa de proteger contra a ação do mesmo, ocasionando diretamente peroxidação lipídica (MDA) das membranas celulares. Esse efeito do tempo de exposição e da dose também foi observado por Djukić-Ćosić et al. (2008), em que ratos que tiveram uma exposição aguda apresentaram aumento do MDA, principalmente 24h após a administração do cádmio.

Estudos com peixes envolvendo o mesmo tempo de exposição e doses moderadas também tiveram esse mesmo comportamento no perfil enzimático, bem como o aumento apenas do MDA, sugerindo que esse marcador seria uma resposta precoce e mais sensível para a exposição ao cádmio (Manca et al. 1991; Manca et al. 1991a; Müller

1986). Além disso, a exposição a altas concentrações de cádmio por um curto período de tempo mostra afetar diversos eventos que levam a toxicidade, sugerindo assim que a peroxidação lipídica acompanharia esses eventos, embora não pareça ser a responsável pelos mesmos (Stacey et al. 1980; Stacey and Kappus 1982; Gabor et al. 1978).

A alteração do biomarcador de peroxidação lipídica (MDA) encontrada nos insetos expostos ao cádmio é condizente com o que já foi relatado em outros trabalhos envolvendo metais pesados, uma vez que se é conhecido que metais de transição (como ferro, cádmio, mercúrio e cobre) são responsáveis por induzir o aumento de níveis de peroxidação lipídica em diversos organismos vivos como ratos, peixes, moluscos bivalves marinhos e outros insetos aquáticos (Sarkar et al. 1995; Bainy et al. 1996; Vlahogianni and Valavanidis 2007; Barata et al. 2005).

Em conclusão, a presença do cádmio no ecossistema aquático pode causar efeitos na entomofauna presente. A concentração subletal de cádmio utilizada por um curto período de exposição não foi capaz de afetar a habilidade predatória, porém ocasionou redução na sobrevivência e foi capaz de induzir estresse oxidativo nesse inseto predador aquático.

## 1.5 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## 1.6 Referências

- Aebi, E. H. (1984). Catalase in vitro. in methods in enzymatic analysis. edited by: Bergmeyer hu. *Academic press New York*.
- Ahmad, S. (1995). Oxidative stress from environmental pollutants. *Archives of insect biochemistry and physiology* 29(2), 135–157.
- Arias, A. R. L., D. F. Buss, C. d. Albuquerque, A. F. Inácio, M. M. Freire, M. Egler, R. Mugnai, and D. F. Baptista (2007). Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva* 12, 61–72.

- Bainy, A. C., E. Saito, P. S. Carvalho, and V. B. Junqueira (1996, feb). Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology* 34(2), 151–162.
- Barata, C., I. Lekumberri, M. Vila-Escalé, N. Prat, and C. Porte (2005). Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquatic toxicology* 74(1), 3–19.
- Brix, K. V., D. K. DeForest, M. Burger, and W. J. Adams (2005, dec). Assessing the relative sensitivity of aquatic organisms to divalent metals and their representation in toxicity datasets compared to natural aquatic communities. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 11(6), 1139–1156.
- Chandran, R., A. Sivakumar, S. Mohandass, and M. Aruchami (2005). Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 140(3-4), 422–426.
- Craig, A., L. Hare, and A. Tessier (1999, feb). Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri*. *Aquatic Toxicology* 44(4), 255–262.
- Dieterich, S., U. Bieligk, K. Beulich, G. Hasenfuss, and J. Prestle (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 101, 33–39.
- Djukić-Čosić, D., M. Č. Jovanović, Z. P. Bulat, M. Ninković, Ž. Maličević, and V. Matović (2008, mar). Relation between lipid peroxidation and iron concentration in mouse liver after acute and subacute cadmium intoxication. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22(1), 66–72.
- Figueiredo de Andrade, C. A., D. J. Santana, and S. P. de Carvalho-e Silva (2010). Predation on *Scinax x-signatus* (Anura: Hylidae) by the giant water bug *Lethocerus annulipes* (Hemiptera: Belostomatidae) in a Brazilian restinga habitat. *Amphibia Reptilia* 14, 307–309.
- Gabor, S., Z. Anca, and E. Bordas (1978). Cadmium-induced lipid peroxidation in kidney and testes—effect of zinc and copper. *Revue Roumaine de Biochimie* 15(2), 113–117.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby (1974, November). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry* 249, 7130–7139.
- Halstead, N. T., D. J. Civitello, and J. R. Rohr (2015, sep). Comparative toxicities of organophosphate and pyrethroid insecticides to aquatic macroarthropods. *Chemosphere* 135, 265–271.



- Hare, L., A. Tessier, and P. G. C. Campbell (1991, aug). Trace element distributions in aquatic insects: Variations among genera, elements, and lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48(8), 1481–1491.
- Jaishankar, M., T. Tseten, N. Anbalagan, B. B. Mathew, and K. N. Beeregowda (2014, jun). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology* 7(2), 60–72.
- Kliot, A. and M. Ghanim (2012, sep). Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management Science* 68(11), 1431–1437.
- Kraus, M. L. and D. B. Kraus (1986). Differences in the effects of mercury on predator avoidance in two populations of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Marine Environmental Research* 18(4), 277–289.
- Lagadic, L., T. Caquet, and F. Ramade (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3(3), 193–208.
- Livingstone, D. R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 57(3), 195–211.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951, November). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265–275.
- Lucu, C. and V. Obersnel (1996, jul). Cadmium influx across isolated carcinus gill epithelium interaction of lanthanum and calcium with cadmium influxes. *Journal of Comparative Physiology B* 166(3), 184–189.
- Manca, D., A. C. Ricard, B. Trottier, and G. Chevalier (1991a). Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology* 67(3), 303–323.
- Manca, D., A. C. Ricard, R. Vincent, B. Trottier, H. V. Tra, and G. Chevalier (1991). Lipid peroxidation in rats subacutely exposed to a low concentration of aerosolized cadmium chloride. *Inhalation Toxicology* 3, 419–433.
- Marriel, N. B., H. V. V. Tomé, R. C. N. Guedes, and G. F. Martins (2016, June). Deltamethrin-mediated survival, behavior, and oenocyte morphology of insecticide-susceptible and resistant yellow fever mosquitos (*Aedes aegypti*). *Acta tropica* 158, 88–96.
- Martin, C. A., S. N. Luoma, D. J. Cain, and D. B. Buchwalter (2007). Cadmium ecophysiology in seven stonefly (plecoptera) species: delineating sources and estimating susceptibility. *Environmental science & technology* 41(20), 7171–7177.

- Müller, L. (1986). Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicology* 40(3), 285–295.
- Nicholson, S. and P. Lam (2005, jan). Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International* 31(1), 121–132.
- Nieboer, E. and D. H. Richardson (1980, jan). The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical* 1(1), 3–26.
- Pardini, R. S. (1995). Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Archives of insect biochemistry and physiology* 29(2), 101–118.
- Rashed, M. (2001). Monitoring of environmental heavy metals in fish from nasser lake. *Environment international* 27(1), 27–33.
- Sandheinrich, M. B. and G. J. Atchison (1990, jan). Sublethal toxicant effects on fish foraging behavior: Empirical vs. mechanistic approaches. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9(1), 107–119.
- Sarkar, S., P. Yadav, R. Trivedi, A. Bansal, and D. Bhatnagar (1995). Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 9(3), 144–149.
- Schwarzenbach, R. P. (2006, aug). The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313(5790), 1072–1077.
- Seidman, L. A., G. Bergtrom, and C. C. Remsen (1986). Structure of the larval midgut of the fly *Chironomus thummi* and its relationship to sites of cadmium sequestration. *Tissue and Cell* 18(3), 407–418.
- Shalan, E. A.-S. and D. V. Canyon (2009, December). Aquatic insect predators and mosquito control. *Tropical biomedicine* 26, 223–261.
- Sidoumou, Z., M. Gnassia-Barelli, and M. Roméo (1997, February). Cadmium and calcium uptake in the mollusc *Donax rugosus* and effect of a calcium channel blocker. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 58, 318–325.
- Stacey, N. H., L. R. Cantilena Jr, and C. D. Klaassen (1980). Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology* 53(3), 470–480.
- Stacey, N. H. and H. Kappus (1982). Comparison of methods of assessment of metal-induced lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues* 9(2), 277–285.

- Sullivan, J., G. Atchison, D. Kolar, and A. McIntosh (1978). Changes in the predator-prey behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*) caused by cadmium. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 35(4), 446–451.
- Timmermans, K. R., E. Spijkerman, M. Tonkes, and H. Govers (1992). Cadmium and zinc uptake by two species of aquatic invertebrate predators from dietary and aqueous sources. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49(4), 655–662.
- Toledo, L. F. (2003, dec). Predation on seven south american anuran species by water bugs (Belostomatidae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology* 2(2), 105.
- Valbon, W. R., F. M. Cruz, G. S. Ramos, H. V. V. Tome, and E. E. Oliveira (2018, January). Sublethal exposure to deltamethrin reduces the abilities of giant water bugs to prey upon *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 191, 350–356.
- Ventura, E., L. Gaelzer, J. Zanette, M. Marques, and A. Bainy (2002, sep). Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of rio de janeiro coast. *Marine Environmental Research* 54(3-5), 775–779.
- Vlahogianni, T. and A. Valavanidis (2007). Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chemistry and Ecology* 23(5), 361–371.
- Wallace, W. G., T. M. H. Brouwer, M. Brouwer, and G. R. Lopez (2000, apr). Alterations in prey capture and induction of metallothioneins in grass shrimp fed cadmium-contaminated prey. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(4), 962–971.
- Wallin, B., B. Rosengren, H. G. Shertzer, and G. Camejo (1993). Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: Its use for evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry* 208, 10–15.
- Weber, D. N. and R. E. Spieler (1994). Behavioral mechanisms of metal toxicity in fishes. *Aquatic Toxicology, Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*.
- Weis, J. S. and A. A. Khan (1991, jan). Notes: Reduction in prey capture ability and condition of mummichogs from a polluted habitat. *Transactions of the American Fisheries Society* 120(1), 127–129.
- Whaley, M., R. Garcia, and J. Sy (1989). Acute bioassays with benthic macroinvertebrates conducted in situ. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 43(4), 570–575.
- Xie, L. and D. B. Buchwalter (2011). Cadmium exposure route affects antioxidant responses in the mayfly *Centroptilum triangulifer*. *Aquatic toxicology* 105(3-4), 199–205.

Zanette, J., F. F. Nunes, I. D. Medeiros, M. N. Siebert, J. J. Mattos, K. H. Lüchmann, C. M. R. de Melo, and A. C. D. Bainy (2008, jul). Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. *Marine Environmental Research* 66(1), 196–198.

**Capítulo 2 - Efeito das diferentes vias de  
exposição ao cádmio na habilidade  
predatória e nos biomarcadores de estresse  
oxidativo de ninfas de *Belostoma anurum*  
(Hemiptera: Belostomatidae)**

## **Efeito das diferentes vias de exposição ao cádmio na habilidade predatória e nos biomarcadores de estresse oxidativo de ninfas de *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae)**

### **Resumo**

Os organismos aquáticos podem acumular poluentes diretamente da água, sedimentos e de suas dietas. Com o intuito de impedir os possíveis danos desses poluentes, os organismos contam com um sistema de defesa, no entanto essa defesa pode ter custos associados, que podem gerar efeitos fisiológicos e/ou comportamentais. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do metal pesado cádmio quando considerado duas vias de exposição (água e dieta) e os efeitos subletais desta exposição em marcadores de estresse oxidativo tecidual e habilidade predatória da barata d'água, *B. anurum* (Hemiptera: Belostomatidae). Larvas de *A. aegypti* e ninfas de *B. anurum* foram obtidas da criação estabelecida em laboratório. Para a avaliação das diferentes vias de exposição (i.e., água/contato e dieta/ingestão), um grupo de ninfas de segundo instar de *B. anurum* foi exposto ao cádmio por 96 horas para avaliar a exposição por contato, ao passo que outro grupo de ninfas foi exposto à água destilada também por 96h e ao mesmo tempo receberam larvas de *A. aegypti* previamente contaminadas com cádmio (4 mg/L). No controle as ninfas foram mantidas em água destilada e receberam larvas não contaminadas. Ao final das exposições, os insetos sobreviventes foram congelados a -80 °C para posterior análise de estresse oxidativo. Além disso, também foi avaliada a habilidade predatória de ninfas que foram expostas as diferentes vias de exposição ao cádmio, em que foram oferecidas três densidades larvais (i.e., 3,6 e 9 larvas). A via de exposição por contato não teve efeito sobre as enzimas antioxidantes e no marcador de peroxidação lipídica. No entanto, a exposição pela dieta aumentou significativamente a atividade da superóxido dismutase e catalase e o nível do marcador de peroxidação lipídica (MDA), por outro lado houve redução da concentração da glutathione S-transferase. A habilidade predatória de ninfas de *B. anurum* foi afetada em todas as vias de exposição. Quando considerado a exposição por contato, ninfas da densidade intermediária predaram mais do que o controle, e quando a via de exposição foi pela dieta as ninfas que receberam as larvas contaminadas na menor densidade predaram menos que o controle. Os resultados indicam que independentemente da via de exposição, a exposição ao cádmio afeta a habilidade predatória de *B. anurum* e que baseado nas alterações dos biomarcadores de estresse oxidativo o cádmio adquirido pela dieta é potencialmente mais tóxico do que o dissolvido. Assim, nesse cenário de exposição o cádmio apresenta capacidade de gerar estresse oxidativo e mudanças na predação de ninfas de *B. anurum*, e isso pode causar um desequilíbrio populacional, ressaltando mais uma vez a importância do conhecimento da contribui-

ção que cada via de exposição possui sobre os aspectos comportamentais e fisiológicos desse inseto.

**Palavras-chave:** vias de exposição, estresse oxidativo, comportamento predatório, barata-d'água.

## Abstract

Aquatic organisms can accumulate pollutants directly from water, sediments and their diets. In order to prevent the possible damages of these pollutants, the organisms have a defense system, however this defense can have associated costs, which can generate physiological and / or behavioral effects. The objective of this work was to evaluate the toxicity of heavy metal cadmium when considering two routes of exposure (water and diet) and the sublethal effects of this exposure on markers of tissue oxidative stress and predatory ability of the giant water bug, *B. anurum* (Hemiptera: Belostomatidae). Larvae of *A. aegypti* and *B. anurum* nymphs were obtained from the rearing establishment in the laboratory. In order to evaluate the different routes of exposure (ie, water / contact and diet / intake), a group of second instar nymphs of *B. anurum* was exposed to cadmium for 96 hours to assess contact exposure, while another group of nymphs were exposed to distilled water for 96 hours and at the same time received *A. aegypti* larvae previously contaminated with cadmium (4 mg / L). In control the nymphs were kept in distilled water and received uncontaminated larvae. At the end of the exposures, the surviving insects were frozen at -80 ° C for further analysis of oxidative stress. In addition, we also evaluated the predatory ability of nymphs that were exposed to different pathways of exposure to cadmium, in which three larval densities (i.e., 3.6 and 9 larvae) were offered. The contact exposure route had no effect on the antioxidant enzymes and on the lipid peroxidation marker. However, dietary exposure significantly increased the activity of superoxide dismutase and catalase and the level of lipid peroxidation marker (MDA), on the other hand there was a reduction in glutathione S-transferase concentration. The predatory ability of *B. anurum* nymphs was affected in all routes of exposure. When considered exposure by contact, intermediate density nymphs predated more than control, and when the route of exposure was by diet the nymphs that received the contaminated larvae at lower density predated less than control. The results indicate that regardless of the route of exposure, the exposure to cadmium affects the predatory ability of *B. anurum* and that based on changes in oxidative stress biomarkers the cadmium acquired by the diet is potentially more toxic than dissolved. Thus, in this scenario of exposure, cadmium has the capacity to generate oxidative stress and changes in the predation of *B. anurum* nymphs, and this may cause a population imbalance, emphasizing once again the importance of knowing the contribution that each route of exposure has on the behavioral and physiological aspects of this insect.

**Key words:** pathways of exposure, oxidative stress, predatory behavior, giant water bug.

## 2.1 Introdução

O uso antropogênico de metais pesado desde o início da era da industrialização resultou no aumento da liberação de metais no ambiente, excedendo assim as concentrações naturalmente encontradas (Nriagu and Pacyna 1988). Os ecossistemas de água doce são os mais vulneráveis à poluição da água, pois são muitas vezes o depósito final de diversos poluentes. Devido ao acúmulo de metais pesados no ecossistema, seus efeitos indesejáveis sobre os organismos aquáticos já são conhecidos, podendo ocasionar alterações ecológicas negativas como aumento ou diminuição da densidade populacional de algumas espécies, ou ainda interferência das relações predador-presa (Bervoets et al. 2005; Clements et al. 2000; Norwood et al. 2003).

Os metais pesados mais comuns encontrados em ecossistemas são cromo, cobre, chumbo, manganês, níquel, zinco e cádmio (Beasley and Kneale 2002). O cádmio é um contaminante ambiental altamente tóxico (Ercal et al. 2001). É comumente originado de atividades humanas como mineração, produção e uso de baterias, usado também no processo de galvanização e como pigmento de cor em tintas, além de ser um subproduto da mineração de zinco e chumbo (Lijun et al. 2005; Stohs and Bagchi 1995). O cádmio é responsável por gerar diversos distúrbios biológicos como a indução de estresse oxidativo resultante da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Stohs et al. 2000). Essa desregulação na produção de EROS tem como consequência a peroxidação dos lipídios, danos as proteínas e finalmente dano ao DNA (Cuny et al. 2004).

Os organismos aquáticos podem acumular metais através do contato direto com a água, alimentos ou sedimentos contaminados (Naimo 1995). Embora existam diferentes trabalhos sobre o acúmulo e os efeitos de metais nesses organismos (Barata et al. 2002), a grande maioria envolve principalmente a via de exposição do ambiente aquático (Chanu et al. 2017; Cervera et al. 2003). No entanto, organismos aquáticos também consomem alimento contaminado e recentes estudos mostraram que a rota de exposição escolhida possui grande importância e influência para a obtenção dos resultados e muitas vezes é o dominante para eles (Wang 2013; Xie et al. 2010; Ferrero et al. 2017).

A via de exposição pela dieta permanece relativamente pouco estudada, principalmente quando se envolve insetos aquáticos (Xie and Buchwalter 2011; Poteat and Bu-



chwalter 2013; Munger and Hare 1997). A exposição por contato ao metal pode levar a acumulação nos tecidos, o que pode gerar estresse oxidativo e morte celular. Porém, muitos organismos aquáticos contam com um sistema de defesa (i.e., antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e enzimas detoxificativas) com a função de evitar, eliminar e desintoxicar os poluentes (Ahmad 1995; Pardini 1995). Caso esse sistema de defesa falhe, o organismo por ter como consequência extrema a morte. Por outro lado, se a defesa for suficiente, isso pode gerar um custo para o organismo, este custo frequentemente resulta em alterações comportamentais e/ou fisiológicas (Calow 1991).

No entanto, informações acerca da importância das diferentes vias de exposição a metais pesados, bem como as possíveis alterações fisiológicas e comportamentais em insetos aquáticos predadores são escassos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do metal pesado cádmio quando considerado duas vias de exposição (água e dieta) e os efeitos subletais destas diferentes vias em marcadores de estresse oxidativo e na habilidade predatória da barata d'água, *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae).

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Obtenção e criação dos insetos

*Belostoma anurum*: Os insetos foram obtidos a partir da criação já estabelecida no Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados da Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG) sob condições controladas ( $27\pm 2$  °C,  $60\pm 20\%$  UR, fotofase de 12h) (Valbon et al. 2018). Os adultos foram mantidos em aquário (30 x 40 x 60 cm) para que a cópula ocorresse livremente, após isso as fêmeas depositam os ovos no hemiélitro de machos adultos. Os machos com ovos no hemiélitro foram individualizados em potes de plásticos perfurados (10,9 x 9,2 x 7,5 cm) colocados em bandejas com água e aquecedor e foram alimentados com *Buenoa* spp. e *Martarega* spp. (Hemiptera: Notonectidae) até a emergência das ninfas. Após a emergência, as ninfas foram individualizadas em frascos de vidro (30 mL) até o quarto instar para evitar o canibalismo. As ninfas ao atingirem o quarto instar foram transferidas para

recipientes de plástico maiores (100 mL) onde completaram o seu desenvolvimento e ficaram até a fase de adulto. Ninfas do primeiro ao terceiro instar foram alimentadas diariamente com larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), enquanto as de quarto e quinto instar foram alimentadas com *Buenoa* spp. e *Martarega* spp., estes que foram coletados no setor de piscicultura da UFV. Todas as ninfas foram mantidas em água destilada e os adultos de *B. anurum* em água declorada.

*Aedes aegypti*: Larvas de quarto instar (L4) foram obtidas da criação mantida no insetário do Departamento de Biologia Geral da UFV sob condições controladas ( $25\pm 2$  °C,  $60\pm 20\%$  UR, fotofase de 12h) (Marriel et al. 2016).

### 2.2.2 Metal pesado - Cádmio

Soluções estoques do metal pesado cádmio (Cloreto de Cádmio Monohidratado Puro® [CdCl<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O 55,83% Cd] Merck Group, Darmstadt, Alemanha) foram diluídas e mantidas em laboratório durante o período experimental. As concentrações do metal pesado foram preparadas mediante a diluição em recipientes de vidro contendo água destilada.

### 2.2.3 Bioensaio de concentração-mortalidade

Ninfas de segundo instar de *B. anurum* (0-72h após a ecdise) foram expostas individualmente às concentrações de 0,001; 0,002; 0,006; 0,01; 0,06 e 0,19 mg/L de cádmio em recipientes de vidro contendo 100 ml da solução e cobertos com tecido organza. Para cada concentração foram feitas quatro repetições de 10 insetos cada. A mortalidade foi avaliada a cada 24h nas concentrações citadas anteriormente totalizando 96h de exposição. No tratamento controle os insetos foram expostos à água destilada. Insetos sem movimentação após estímulos mecânicos com uma pipeta foram considerados mortos. Os insetos foram mantidos em condições controladas ( $27\pm 2$  °C,  $60\pm 20\%$  UR, fotofase de 12h) no Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados da UFV e durante a exposição os insetos não foram alimentados.

## 2.2.4 Bioensaio de predação

### 2.2.4.1 Bioensaio de predação com exposição por contato

Ninfas de segundo instar de *B. anurum* (0-72h após a ecdise) foram expostas à concentração de cádmio correspondente a  $CL_{10}$  (0,004 mg/L) obtida no bioensaio de concentração-mortalidade para 96h de exposição. Os insetos permaneceram durante todo o experimento em contato com o metal pesado. Foram oferecidas larvas L4 de *A. aegypti* em três densidades (3, 6 e 9 larvas) para observar o comportamento predatório das ninfas em um ambiente contaminado. Foi avaliado o número de larvas predadas em intervalos de 40 minutos durante seis horas, e ao fim de cada avaliação foi restabelecido o número inicial de larvas. A avaliação do número de larvas predadas foi conduzida ao longo de quatro dias e para cada tratamento foram feitas 12 repetições (insetos) (Valbon et al. 2018).

### 2.2.4.2 Bioensaio de predação com exposição pela dieta

Ninfas de segundo instar de *B. anurum* (0-72h após a ecdise) foram acondicionadas em recipientes de vidro com 100 mL de água destilada e ficaram por uma hora para aclimação. Decorrido esse período, foram oferecidas larvas L4 de *A. aegypti* em três densidades (3, 6 e 9 larvas). As larvas foram expostas a uma concentração subletal (4 mg/L) de cádmio obtida da curva de concentração mortalidade de 24h previamente feita para as larvas de *A. aegypti*. A exposição foi feita por 24h e após esse período as larvas sobreviventes foram transferidas para recipientes de vidro com 100 mL de água destilada, onde permaneceram até a sua utilização. A exposição de novas larvas ocorreu ao longo de toda a condução do experimento. Foi avaliado o número de larvas predadas em intervalos de 40min durante seis horas, e ao fim de cada avaliação foi restabelecido o número inicial de larvas. A avaliação do número de larvas predadas foi conduzida ao longo de quatro dias e para cada tratamento foram feitas 10 repetições (insetos) (Valbon et al. 2018).

### 2.2.5 Marcadores de estresse oxidativo

A fim de avaliar a influência das diferentes vias de exposição ao metal pesado cádmio na fisiologia antioxidante de *B. anurum* foram mensurados os marcadores de estresse oxidativo. Esse bioensaio foi conduzido de forma similar ao bioensaio de predação, porém para esse foi selecionado apenas a densidade intermediária de larvas (i.e. 6 larvas). Foram oferecidas larvas L4 de *A. aegypti* na densidade de seis larvas tanto para o bioensaio de predação com dieta contaminada e ambiente limpo, como para o de dieta limpa e ambiente contaminado. Foi avaliado o número de larvas predadas em intervalos de 40min durante as seis horas, e ao fim de cada avaliação foi restabelecido o número inicial de larvas. A avaliação do número de larvas predadas foi conduzida ao longo de quatro dias e para cada tratamento foram feitas 25 repetições (insetos) (Valbon et al. 2018).

Os dados de predação foram coletados apenas para se constatar se o padrão de predação observado nos bioensaios anteriores permanecia o mesmo e também para proporcionar as mesmas condições de quando os bioensaios foram conduzidos, para assim se poder conhecer o perfil enzimático dos insetos mediante diferentes vias de exposição.

Ninfas de segundo instar sobreviventes dos bioensaios de predação foram armazenadas a -80 °C até a sua utilização. Cada repetição consistiu de seis ou sete insetos (peso de aproximadamente 100 mg), totalizando quatro repetições para cada tratamento e bioensaio.

Ninfas de segundo instar foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 7.4) 0.2 M com 1M EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e o homogenato resultante foi centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi passado para outro microtubo e foi utilizado para as análises da atividade de Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione-S-Transferase (GST) e dos níveis de Malondialdeído (MDA). As análises foram conduzidas no Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros do Departamento de Biologia Animal da UFV.

A atividade da enzima SOD foi medida segundo a metodologia de Dieterich et al. (2000) em leitor de microplacas ( $\lambda = 570$  nm). A reação consiste na capacidade desta enzima em catalisar superóxido  $O_2^-$  a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), diminuindo

assim a razão de auto-oxidação do pirogalol. Para isso, foi pipetado 30  $\mu\text{L}$  de cada amostra em duplicata, 45  $\mu\text{L}$  de tampão no branco, 30  $\mu\text{L}$  de tampão no padrão, 99  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 0,2M (pH 7.0) e 6  $\mu\text{L}$  de MTT ( brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) em todos e 15  $\mu\text{L}$  de pirogalol (1,2,3-benzenotriol) em todos os poços, com exceção do branco. Posteriormente, a placa foi deixada na estufa por cerca de cinco minutos e após isso foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de DMSO (Dime-tilsulfóxido) em todos os poços, e a leitura foi realizada a 570 nm. Os resultados foram expressos em Unidades/ mg proteína<sup>-1</sup>.

A enzima CAT foi mensurada de acordo com o protocolo de Aebi (1984). A atividade de CAT foi estimada pela queda da absorbância durante 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (10 mM) em tampão fosfato de potássio 0.2M (pH 7.0) e do homogenato da amostra em espectrofotômetro (leitura em  $\lambda = 240$  nm). Para a contagem foi utilizado 1000  $\mu\text{L}$  de tampão com peróxido (25 mL de tampão fosfato 7,0 pH e 40  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio em béquer com papel alumínio) e 10  $\mu\text{L}$  de amostras, as leituras foram feitas nos tempos 0, 30 e 60 segundos. Para encontrar a concentração total de CAT na amostra foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio  $\epsilon^{240} = 36 \text{ mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$  e os resultados foram expressos em Unidades/ mg proteína<sup>-1</sup>.

A atividade enzimática da GST foi quantificada de acordo com Habig et al. (1974), por meio da formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A atividade da enzima foi estimada utilizando CDNB 1 mM em etanol, Glutationa Redutase (GSH) 1 mM, fosfato de potássio (pH 7.0) 100 mM e homogenato das amostras, a mistura resultante foi adicionada no espectrofotômetro e o aumento da absorbância ( $\lambda = 340$  nm) foi verificado em 0, 30, 60 e 90s. O coeficiente de extinção molar do CDNB  $\epsilon^{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  foi utilizado para os cálculos e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{min}^{-1} / \text{g}$ .

A concentração de malondialdeído (produto da peroxidação lipídica) foi estimada como descrito por Wallin et al. (1993). Para isso, 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das amostras foram pipetadas em microtubos e então homogeneizados em 400  $\mu\text{L}$  de solução TBARS (que consiste da mistura de ácido tricloroacético (15%)/ ácido tiobarbitúrico (0,375%)/ ácido clorídrico 0,25M). Em seguida os microtubos com a solução resultante foram passados no vortéx por 10s e então foram aquecidos em banho-maria a 90 °C

por 40min. Depois foi colocado no gelo por cinco minutos e acrescido 600  $\mu\text{L}$  de álcool butílico ou n-butanol, vortéx por mais um minuto e em seguida foi centrifugado por 10min a 3000 rpm. Ao final da centrifugação a fase superior formada foi plaqueada (200  $\mu\text{L}$ ) em leitor de microplacas ( $\lambda = 540 \text{ nm}$ ). A quantificação da concentração de MDA das amostras foi determinada por meio de uma curva padrão a partir das concentrações já estabelecidas de TMPO (1, 1, 3, 3 - tetramethoxypropane). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}/ \text{mg proteína}^{-1}$ .

A concentração de proteína total foi encontrada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão. A concentração de proteína total foi utilizada para expressar a dosagem das enzimas SOD, CAT, GST e das concentrações de MDA em mg de proteína.

### 2.2.6 *Análise estatística*

A curva de concentração-mortalidade foi determinada pelo procedimento PROC PROBIT (SAS Institute, 2010). Os dados de predação larval foram submetidos à análise de variância com medida repetida no tempo para determinar o efeito do cádmio, da densidade e do tempo de recuperação (SAS Institute, 2010). O número total de larvas predadas foi submetido à análise pelo Test-t com o auxílio do software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, Califórnia, EUA). Dados obtidos para cada parâmetro avaliado no bioensaio de estresse oxidativo foram submetidos à Análise de Variância (one-way ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey utilizando o software SigmaPlot 12.0. O nível de significância foi acertado em 5%.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 *Bioensaio de concentração-mortalidade*

Os resultados encontrados para a estimação da curva de concentração-mortalidade para *B. anurum* foram adequados ao modelo de Probit. Visto que foi obtido baixo valor de  $\chi^2$  (5,98) e alto valor de  $P$  ( $>0,05$ ), o valor da  $CL_{50}$  foi de 0,02 (0,01 - 0,03) mg/L de cádmio (Figura 2.1).

A partir desse bioensaio foi escolhida a concentração que representa a  $CL_{10}$  (0,004 mg/L de cádmio) para avaliar a influência da exposição ao ambiente contaminado na habilidade predatória e no perfil enzimático desse predador aquático quando subletalmente exposto por 96h ao metal pesado cádmio, representando assim a via de exposição por meio da água/contato (Figura 2.1).

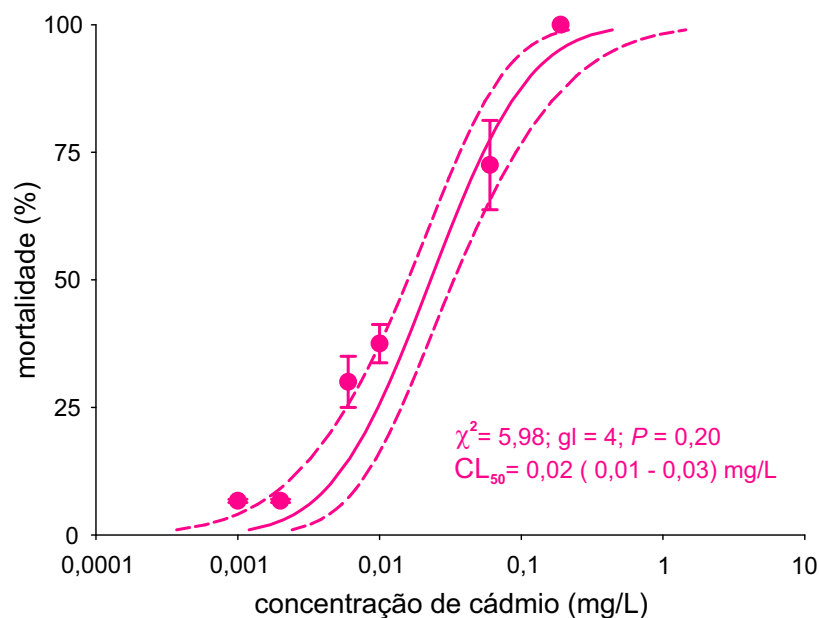


Figura 2.1: Curva concentração-mortalidade de ninfas de *B. anurum* após 96h de exposição ao cádmio. Os valores da concentração letal (CL) foram estimados baseados no bioensaio de concentração-mortalidade usando análises de Probit. Linhas pontilhadas denotam intervalos de confiança de 95%. Pontos representam a mortalidade média ( $\pm EP$ ) de cada tratamento testado.

### 2.3.2 Bioensaio de predação

#### 2.3.2.1 Bioensaio de predação com exposição por contato

Os resultados obtidos para análise de variância com medida repetida no tempo para o primeiro dia de experimento mostrou efeito das variáveis cádmio ( $F_{(1,2)} = 7,46$ ;  $P = 0,008$ ), densidade ( $F_{(1,2)} = 27,73$ ;  $P < 0,0001$ ), tempo ( $F_{(8,59)} = 13,65$ ;  $P < 0,0001$ ) e interação entre cádmio e densidade ( $F_{(1,2)} = 9,99$ ;  $P = 0,0002$ ) e tempo e densidade ( $F_{(16,118)} = 2,03$ ;  $P = 0,01$ ) (Tabela 2.1, Figura 2.2).

Nossos resultados para o primeiro dia de avaliação mostram que os insetos tratados das maiores densidades larvais (i.e., seis e nove larvas) após 24h de exposição predaram mais larvas do que o controle (Figura 2.2B e C). Porém para a menor densidade esse comportamento não foi observado, havendo uma inversão do comportamento

Tabela 2.1: Análise de variância com medidas repetidas no tempo para a predação diária de larvas predadas de *A. aegypti* por *B. anurum*, após 24h de exposição ao cádmio.

Fontes de variação	gl	F	P
Entre fatores			
Cádmio (C)	1	7,46	0,0081*
Densidade (D)	2	27,73	<0,0001*
C x D	2	9,99	0,0002*
Erro	66	-	-

	gl <sub>den</sub>	gl <sub>num</sub>	Wilks' lambda	F	P
Dentro de cada fator					
Tempo (T)	59	8	0,350	13,65	<0,0001*
T x C	59	8	0,832	1,48	0,1827
T x D	118	16	0,614	2,03	<0,0160*
T x C x D	118	16	0,674	1,60	0,0783

anteriormente observado, em que agora insetos do controle predaram mais larvas (Figura 2.2A). Para todas as densidades larvais testadas podemos observar a presença de um pico de predação entre as primeiras avaliações para os insetos expostos ao metal pesado, enquanto que o controle apresentou uma predação linear ao longo do tempo, com exceção da maior densidade larval (Figura 2.2).



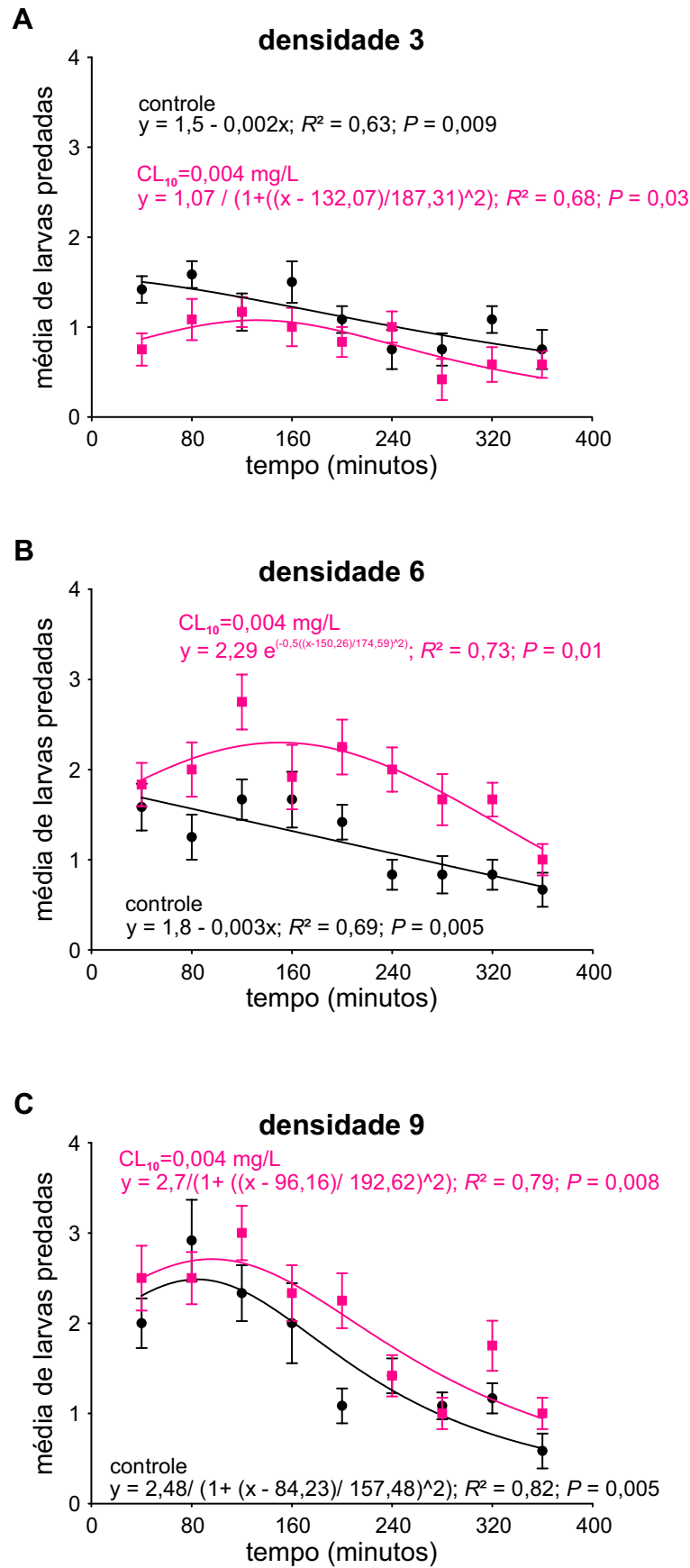


Figura 2.2: Número médio ( $\pm$ EP) de larvas de *A. aegypti* predadas por *B. anurum* em diferentes densidades, após 24h de exposição ao cádmio. (A) densidade três, (B) seis e (C) nove.

Quando considerado os quatro dias de avaliação, todas as variáveis avaliadas na análise de medida repetida no tempo foram significativas, mostrando assim efeito para o cádmio ( $F_{(1,2)} = 5,64; P = 0,02$ ), densidade ( $F_{(1,2)} = 27,12; P < 0,0001$ ), tempo ( $F_{(3,64)} = 264,42; P < 0,0001$ ), e as interações entre cádmio e densidade ( $F_{(1,2)} = 4,90; P = 0,01$ ), tempo e cádmio ( $F_{(3,64)} = 3,50; P = 0,02$ ), tempo e densidade ( $F_{(6,128)} = 13,10; P < 0,0001$ ) e tempo, cádmio e densidade ( $F_{(6,128)} = 4,48; P = 0,0004$ ) (Tabela 2.2, Figura 2.3).

Tabela 2.2: Análise de variância com medidas repetidas no tempo para a predação diária de larvas predadas de *A. aegypti* por *B. anurum*.

Fontes de variação	gl	F	P		
Entre fatores					
Cádmio (C)	1	5,64	0,0205*		
Densidade (D)	2	27,12	<0,0001*		
C x D	2	4,90	0,0104*		
Erro	66	-	-		
	gl <sub>den</sub>	gl <sub>num</sub>	Wilks' lambda	F	P
Dentro de cada fator					
Tempo (T)	64	3	0,074	264,42	<0,0001*
T x C	64	3	0,859	3,50	0,0204*
T x D	128	6	0,383	13,10	<0,0001*
T x C x D	128	6	0,682	4,48	0,0004*

Os resultados obtidos para os quatro dias de avaliação revelaram que o comportamento de predação observado no primeiro dia de avaliação se manteve ao longo dos dias (Figura 2.3). Insetos das maiores densidades e que estavam expostos ao cádmio continuaram a predação mais larvas do que o controle (Figura 2.3B e C). Já para a menor densidade ocorreu o inverso do relatado anteriormente. Independente da densidade ou tratamento todos apresentaram um comportamento predatório linear, mostrando uma maior predação para o primeiro dia e reduzindo ao longo das avaliações (Figura 2.3).

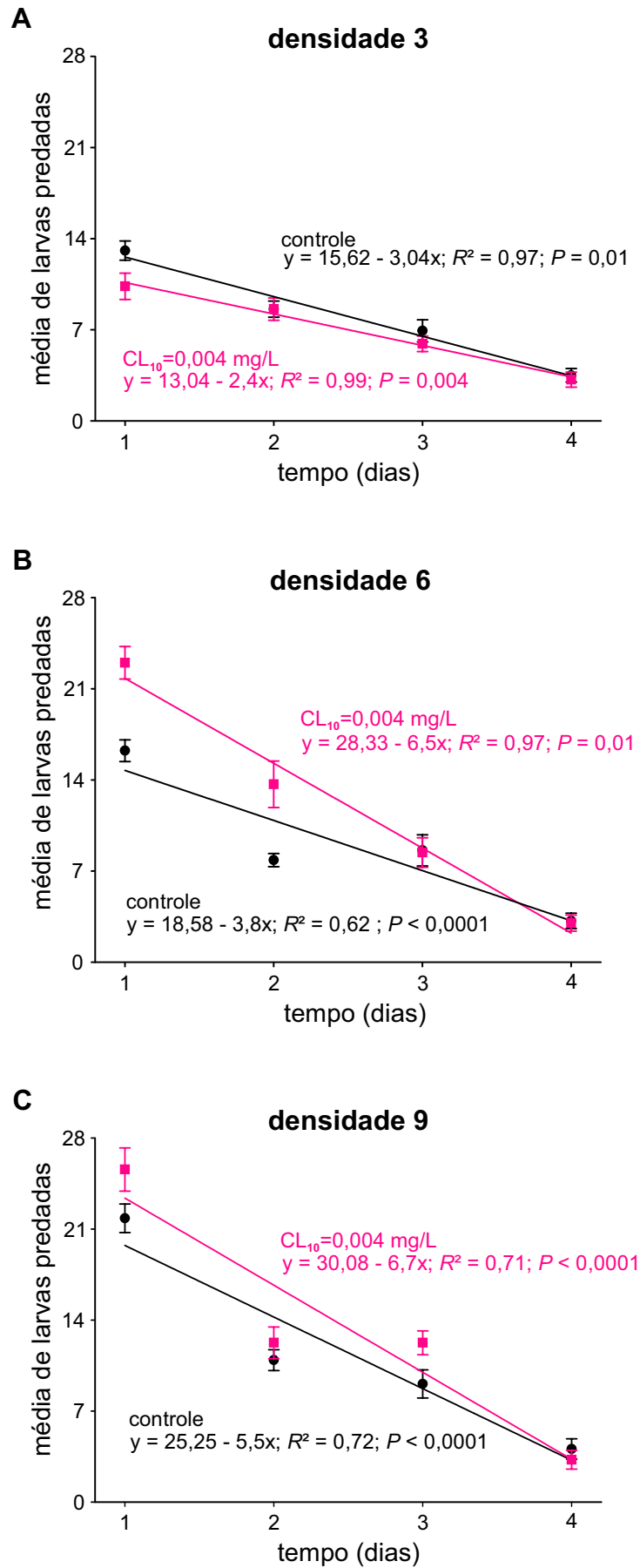


Figura 2.3: Número médio diário ( $\pm$ EP) de larvas de *A. aegypti* predadas por *B. anurum* em diferentes densidades. (A) densidade três, (B) seis e (C) nove.

Ao ser contabilizado o número total de larvas consumidas ao longo do experimento podemos notar que na densidade intermediária houve diferença estatística entre os tratamentos, onde os insetos que estavam expostos predaram mais larvas do que o controle ( $F_{(1,1)} = 7,4; P = 0,01$ ) (Figura 2.4B). Porém essa diferença no consumo entre os tratamentos não foi observado para as demais densidades (Figura 2.4A e C).

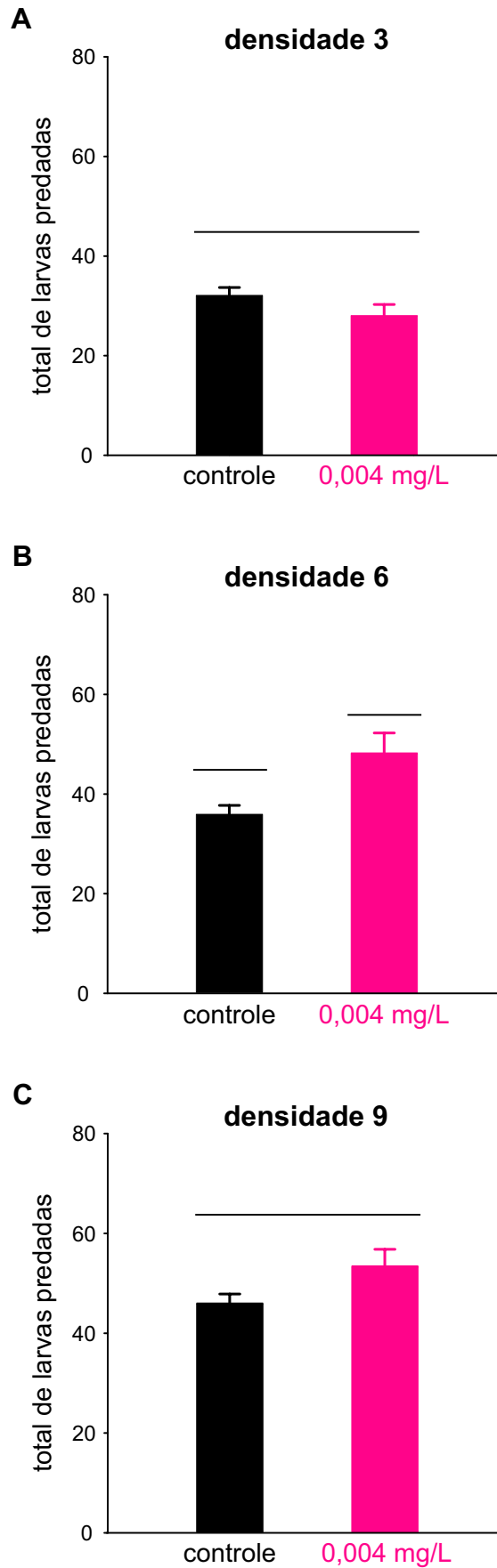


Figura 2.4: Total de larvas ( $\pm$ EP) de *A. aegypti* predadas por *B. anurum* na densidade três (A), seis (B), e nove (C). Médias seguidas por linhas de mesma altura não diferem estatisticamente entre si.

### 2.3.2.2 Bioensaio de predação com exposição pela dieta

Considerando o primeiro dia de avaliação temos que a análise de variância com medida repetida no tempo mostrou efeito das variáveis densidade ( $F_{(1,2)} = 14,45$ ;  $P < 0,0001$ ), tempo ( $F_{(8,41)} = 2,37$ ;  $P < 0,0001$ ) e a interação entre tempo e cádmio ( $F_{(8,41)} = 1,48$ ;  $P = 0,03$ ), enquanto que as demais não tiveram valores significativos (Tabela 2.3, Figura 2.5)

Tabela 2.3: Análise de variância com medida repetida no tempo para o número médio de larvas predadas de *A. aegypti* por *B. anurum*, para o primeiro dia de avaliação.

Fontes de variação	gl	F	P		
Entre fatores					
Cádmio (C)	1	0,79	0,3792		
Densidade (D)	2	14,45	<0,0001*		
C x D	2	0,40	0,6712		
Erro	48	-	-		
	gl <sub>den</sub>	gl <sub>num</sub>	Wilks' lambda	F	P
Dentro de cada fator					
Tempo (T)	41	8	0,364	2,37	<0,0001*
T x C	41	8	0,683	1,48	0,0335*
T x D	82	16	0,587	1,56	0,0993
T x C x D	82	16	0,654	1,21	0,2792

Para o primeiro dia de avaliação podemos observar que nas densidades larvais três e seis, as ninfas que receberam as larvas contaminadas tiveram um consumo maior do que as que receberam as larvas isentas de metal pesado (Tabela 2.3, Figura 2.5A e B). Porém para a maior densidade testada tivemos uma mudança no comportamento de predação, onde o controle passou a predar mais do que o tratamento com as larvas contaminadas (Figura 2.5C).

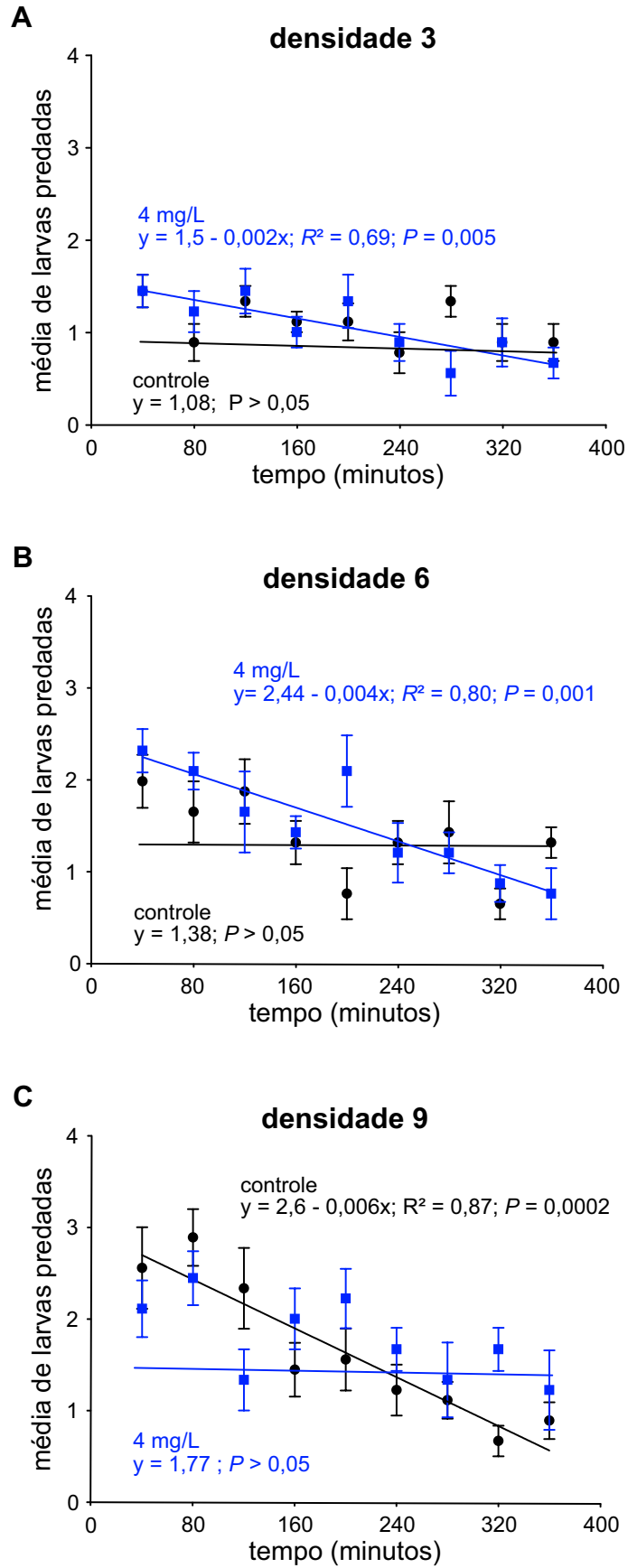


Figura 2.5: Número médio ( $\pm$ EP) de larvas de *A. aegypti* predadas por *B. anurum* em diferentes densidades. (A) densidade três, (B) seis e (C) nove.

A análise de variância com medida repetida no tempo para todos os dias de avaliação (i.e., quatro dias) mostrou efeito das variáveis densidade ( $F_{(1,2)} = 12,62$ ;  $P < 0,0001$ ), tempo ( $F_{(3,46)} = 208,90$ ;  $P < 0,0001$ ) e para as interações entre cádmio e densidade ( $F_{(1,2)} = 4,35$ ;  $P = 0,01$ ), tempo e cádmio ( $F_{(3,46)} = 8,42$ ;  $P = 0,0001$ ), tempo e densidade ( $F_{(6,92)} = 13,61$ ;  $P < 0,0001$ ) e tempo, cádmio e densidade ( $F_{(6,92)} = 2,61$ ;  $P = 0,02$ ) (Tabela 2.4, Figura 2.6).

Tabela 2.4: Análise de variância com medidas repetidas no tempo para a predação diária de larvas predadas de *A. aegypti* por *B. anurum*.

Fontes de variação	gl	F	P
Entre fatores			
Cádmio (C)	1	1,10	0,2986
Densidade (D)	2	12,62	<0,0001*
C x D	2	4,35	0,0184*
Erro	48	-	-

	gl <sub>den</sub>	gl <sub>num</sub>	Wilks' lambda	F	P
Dentro de cada fator					
Tempo (T)	46	3	0,068	208,90	<0,0001*
T x C	46	3	0,645	8,42	0,0001*
T x D	92	6	0,28	13,61	<0,0001*
T x C x D	92	6	0,73	2,61	0,0222*

Levando em consideração todos os dias de avaliação podemos observar que para as maiores densidades (i.e., seis e nove larvas) as ninfas que receberam larvas contaminadas predaram mais do que as do controle (Figura 2.6B e C). Porém isso não foi observado para a densidade três, no qual agora as ninfas do controle passaram a preda mais (Figura 2.6A). Para as maiores densidades podemos notar um comportamento linear na predação, no qual o primeiro dia é marcado pela maior predação e diminuindo com o passar do tempo para ambos os tratamentos (Figura 2.6B e C). Já para a densidade de três as ninfas do controle tiveram um comportamento diferente, apresentando um pico de consumo no segundo dia de avaliação e logo após reduzindo o consumo nas demais avaliações (Figura 2.6A). Esse pico não foi observado para as ninfas do outro tratamento, estas apresentaram um comportamento linear como mencionado anteriormente nas outras densidades.



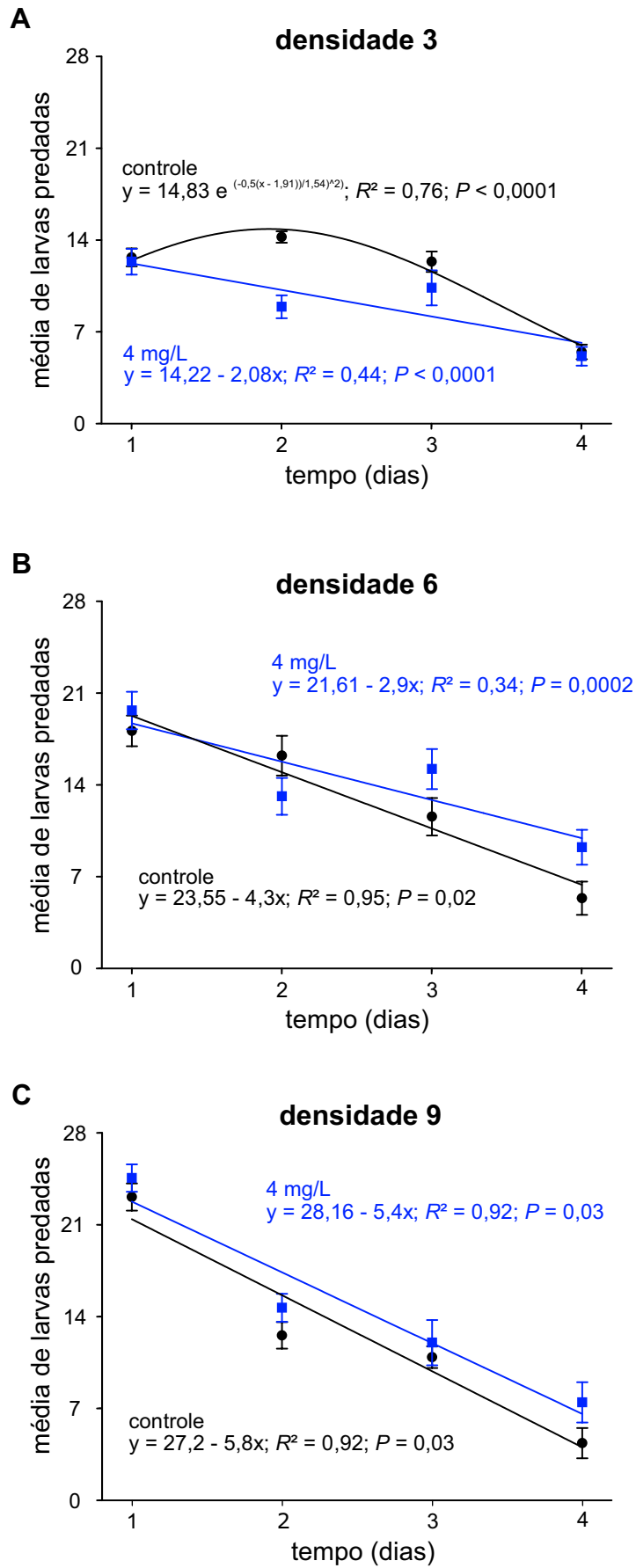


Figura 2.6: Número médio diário ( $\pm$ EP) de larvas de *A. aegypti* predadas por *B. anurum* em diferentes densidades. (A) densidade três, (B) seis e (C) nove.

O pico de predação observado no controle na menor densidade resultou em um consumo total de larvas maior quando comparado ao outro tratamento, mostrando assim uma diferença estatística para o consumo entre os tratamentos ( $F_{(1,1)} = 10,32$ ;  $P = 0,005$ ) (Figura 2.7A). No entanto, não houve diferença estatística para o consumo total de larvas entre os tratamentos das demais densidades (Figura 2.7B e C).

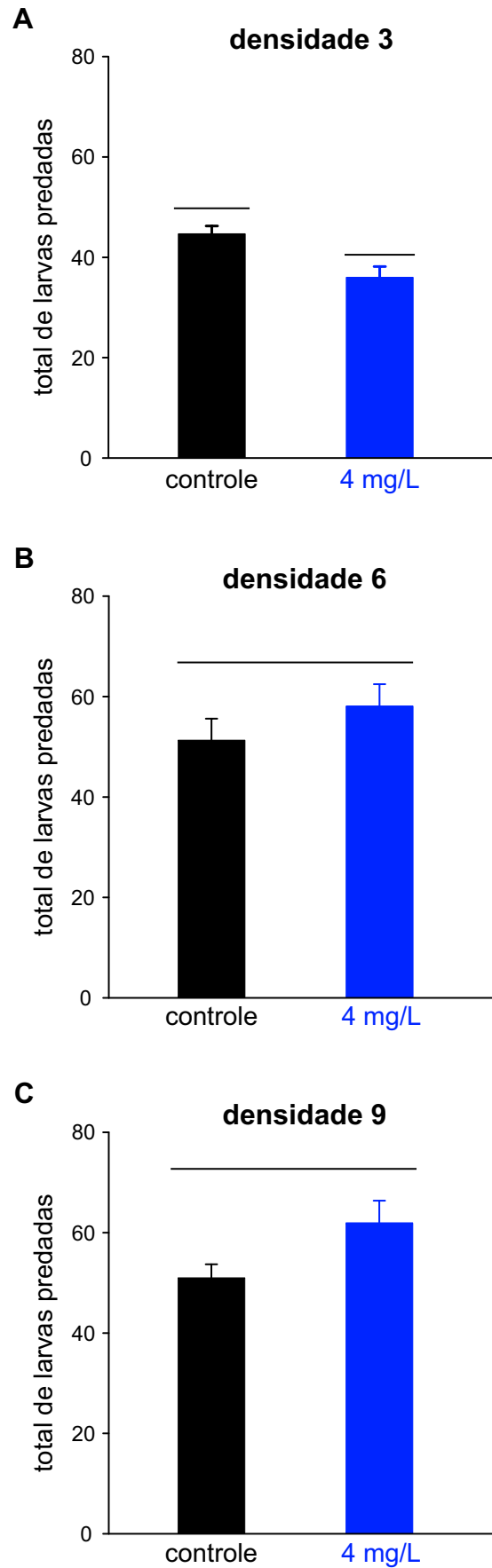


Figura 2.7: Total de larvas ( $\pm$ EP) de *A. aegypti* predadas por *B. anurum* na densidade três (A), seis (B), e nove (C). Médias seguidas por linhas de mesma altura não diferem estatisticamente entre si.

### 2.3.3 Marcadores de estresse oxidativo

Nossos resultados mostram que houve aumento da atividade das enzimas SOD ( $F_{(2,10)} = 12,32$ ;  $P = 0,002$ ) e CAT ( $F_{(2,10)} = 6,33$ ;  $P = 0,017$ ) e do produto da peroxidação lipídica (MDA) ( $F_{(2,10)} = 19,85$ ;  $P < 0,001$ ) em insetos que tiveram à dieta como via de exposição ao cádmio quando comparado ao controle e aos insetos expostos apenas ao ambiente contaminado (Figura 2.8A, B e D).

No entanto, para a enzima GST houve uma redução de aproximadamente mais da metade da sua atividade ( $F_{(2,10)} = 11,45$ ;  $P = 0,003$ ) em insetos expostos a dieta contaminada ( $1,48 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) quando comparado ao controle ( $3,18 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) e o ambiente contaminado ( $3,44 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) (Figura 2.8C).

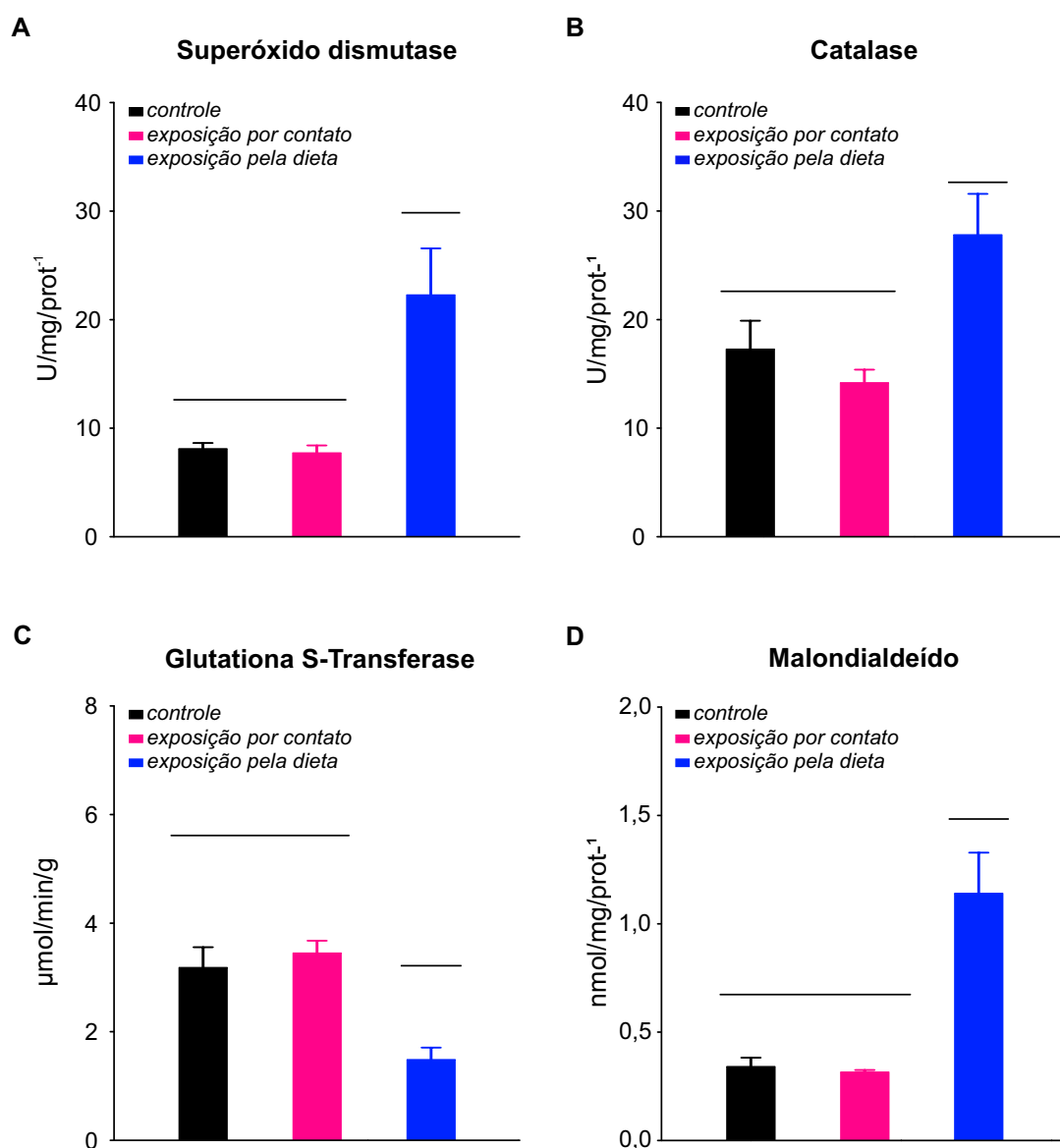


Figura 2.8: Mensuração da atividade das enzimas Superóxido dismutase (A), Catalase (B) e Glutaciona S-Transferase (C) e das concentrações de Malondialdeído (D) em ninfas de *B. anurum* expostas as diferentes vias de exposição ao cádmio e do controle (água destilada). Médias seguidas por linhas de mesma altura não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

## 2.4 Discussão

O metal pesado cádmio já é reconhecido por sua elevada toxicidade a diversos organismos, incluindo insetos aquáticos (Sarkar et al. 1995; Kamiyama et al. 1995; Xie and Buchwalter 2011). Os nossos resultados mostraram que uma exposição mais longa (i.e., 96h de exposição/ contato) com o cádmio foi capaz de alterar o comportamento predatório em *B. anurum* independentemente da via de exposição utilizada. Porém somente insetos expostos através da dieta apresentaram mudanças fisiológicas, alterando o seu sistema de defesa antioxidante e o produto do estresse oxidativo testado.

Desse modo, a via de exposição pela dieta foi mais citotóxica para *B. anurum*, confirmando a importância que o conhecimento da contribuição que cada via apresenta na obtenção dos resultados.

As ninfas de *B. anurum* que foram expostas ao cádmio por contato tiveram um comportamento predatório diferente do controle, nas densidades intermediária e alta as ninfas expostas passaram a predação mais do que o controle, apresentando essa diferença principalmente no primeiro dia de avaliação, que é referente às 24h após a exposição. Podemos sugerir que esse aumento no consumo larval seria um efeito compensatório a exposição ao contaminante, uma vez que o processo de metabolização e realocação do metal traz gastos energéticos para o organismo (Kliot and Ghanim 2012). Esse aumento na predação após exposição a um contaminante também foi relatado em outro inseto aquático como observado por Gutiérrez et al. (2017), ao utilizar o inseticida pirimifós-metil.

Alguns estudos envolvendo a utilização de concentrações subletais já relataram a presença do fenômeno biológico conhecido como hormese, esse termo está associado a compostos tóxicos que, em baixas doses apresentam um efeito estimulatório ou benéfico ao organismo, porém em altas doses mostram o efeito contrário (Guedes and Cutler 2013). A hormese tem sido observada em uma ampla gama de organismos, em que parâmetros como sobrevivência, longevidade, crescimento, processos metabólicos e moleculares são estimulados de algum modo após uma exposição subletal (Calabrese and Baldwin 2003; Calabrese and Blain 2011; Cutler 2012). Os nossos resultados mostraram que ninfas que estiveram expostas por contato a uma dose subletal de cádmio passaram a predação mais do que o controle, dessa forma podemos sugerir que poderia de se tratar de um efeito hormético, baseado no princípio do termo hormese.

Larvas de *A. aegypti* expostas apresentaram mudanças comportamentais induzidas pela exposição subletal ao cádmio, mostrando um comportamento locomotor letárgico, de modo a aumentar a vulnerabilidade a predação por *B. anurum* (Reynaldi et al. 2011). Podemos sugerir que essa letargia estaria relacionada ao fato do cádmio ser competidor com o cálcio pelo seu canal, e uma das funções do cálcio no organismo é a contração muscular (Sidoumou et al. 1997). Essa mudança do comportamento de presas após exposição a metais pesados também foi observada em peixes (Sullivan et al.

1978; Weis and Weis 1995; Webber and Haines 2003). Como *Belostoma* spp. são insetos que possuem o comportamento de forrageamento do tipo senta e espera pela presa, esta espécie necessita perceber a presa para então capturá-la (Consoli et al. 1989; Cloarec 1990). Desse modo, pode-se inferir que a menor predação por *B. anurum* quando considerado a menor densidade larval decorre de uma menor percepção das larvas que foram expostas ao cádmio, já que esta espécie demonstrou redução das respostas comportamentais como a locomoção (Weis and Weis 1995).

Por outro lado, a maior predação na densidade intermediária e alta ocorreu justamente pelo aumento do número de presas agora disponibilizada, aumentando assim a chance de encontro entre predador e presa, bem como pela diminuição da locomoção das larvas poderia torná-la mais fáceis de captura (Weis and Weis 1995).

Baseado nos resultados encontrados para os biomarcadores de estresse oxidativo, temos que o cádmio derivado de diferentes vias de exposição é capaz de gerar diferentes respostas no sistema de defesa antioxidante dos insetos, mostrando assim a importância do conhecimento da contribuição que cada via de exposição possui. Os resultados obtidos nesse trabalho quando considerado a exposição do cádmio por contato foram iguais ao encontrado por Xie and Buchwalter (2011), em que essa forma de exposição não influenciou os níveis enzimáticos de SOD, CAT e GST, bem como do marcador de peroxidação lipídica.

A exposição pela dieta, no entanto, foi capaz de aumentar os níveis de atividade das enzimas SOD e CAT e do biomarcador MDA. Porém para GST ocorreu o inverso, havendo redução. Essa estimulação para alguns componentes do sistema antioxidante poderia ser interpretada como um desafio oxidativo que o organismo está passando, ou mesmo um mecanismo compensatório a esse desafio (Xie and Buchwalter 2011).

A enzima SOD tem como função converter o radical superóxido ( $O_2^-$ ) em  $H_2O_2$ , enquanto a CAT tem a capacidade de catalisar a quebra do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (Hermes-Lima and Zenteno-Savin 2002). Baseado nisso, podemos sugerir que fisiologicamente o aumento da CAT seria uma consequência da elevada produção de  $H_2O_2$  pela SOD, e que a SOD seria uma resposta imediata a exposição ao cádmio (Sarkar et al. 1995). Levando em consideração a redução da atividade da GST, podemos sugerir que esse resultado poderia ser em decorrência da diminuição da síntese da própria enzima ou ainda pela sua inativação devido à interação do cádmio com o grupo tiol como pro-

posto por Carne et al. (1979). O cádmio possui uma elevada afinidade pela glutathione (Dudley and Klaassen 1984), que tem como função limpar o cádmio do sistema impedindo assim que interaja com os componentes celulares (Kamiyama et al. 1995; Rana and Verma 1996).

O aumento da peroxidação lipídica, mensurado pelo biomarcador MDA, já é conhecido como uma das principais consequências do estresse oxidativo gerado pelo cádmio (Jurczuk et al. 2004; Kotelnikova et al. 2008; Yiin et al. 2000; Valko et al. 2006). No entanto, ainda não se sabe se o aumento da peroxidação lipídica que sugere dano a membranas celulares, é um efeito da ação direta do cádmio, ou como uma consequência da diminuição dos níveis de glutathione (Stohs and Bagchi 1995).

Em diversos organismos já se é conhecido que o cádmio é absorvido pelos canais de cálcio, sendo assim competidor pelo canal desse elemento químico (Wright 1980; Holwerda et al. 1989; Stephenson and Mackie 1989; Blazka and Shaikh 1991; Wang and Evans 1993; Bjerregaard and Depledge 1994; Glynn et al. 1994a). De acordo com Craig et al. (1999) esta afirmativa também é válida para insetos aquáticos. Estudos mostraram que o trato digestivo é o principal local de acúmulo de cádmio em diferentes insetos aquáticos (Hare et al. 1991). Trabalhos realizados com o intestino de larvas de *Chironomus* sugerem que o local em que o cádmio é acumulado também seria a região onde os elementos essenciais como cálcio são absorvidos (Seidman et al. 1986). Além disso, em insetos terrestres o intestino médio mostrou ser o local de absorção de cálcio (Taylor 1985). Assim, podemos sugerir esta como uma das possíveis razões para a via de exposição pela dieta ter causado maiores efeitos nos biomarcadores de estresse oxidativo testados.

Deste modo, os nossos resultados sugerem que a exposição ao cádmio através da dieta pode ser mais tóxico para *B. anurum* do que a exposição através da água, reforçando o que já foi encontrado em outros estudos envolvendo também insetos aquáticos (Xie and Buchwalter 2011; Martin et al. 2007; Timmermans et al. 1992). O aumento da predação parece está associado a maior intoxicação ao cádmio, e como consequência a ocorrência do estresse oxidativo. Podemos pensar que na tentativa de compensar esse desequilíbrio fisiológico, o inseto exposto passou a predar mais como um mecanismo compensatório ao estresse sofrido, porém como o alimento se encontrava contaminado, isso só levou ao agravamento da sua situação fisiológica.



## 2.5 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## 2.6 Referências

- Aebi, E. H. (1984). Catalase in vitro. in methods in enzymatic analysis. edited by: Bergmeyer hu. *Academic press New York*.
- Ahmad, S. (1995). Oxidative stress from environmental pollutants. *Archives of insect biochemistry and physiology* 29(2), 135–157.
- Barata, C., S. J. Markich, D. J. Baird, and A. M. Soares (2002). The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology* 61(3-4), 143–154.
- Beasley, G. and P. Kneale (2002, jun). Reviewing the impact of metals and PAHs on macroinvertebrates in urban watercourses. *Progress in Physical Geography* 26(2), 236–270.
- Bervoets, L., J. Voets, A. Covaci, S. Chu, D. Qadah, R. Smolders, P. Schepens, and R. Blust (2005, mar). Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in flemish surface waters. *Environmental Science & Technology* 39(6), 1492–1505.
- Bjerregaard, P. and M. H. Depledge (1994, jun). Cadmium accumulation in *Littorina littorea*, *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*: the influence of salinity and calcium ion concentrations. *Marine Biology* 119(3), 385–395.
- Blazka, M. and Z. Shaikh (1991, sep). Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes: Role of calcium channels. *Toxicology and Applied Pharmacology* 110(2), 355–363.
- Calabrese, E. J. and L. A. Baldwin (2003, February). The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 71, 246–250.
- Calabrese, E. J. and R. B. Blain (2011, oct). The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 61(1), 73–81.

- Calow, P. (1991, jan). Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100(1-2), 3–6.
- Carne, T., E. Tipping, and B. Ketterer (1979). The binding and catalytic activities of forms of ligandin after modification of its thiol groups. *Biochemical Journal* 177(2), 433–439.
- Cervera, A., A. C. Maymó, R. Martínez-Pardo, and M. D. Garcerá (2003, aug). Antioxidant enzymes in *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae) exposed to cadmium. *Environmental Entomology* 32(4), 705–710.
- Chanu, C. M., S. Gupta, and A. Gupta (2017, nov). Acute toxicity of cadmium in *Anisops sardeus* (Heteroptera: Notonectidae): Effects on adult and nymphal survival and swimming behavior. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 145, 169–175.
- Clements, W. H., D. M. Carlisle, J. M. Lazorchak, and P. C. Johnson (2000, apr). Heavy metals structure benthic communities in Colorado mountain streams. *Ecological Applications* 10(2), 626–638.
- Cloarec, A. (1990). Factors influencing the choice of predatory tactics in a water bug, *Diplonychus indicus* venk. & rao (Heteroptera: Belostomatidae). *Animal behaviour* 40(2), 262–271.
- Consoli, R. A., M. H. Pereira, A. L. Melo, and L. H. Pereira (1989). *Belostoma micantulum* Stal, 1858 (Hemiptera: Belostomatidae) as a predator of larvae and pupae of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae) in laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84(4), 577–578.
- Craig, A., L. Hare, and A. Tessier (1999, feb). Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri*. *Aquatic Toxicology* 44(4), 255–262.
- Cuny, D., C. V. Haluwyn, P. Shirali, F. Zerimech, L. Jérôme, and J. M. Haguenoer (2004, feb). Cellular impact of metal trace elements in terricolous lichen *Diploschistes muscorum* (scop.) r. sant. – identification of oxidative stress biomarkers. *Water, Air, & Soil Pollution* 152(1-4), 55–69.
- Cutler, G. C. (2012, mar). Insects, insecticides and hormesis: Evidence and considerations for study. *Dose-Response* 11(2), dose–response.1.
- Dieterich, S., U. Bieligk, K. Beulich, G. Hasenfuss, and J. Prestle (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 101, 33–39.
- Dudley, R. E. and C. D. Klaassen (1984). Changes in hepatic glutathione concentration modify cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 72(3), 530–538.

- Ercal, N., H. Gurer-Orhan, and N. Aykin-Burns (2001, December). Toxic metals and oxidative stress part i: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry* 1, 529–539.
- Ferrero, A., A. Torreblanca, and M. D. Garcerá (2017, feb). Assessment of the effects of orally administered ferrous sulfate on *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae). *Environmental Science and Pollution Research* 24(9), 8551–8561.
- Glynn, A. W., L. Norrgren, and Å. MÅEssener (1994a, sep). Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Aquatic Toxicology* 30(1), 13–26.
- Guedes, R. N. C. and G. C. Cutler (2013, dec). Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Management Science* 70(5), 690–697.
- Gutiérrez, Y., G. S. Ramos, H. V. V. Tomé, E. E. Oliveira, and A. L. Salaro (2017, aug). Bti-based insecticide enhances the predatory abilities of the backswimmer *Buenoa tarsalis* (Hemiptera: Notonectidae). *Ecotoxicology* 26(8), 1147–1155.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby (1974, November). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry* 249, 7130–7139.
- Hare, L., A. Tessier, and P. G. C. Campbell (1991, aug). Trace element distributions in aquatic insects: Variations among genera, elements, and lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48(8), 1481–1491.
- Hermes-Lima, M. and T. Zenteno-Savin (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133(4), 537–556.
- Holwerda, D. A., J. A. de Knecht, J. Hemelraad, and P. R. Veenhof (1989, mar). Cadmium kinetics in freshwater clams. Uptake of cadmium by the excised gill *Anodonta anatina*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 42(3), 382–388.
- Jurczuk, M. ., M. M. Brzóska, J. Moniuszko-Jakoniuk, M. Gałazyn-Sidorczuk, and E. Kulikowska-Karpińska (2004). Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food and chemical toxicology* 42(3), 429–438.
- Kamiyama, T., H. Miyakawa, J. P. Li, T. Akiba, J. Liu, J.-h. Liu, F. Marumo, and C. Sato (1995). Effects of one-year cadmium exposure on livers and kidneys and their relation to glutathione levels. *Research communications in molecular pathology and pharmacology* 88(2), 177–186.
- Kliot, A. and M. Ghanim (2012, sep). Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management Science* 68(11), 1431–1437.

- Kotelnikova, S., N. Sokolova, and A. Kotelnikov (2008). Lipid peroxidation in various organs and tissues of albino rats with cadmium intoxication in winter and summer. *Bulletin of experimental biology and medicine* 146(3), 291–292.
- Lijun, L., L. Xuemei, G. Yaping, and M. Enbo (2005, nov). Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinensis* (Orthoptera Acridoidea). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20(3), 412–416.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951, November). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265–275.
- Marriel, N. B., H. V. V. Tomé, R. C. N. Guedes, and G. F. Martins (2016, June). Deltamethrin-mediated survival, behavior, and oenocyte morphology of insecticide-susceptible and resistant yellow fever mosquitos (*Aedes aegypti*). *Acta tropica* 158, 88–96.
- Martin, C. A., S. N. Luoma, D. J. Cain, and D. B. Buchwalter (2007). Cadmium ecophysiology in seven stonefly (plecoptera) species: delineating sources and estimating susceptibility. *Environmental science & technology* 41(20), 7171–7177.
- Munger, C. and L. Hare (1997, mar). Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): implications for predicting cd bioaccumulation in nature. *Environmental Science & Technology* 31(3), 891–895.
- Naimo, T. J. (1995, dec). A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology* 4(6), 341–362.
- Norwood, W., U. Borgmann, D. Dixon, and A. Wallace (2003, jun). Effects of metal mixtures on aquatic biota: A review of observations and methods. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 9(4), 795–811.
- Nriagu, J. O. and J. M. Pacyna (1988, may). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333(6169), 134–139.
- Pardini, R. S. (1995). Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active prooxidants. *Archives of insect biochemistry and physiology* 29(2), 101–118.
- Poteat, M. D. and D. B. Buchwalter (2013, dec). Four reasons why traditional metal toxicity testing with aquatic insects is irrelevant. *Environmental Science & Technology* 48(2), 887–888.
- Rana, S. and S. Verma (1996). Protective effects of gsh, vitamin e, and selenium on lipid peroxidation in cadmium-fed rats. *Biological trace element research* 51(2), 161–168.
- Reynaldi, S., M. Meiser, and M. Liess (2011, jul). Effects of the pyrethroid fenvalerate on the alarm response and on the vulnerability of the mosquito larva *Culex pipiens molestus* to the predator *Notonecta glauca*. *Aquatic Toxicology* 104(1-2), 56–60.

- Sarkar, S., P. Yadav, R. Trivedi, A. Bansal, and D. Bhatnagar (1995). Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 9(3), 144–149.
- Seidman, L. A., G. Bergtrom, and C. C. Remsen (1986). Structure of the larval midgut of the fly *Chironomus thummi* and its relationship to sites of cadmium sequestration. *Tissue and Cell* 18(3), 407–418.
- Sidoumou, Z., M. Gnassia-Barelli, and M. Roméo (1997, February). Cadmium and calcium uptake in the mollusc *Donax rugosus* and effect of a calcium channel blocker. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 58, 318–325.
- Stephenson, M. and G. L. Mackie (1989, jul). A laboratory study of the effects of waterborne cadmium, calcium, and carbonate concentrations on cadmium concentrations in *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda). *Aquatic Toxicology* 15(1), 53–62.
- Stohs, S. J. and D. Bagchi (1995, February). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology & medicine* 18, 321–336.
- Stohs, S. J., D. Bagchi, E. Hassoun, and M. Bagchi (2000). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 19, 201–213.
- Sullivan, J., G. Atchison, D. Kolar, and A. McIntosh (1978). Changes in the predator-prey behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*) caused by cadmium. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 35(4), 446–451.
- Taylor, C. W. (1985). Calcium absorption by the midgut of the blowfly, *Calliphora vicina*. *Journal of experimental biology* 114(1), 551–561.
- Timmermans, K. R., E. Spijkerman, M. Tonkes, and H. Govers (1992). Cadmium and zinc uptake by two species of aquatic invertebrate predators from dietary and aqueous sources. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49(4), 655–662.
- Valbon, W. R., F. M. Cruz, G. S. Ramos, H. V. V. Tome, and E. E. Oliveira (2018, January). Sublethal exposure to deltamethrin reduces the abilities of giant water bugs to prey upon *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 191, 350–356.
- Valko, M., C. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160(1), 1–40.
- Wallin, B., B. Rosengren, H. G. Shertzer, and G. Camejo (1993). Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: Its use for evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry* 208, 10–15.

- Wang, W.-X. (2013). Dietary toxicity of metals in aquatic animals: Recent studies and perspectives. *Chinese Science Bulletin* 58(2), 203–213.
- Wang, Y. and R. D. Evans (1993, dec). Influence of calcium concentrations on cadmium uptake by the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50(12), 2591–2596.
- Webber, H. M. and T. A. Haines (2003, jul). Mercury effects on predator avoidance behavior of a forage fish, golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(7), 1556–1561.
- Weis, J. S. and P. Weis (1995). Swimming performance and predator avoidance by mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae after embryonic or larval exposure to methylmercury. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52(10), 2168–2173.
- Wright, D. A. (1980, apr). Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Freshwater Biology* 10(2), 123–133.
- Xie, L. and D. B. Buchwalter (2011). Cadmium exposure route affects antioxidant responses in the mayfly *Centroptilum triangulifer*. *Aquatic toxicology* 105(3-4), 199–205.
- Xie, L., D. H. Funk, and D. B. Buchwalter (2010). Trophic transfer of cd from natural periphyton to the grazing mayfly *Centroptilum triangulifer* in a life cycle test. *Environmental pollution* 158(1), 272–277.
- Yiin, S.-J., J.-Y. Sheu, and T.-H. Lin (2000). Lipid peroxidation in rat adrenal glands after administration cadmium and role of essential metals. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 62(1), 47–56.

## Conclusões gerais

Baseado nos resultados encontrados temos o que cádmio (0,19 mg/L) é capaz de causar redução na sobrevivência das ninfas quando estas se encontram constantemente expostas. Em exposição subletal por 24h *B. anurum* não teve sua habilidade predatória alterada, porém teve seu marcador de peroxidação lipídica aumentado, indicando que as ninfas sofreram estresse oxidativo.

Quando considerado os resultados envolvendo as diferentes vias de exposição ao cádmio temos que independente da via testada todas foram capazes de alterar a habilidade predatória de ninfas expostas, porém apenas a via de exposição pela dieta foi capaz de alterar os biomarcadores de estresse oxidativo.