



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

DANIELA FRIZZO PHILIPPSEN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE COBRE ORIUNDO DE
APLICAÇÃO DE CALDA BORDALESA EM PRODUÇÃO ORGÂNICA DE
LARANJAS E UVAS**

ERECHIM

2017

DANIELA FRIZZO PHILIPPSEN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE COBRE ORIUNDO DE
APLICAÇÃO DE CALDA BORDALESA EM PRODUÇÃO ORGÂNICA DE
LARANJAS E UVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, sob a orientação da Profª Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin e Prof. Dr. Eduardo Pavan Korf.

ERECHIM

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

ERS 135, Km 72, nº 200

Cep: 99.700-970

Erechim - RS

Brasil

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Philippsen, Daniela Frizzo

AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE COBRE ORIUNDO DE
APLICAÇÃO DE CALDA BORDALESA EM PRODUÇÃO ORGÂNICA DE
LARANJAS E UVAS/ Daniela Frizzo Philippsen. -- 2018.
32 f.:il.

Orientadora: Rosilene Rodrigues Kaizer .

Co-orientador: Eduardo Pavan Korf.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Mestrado em
Ciência e Tecnologia Ambiental - PPGCTA, Erechim, RS ,
2018.

1. Acetilcolinesterase. 2. Comportamento. 3.
Caenorhabditis elegans. I. , Rosilene Rodrigues Kaizer,
orient. II. Korf, Eduardo Pavan, co-orient. III.
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DANIELA FRIZZO PHILIPPSEN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE COBRE ORIUNDO DE
APLICAÇÃO DE CALDA BORDALESA EM PRODUÇÃO ORGÂNICA DE
LARANJAS E UVAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, defendido em banca examinadora em 12/12/2017.

Orientador (a): Prof^ª. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin e Prof. Dr. Eduardo Pavan Korf

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin – IFRS Campus Sertão

Prof. Dr. Eduardo Pavan Korf – UFFS Campus Erechim

Prof^ª. Dra. Marília Teresinha Hartmann – UFFS Campus Erechim

Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares - UFSM

Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos – UPF

ERECHIM/RS, Dezembro de 2017

AGRADECIMENTOS

A minha família e amigos.

Aos meus orientadores, Professora Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin e Professor Dr. Eduardo Pavan Korf, um agradecimento especial por terem aceitado a orientação deste trabalho. Obrigada por tudo!

Ao Professor Dr. Gismael Perin que nos auxiliou com seus conhecimentos.

A Universidade Federal da Fronteira Sul pela oportunidade de realizar o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Em especial aos bolsistas de iniciação científica: Elvis e Lucimara e ao técnico Diego Siqueira que prontamente nos ajudou na realização do trabalho nos laboratórios da UFFS.

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia, Campus Sertão. Em especial aos bolsistas de iniciação científica, sendo a ajuda deles de suma importância para a realização deste trabalho: Ani Carla, Ana Paula, Eduarda, Letícia e Wagner.

Ao Centro de Apoio e Promoção em Agroecologia (CAPA) de Erechim, em especial a Daiane e Juliana, pela colaboração na realização deste trabalho.

RESUMO

Atualmente os produtos orgânicos têm ganhado destaque por sua qualidade nutricional, segurança alimentar e pela sustentabilidade na sua produção. A produção orgânica utiliza fungicidas à base de cobre, como a calda bordalesa, que é composta por sulfato de cobre e cal hidratada. O cobre é um elemento químico natural e fundamental para os organismos vivos, porém há controvérsias em relação aos efeitos causados ao ambiente e à saúde humana. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os teores de cobre em solos e sucos de laranja e uva de uma propriedade orgânica que utiliza a calda bordalesa como fungicida, e a partir das concentrações encontradas, avaliar os efeitos da exposição aguda e crônica sobre o sistema nervoso de *Caenorhabditis elegans*. O estudo iniciou a partir da coleta dos solos e das frutas, logo após a colheita foram extraídos os sucos de laranja e uva. Posteriormente, foram analisadas as concentrações de cobre em solos e nos sucos de laranjas e uvas através de Espectrofotometria de Absorção Atômica por Plasma de Argônio. Após a determinação dos teores de cobre nos sucos de laranjas e uvas, os *C. elegans* foram divididos em cinco grupos, o grupo controle recebeu água ultrapura, e os tratados com cobre receberam as doses de 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,3 mg/L e 0,7 mg/L. Após a exposição foram avaliados parâmetros comportamentais e enzimáticos de cepas selvagens de *C. elegans*. Os ensaios das exposições aguda e crônica dos *C. elegans* ao cobre demonstraram que houve alterações da atividade da Acetilcolinesterase. Na exposição aguda as doses de 0,05 mg/L, 0,1mg/L e 0,7 mg/L ativaram a enzima, resultado similar foi encontrado após exposição crônica para as doses 0,3 mg/L e 0,7 mg/L. Já as doses de 0,05 mg/L e 0,1 mg/L inibiram a enzima após exposição crônica. Os organismos expostos também mostraram alterações comportamentais, como redução nos batimentos faríngeos à exposição aguda na dose de 0,05 mg/L e 0,7 mg/L em exposição crônica e aumento no ciclo de defecação nas doses de 0,1 mg/L e 0,3 mg/L em exposição aguda e redução em exposição crônica à 0,3 mg/L. Conforme já era esperado os níveis de cobre estavam aumentados nos solos que receberam o fungicida a base de cobre, o mesmo foi encontrado para os sucos. Porém, observou-se que as doses encontradas nos sucos promoveram significativas alterações no sistema colinérgico o que repercutiu no comportamento dos vermes. Assim, recomenda-se maior critério para aplicação de calda bordalesa, considerando que o cobre por ser um metal tem potencial de bioacumulação nos sistemas biológicos.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase, Comportamento, *C. elegans*.

ABSTRACT

Currently, organic products have gained attention for its nutritional quality, food safety and sustainability in its production. Organic farming uses copper-based fungicides such as a Bordeaux mixture, which is composed of hydrated lime and copper sulfate. Copper is a natural and essential chemical element for living organisms, but there are controversies regarding the effects on the environment and human health. Thus, the objective of this study was to evaluate the copper content in soils, orange and grape juice of an organic property that uses the Bordeaux mixture as fungicide, and from the concentrations found, to evaluate the effects of acute and chronic exposure on *Caenorhabditis elegans* nervous system. The study started from the collection of soil and fruit, after harvest were extracted the orange and grape juices. Subsequently, the copper concentrations in soil and in the juice were analysed by Atomic Absorption Spectrometry Plasma Argon. After determination of the copper concentration in the juices, the *C. elegans* were divided into five groups, the control group received ultrapure water, and treated with copper received the 0.05 mg/L, 0.1 mg/L, 0.3 mg/L and 0.7 mg/L. After the exposure, behavioral and enzymatic parameters of wild strains of *C. elegans* were evaluated. The trials of acute and chronic exposures of *C. elegans* to copper showed that there were changes in acetylcholinesterase activity. In the acute exposure doses of 0.05 mg/L, 0.1 mg/L and 0.7 mg/L activated the enzyme, a similar result was found after chronic exposure at doses 0.3 mg/L and 0.7 mg/L. Doses of 0.05 mg/L and 0.1 mg/L inhibited the enzyme after chronic exposure. Exposed organisms also showed behavioral changes, such as reduction in pharyngeal beats to acute exposure at a dose of 0.05 mg/L and 0.7 mg/L on chronic exposure and increase in the defecation cycle at doses of 0.1 mg/L and 0.3 mg/L on acute exposure and reduction on chronic exposure at 0.3 mg/L. As expected, copper levels were increased in soils that received the copper-based fungicide, the same was found for juices. However, it was observed that the doses found in the juices promoted significant changes in the cholinergic system, which had repercussions on the behavior of the worms. Thus, it is recommended major criterion for the application of Bordeaux mixture, considering that copper metal has to be a potential for bioaccumulation in biological systems.

Key words: Acetylcholinesterase, Behavior, *C. elegans*

SUMÁRIO

RESUMO.....	05
ABSTRACT	06
INTRODUÇÃO GERAL	08
RESULTADOS	11
EFEITO DO COBRE SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE <i>Caenorhabditis</i>	
<i>elegans</i>	12
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	31

INTRODUÇÃO GERAL

A produção orgânica é uma das práticas agrícolas sustentáveis que visa reduzir os problemas ambientais e de saúde humana relacionada às práticas convencionais de produção (ANDOW et al., 2017). No Brasil, os alimentos orgânicos tiveram uma expansão na década de 1990. Este crescimento é notável, pois a agricultura convencional é baseada no uso de produtos químicos e a agricultura orgânica almeja uma melhor qualidade de vida para os produtores e consumidores dos alimentos através de produtos ecologicamente sustentáveis (CARDOSO; CASAROTTO FILHO; CAUCHICK MIGUEL, 2015).

O principal grupo de fungicidas aprovado para uso em sistemas de produção de culturas orgânicas é composto por cobre. Em 1885, uma mistura formada por sulfato de cobre (CuSO_4) e cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), a calda bordalesa, foi descoberta para controlar doenças causadas por *Plasmopara viticola* em videiras. Esse fungicida é utilizado em grande escala em todo o mundo (GHORBANI, 2007). A calda bordalesa é um fungicida muito utilizado na agricultura orgânica de frutas, como a viticultura, para o controle do míldio causado pela *Plasmopara viticola* e na citricultura, para prevenir a doença podridão marrom causada pela *Alternaria alternata* (MARTINS et al., 2014; BAURAND et al., 2016;).

O cobre é um elemento natural não sintético, porém é um contaminante nos sistemas de água e solo e sua liberação pode representar uma ameaça tanto para a saúde humana quanto para o ambiente (BALINT; SAID-PULLICINO; AJMONE-MARSAN, 2015; YU; ZHANG; YIN, 2012). A contaminação por metal pesado é uma das maiores ameaças para o ecossistema, pois degrada o habitat e apresenta alto potencial tóxico para a vida humana, devido a sua persistência na natureza (FERRANTE et al., 2017). Os metais caracterizam-se por serem altamente estáveis e difíceis de degradar e, portanto, facilmente transportados e acumulados através da rede alimentar (FENG et al., 2018).

O cobre é um elemento essencial, porém é extremamente tóxico e altamente bioacumulável. Eliminação de águas residuais e industriais, mineração, incineração e fungicidas de cobre utilizados na agricultura são a principal fonte de contaminação por cobre (CHEN; CHEN; DONG, 2011). A bioacumulação caracteriza-se pelo acúmulo de metal intracelular, sendo uma absorção de metal por células vivas (KADUKOVÁ; VIRČÍKOVÁ, 2005). A forma química do cobre afeta sua toxicidade. Sabe-se que as espécies altamente solúveis, como o sulfato ou nitrato de cobre, são facilmente absorvidas, já as formas menos

solúveis como o óxido de cobre são menos biodisponíveis (CEKO; AITKEN; HARRIS, 2014).

No meio ambiente, alterações como diminuição do crescimento da raiz e parte aérea, número de folhas reduzidas, taxas de fotossíntese alteradas, alterações nos níveis de clorofilas, carotenoides e no teor de elementos minerais, açúcares e lipídeos nas partes vegetativas das plantas, têm sido associadas ao excesso de cobre (MARTINS, 2014). Nos seres humanos, déficit ou excesso alimentar podem produzir consequências adversas à saúde. O excesso de cobre pode promover o estresse oxidativo *in vivo*, contribuindo para o surgimento de diversas doenças como aterosclerose e neurodegeneração (CEKO; AITKEN; HARRIS, 2014).

Ensaio com o auxílio de organismos indicadores são frequentemente realizados para fornecer potenciais riscos ambientais, bem como, a intoxicação pela exposição aos metais presentes em estudos *in vivo* e *in vitro*, avaliando efeitos agudos e crônicos (SHEN; XIAO; YE; WANG, 2009).

O *Caenorhabditis elegans* tem o potencial de fornecer dados de toxicidade valiosos no seu organismo de maneira rápida e com baixo custo (HUNT; OLEJNIK; SPRANDO, 2012). O uso deste modelo tem crescido nas últimas décadas. Em 1963, o biólogo molecular, Sydney Brenner, nos Estados Unidos, foi um dos primeiros a listar as vantagens experimentais com esse modelo animal, não apenas no campo da biologia básica, mas no estudo e desenvolvimento do sistema nervoso (BRENNER, 1988).

O *C. elegans* é um nematódeo muito utilizado como modelo vivo em estudos, pois apresenta um genoma muito semelhante aos seres humanos. Isso se deve ao fato que há algo em comum na linha evolutiva, ou seja, filogenia dos antepassados entre *C. elegans* e seres humanos. Como principais características, podemos dizer que são hermafroditas e machos simples, tem um ciclo de vida curto, em média 3 dias para a idade adulta, uma ninhada grande, são fáceis de manusear e apresentam corpos transparentes, facilitando a observação de seus órgãos internos (COLMENARES, 2016).

Estudos estão sendo realizados para avaliar os efeitos dos metais tóxicos no sistema nervoso de *C. elegans*, analisando o comportamento, expressão e morfologia. A exposição neural a metais tóxicos pode levar a defeitos de comportamento na locomoção deste animal, indicando uma disfunção do sistema nervoso (CHEN, 2013).

De acordo com um estudo realizado por WANG et al. (2009), o *C. elegans* exposto ao cobre promoveu uma redução no tamanho da ninhada, encurtou o tempo de vida, houve uma rejeição a alimentação e apresentou um comportamento anormal do movimento.

Por desempenhar um papel importante na formação de estruturas cerebrais, assim como na modulação de funções cognitivas e comportamentais, a enzima Acetilcolinesterase (AChE) tem sido descrita como um biomarcador, conhecida por vários contaminantes ambientais. A AChE representa um mecanismo importante do sistema colinérgico, onde participa no final da neurotransmissão, podendo ser inibidas por drogas, agentes nervosos e metabólicos secundários. (HAVERROTH, 2015).

A acetilcolinesterase é uma enzima que atua na transmissão do impulso nervoso e degrada a acetilcolina em acetato e colina na fenda sináptica de sinapses colinérgicas e junções neuromusculares. Metais, organofosfatos e carbonatos podem inibir a atividade da acetilcolinesterase (VIDAL-LIÑÁN, 2016; COSTA; LILLEY; ATKINSON; URWIN, 2009) . Por ser um importante mediador da comunicação neural, a acetilcolinesterase também tem um papel significativo na manutenção da homeostase fisiológica celular (MUKHERJEE; RAY; RAY, 2016).

Pelo fato da enzima AChE ser um biomarcador, é possível quantificar os impactos gerados sobre os organismos vivos, através da avaliação de efeitos bioquímicos e celulares pela exposição aos poluentes ambientais (LEELAJA; RAJINI, 2013). Dessa forma, o presente estudo objetiva determinar a concentração de cobre presente nos solos e sucos de laranjas e uvas de produção orgânica que utiliza como fungicida a calda bordalesa e analisar se o cobre é neurotóxico em *C. elegans*.

RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de manuscrito científico que, após tradução para o inglês, será submetido para publicação em revista científica da área de toxicologia.

Artigo: EFEITO DO COBRE SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE

Caenorhabditis elegans

EFEITO DO COBRE SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE *Caenorhabditis elegans*

COPPER EFFECT ON THE NERVOUS SYSTEM OF *Caenorhabditis elegans*

PHILIPPSSEN, D.F¹; KAIZER, R.R.¹; KORF, E.P.¹

RESUMO

O processo produtivo orgânico está utiliza fungicidas como a calda bordalesa, que apresenta em sua composição o sulfato de cobre associado a cal hidratada. A utilização deste fungicida está sendo questionada devido ao impacto do acúmulo de cobre no ambiente, e que consequentemente, pode afetar de forma negativa os organismos vivos, interferindo no metabolismo das células e provocando toxicidade. Nesse contexto, o objetivo deste estudo, foi verificar os teores de cobre presentes em solos e sucos de laranja e uva que recebem como tratamento fungicida a utilização da calda bordalesa. Ainda, avaliar a toxicidade do cobre por parâmetros bioquímico e comportamental pela exposição aguda e crônica do nematódeo *Caenorhabditis elegans*. As concentrações de cobre nos solos e sucos de laranjas e uvas foram identificadas através da Espectrofotometria de Absorção Atômica por Plasma de Argônio e após determinados os níveis de cobre para a avaliação de toxicidade. A exposição ao metal “*in vivo*” foi realizada nas concentrações de 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,3 mg/L e 0,7 mg/L e comparadas com um grupo controle, que recebeu água ultrapura. Os resultados mostraram que há presença de cobre nos solos em níveis maiores que o grupo controle. Observou-se o cobre em um valor médio de 0,25 mg/L no suco de laranja e 0,69 mg/L no suco de uva. Os organismos expostos de forma aguda e crônica a diferentes concentrações mostraram alterações comportamentais e ativaram a atividade da enzima acetilcolinesterase, já em baixas concentrações após exposição crônica houve inibição desta enzima.

Palavras-chave: Calda bordalesa. Suco de frutas. *C. elegans*. Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

The organic production process uses fungicides such as Bordeaux mixture, having in their composition copper sulphate associated with hydrated lime. The use of this fungicide is being questioned due to the impact of the accumulation of copper in the environment, and that consequently, can negatively affect living organisms, interfering in the metabolism of the cells and provoking toxicity. In this context, the aim of this study was to assess the present levels of copper in soils and orange juice and grape receiving treatment fungicide as the use of Bordeaux mixture. Further, to evaluate the toxicity of copper by biochemical and behavioral parameters by acute and chronic exposure of the nematode *Caenorhabditis elegans*. The concentrations of copper in the soils and juices of oranges and grapes were identified through Atomic Absorption Spectrophotometry by Argon Plasma and after determined the levels of

1 Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Erechim/RS, Erechim/RS/BR. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental

copper for the evaluation of toxicity. The metal exposure "in vivo" was held at concentrations of 0.05 mg/L, 0.1 mg/L, 0.3 mg/L and 0.7 mg/L and compared with a control group that received water ultrapure. The results showed that there is presence of copper in soils at higher levels than the control group. Copper was observed in an average value of 0.25 mg/L in orange juice and 0.69 mg/L in grape juice. The organisms exhibited acute and chronic at different concentrations showed behavioral changes and activated the activity of the enzyme acetylcholinesterase, already at low concentrations after chronic exposure there was inhibition of this enzyme.

Keywords: Bordeaux mixture. Fruit juice. *C. elegans*. Acetylcholinesterase.

1 INTRODUÇÃO

Fungicidas à base de cobre são utilizados desde 1800, quando a calda bordalesa foi descoberta por acaso na região de Médoc na França e sua eficiência comprovada contra a proliferação de fungos como o míldio e oídio (MARTINS et al., 2014). A calda bordalesa é uma mistura composta por sulfato de cobre (CuSO_4) e cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) utilizada em culturas convencionais e orgânicas de frutas e hortaliças (BAURAND et al., 2016).

A viticultura é um importante sistema de cultivo que utiliza como fungicida a calda bordalesa com o objetivo de controlar o míldio causado pela *Plasmopara viticola*, que reduz a qualidade da uva (MACKIE et al., 2013; DAGOSTIN et al., 2011). O uso deste fungicida já foi estendido para outras culturas como a citricultura, devido às dificuldades enfrentadas nos manejos das pragas (OLIVEIRA et al., 2010).

O cobre é um elemento natural presente no ecossistema e desempenha um papel importante em muitos processos fisiológicos e bioquímicos dos organismos vivos e serve como um cofator para diversas enzimas. Apesar do seu papel biológico, altas concentrações deste elemento podem ser tóxicas e causar efeitos adversos nos seres vivos, por isso é fundamental compreender a acumulação, os agentes causadores e a toxicidade gerada pelo cobre ao ambiente e os impactos provocados à saúde humana (EYCKMANS et al., 2012; DE LIMA; ROQUE; DE ALMEIDA, 2013; MARTINS et al., 2012).

Para a avaliação da ecotoxicidade, tem sido utilizado um importante modelo animal, o nematódeo - *Caenorhabditis elegans* (LEELAJA; RAJINI, 2013). Este nematódeo apresenta uma organização simples nos aspectos anatômicos e fisiológicos (FITISANAKIS; NEGGA; HATFIELD, 2014) e uma similaridade de aproximadamente 72% com o genoma humano (COLMENARES et al., 2016). São formados por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4), adulto jovem e adulto (GUO et al., 2016). Além disso, apresentam propriedades vantajosas como facilidade na manipulação do seu genoma, ciclo de vida curto, autofertilização, corpos

pequenos e transparentes (FITISANAKIS; NEGGA; HATFIELD, 2014), e alta sensibilidade a vários toxicantes e estressantes (WU et al., 2016), sendo um bom modelo de organismo para estudos em toxicologia, neurotoxicologia e triagem em biomedicina (GUO et al., 2016).

Os efeitos causados pela exposição a metais englobam o comprometimento no crescimento, na atividade enzimática e comportamento, bem como impactos ecológicos (JORGE et al., 2013). Assim, há necessidade de investigar as consequências da exposição ao cobre através dos biomarcadores bioquímicos que determinam o potencial risco de substâncias tóxicas sobre a saúde dos organismos (JORGE et al., 2013; QUINTANEIRO; RANVILLE; NOGUEIRA, 2015). Estudos para avaliar a exposição a pesticidas, assim como a metais, detergentes e outros componentes contaminantes estão utilizando a atividade da Acetilcolinesterase (AChE) e como biomarcador no processo de avaliação de risco para o ambiente (HAMPEL; BLASCO; MARTÍN DÍAZ, 2016). A sinalização colinérgica executa um papel importante nas estruturas do cérebro e na modulação de funções cognitivas e comportamentais, desempenhando função essencial na detecção dos efeitos prejudiciais de substâncias tóxicas (HAVERROTH et al., 2015).

As colinesterases (ChE) são enzimas utilizadas para determinar funções neurais. A classe das ChE inclui a AChE que é uma enzima que está presente no sistema nervoso, tecidos central e periférico (COLOVIC et al., 2013) onde hidrolisa o neurotransmissor Acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas e junções neuromusculares em colina e acetato (DE LIMA; ROQUE; DE ALMEIDA, 2013). A atividade da enzima AChE pode ser inibida por drogas, toxinas naturais, pesticidas e metais pesados, influenciando os parâmetros responsáveis pela síntese da ACh (POHANKA, 2014).

Então, aqui testamos se as concentrações de cobre comumente encontradas em produções que utilizam calda bordalesa, são neurotóxicas em *C. elegans*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização dos cultivos onde foram realizadas as coletas

O presente estudo foi realizado nos laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – Campus Erechim e no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - Sertão, Brasil. Solos e frutas foram coletados de uma propriedade rural de Produção Orgânica de Laranja e Uva, da região. Esta propriedade apresenta Certificado de

Produção Orgânica (Nº12068/2017), devidamente credenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

2.2 Coleta e análise dos solos.

Na propriedade foi estudada uma área de produção de laranjas Valência (*Citrus sinensis*) e outra de produção de uva Isabel (*Vitis labrusca*), sendo que ambas receberam a aplicação de calda bordalesa. Em cada área foi coletado solo de camada de 0-10 cm, em 3 pontos diferentes, configurando 3 repetições e 6 amostras coletadas. As coletas ocorreram 15 dias após a aplicação da calda bordalesa, em períodos diferentes, considerando à época de produção das frutas, sendo em Julho de 2016, para o solo oriundo da produção de laranjas, e Janeiro de 2017, para o solo da produção de uvas. Além disso, foi coletada uma amostra de solo da mesma região que conserva as mesmas características quanto à química, física e biologia do solo, em uma área que nunca recebeu aplicação de calda bordalesa, sendo esta denominada “solo referência”.

Imediatamente após a coleta, os solos foram secos a 105° em estufa, peneirados (2 mm) e armazenados. As análises para verificar as concentrações de cobre foram realizadas por Espectrofotometria de Absorção Atômica por Plasma de Argônio por extração com o ácido dietilenotriaminopentacético de acordo com o método da Embrapa (SILVA, 2009). Foram realizadas três análises por amostra coletada.

2.3 Coleta das frutas, extração e análise dos sucos

As laranjas foram coletadas no período previsto de maturação, 15 dias após a última aplicação de calda bordalesa, em 4 pontos da área de produção, sendo coletadas 5 laranjas por grupo, com 4 repetições cada, totalizando 16 amostras de suco. O processo para a extração dos sucos foi realizado logo após a coleta das frutas. As laranjas foram lavadas em água da torneira, secadas com papel toalha e cortadas em dois pedaços (GUERROUJ et al., 2016). As frutas foram espremidas para obtenção dos sucos para cada amostra avaliada (QUIST-JENSEN et al., 2016). As amostras foram mantidas em embalagens de polipropileno (50 mL), devidamente identificadas, armazenadas em um freezer -17°C (RIZZETTI et al., 2016) e descongelados a temperatura ambiente antes da análise (QUIST-JENSEN et al., 2016).

As uvas foram coletadas também conforme período de maturação, 15 dias após a última aplicação do fungicida, também em quatro pontos da propriedade de videiras, sendo utilizados 10 cachos de uva por grupo, com 4 repetições cada, totalizando 16 amostras de

suco. O processo para a extração dos sucos foi realizado logo após a coleta das frutas e as uvas foram lavadas em água da torneira (GUERROUJ et al., 2016). O suco foi obtido por meio de um extrator de sucos vegetais a vapor, no qual as frutas são submetidas a um cozimento por vapor d'água saturado, resultando em um suco clarificado e com as características de um produto “*in natura*” (ANJOS, 1999). Após foram armazenadas em embalagens de polipropileno (50 mL) devidamente identificadas, armazenados em um freezer -17°C (RIZZETTI et al., 2016) e descongelados a temperatura ambiente antes da análise (QUIST-JENSEN et al., 2016).

A detecção dos teores de cobre presente nos sucos foi através da Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma de Argônio pelo método de diluição com 2% de ácido nítrico (HNO₃) e filtração, sendo que o suco foi diluído 1:1 com 2% de HNO₃ e filtrado com um filtro de papel (SZYMCZYCHA-MADEJA; WELNA, 2013). Foram realizadas três análises por amostra.

2.4 Modelo animal

O organismo modelo utilizado na pesquisa foi o nematódeo *Caenorhabditis elegans* tipo Selvagem N2 obtidos do “Caenorhabditis Genetics Center” (USA) e mantidos em meio de crescimento para nematódeos (NGM) com Ágar e *Escherichia coli* OP50 à 20°C, como descrito por BRENNER (1974). Os nematódeos foram sincronizados sendo expostos a uma solução de “bleaching” contendo NaOH e HOCl (DONKIN AND WILLIAMS, 1995). Os nematódeos sincronizados foram lavados com solução tampão M9 (3g KH₂PO₄, 6g Na₂HPO₄, 5g NaCl, 1L H₂O e 1ml de MgSO₄ 1M) e colocados em placas com tampão M9 até o estágio L1, sendo transferidos para placas contendo NGM.

2.5 Tratamentos

Os vermes foram divididos em cinco grupos: o grupo controle que recebeu água ultrapura (MilliQ) e os demais grupos que receberam doses de cobre extraídos de Sulfato de Cobre II (CuSO₄), que compõe a calda bordalesa, em cinco concentrações de 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,3 mg/L e 0,7 mg/L. Os grupos sofreram exposição aguda e crônica, seguindo a metodologia de COLE et al. (2004).

Na exposição aguda, os vermes foram mantidos em BOD à 20 °C (temperatura ideal para a cepa N2) e alimentados com *E. coli* (condições normais) até o estágio adulto jovem, onde, foram lavados com meio M9, e expostos às concentrações de cobre pelo tempo de uma

hora e mantidos em BOD à 20 °C. Para a exposição crônica os vermes foram sincronizados, e mantidos em BOD até o estágio larval L1 (14 horas após sincronização), então foram lavados três vezes em tampão M9 e colocados em placa contendo meio NGM e alimento (*E. coli*) e, a essa placa, foram adicionados os diferentes tratamentos. Os vermes foram mantidos em BOD à 20 °C até o estágio adulto jovem (48 horas).

2.6 Análise comportamental

As análises comportamentais dos vermes foram realizadas seguindo protocolo previamente estabelecido pela literatura de WANG et al. (2008). O batimento faríngeo foi observado através de microscópio e medido sobre o meio NGM com *E. coli*. O número de contrações do bulbo posterior faríngeo de cada verme foi contado por um período de 10 segundos, em triplicata, e a média multiplicada por seis, resultando no número de contrações por minuto. A análise do ciclo de defecação foi verificada pelo padrão estereotipado de contração peristáltica que ocorre no intestino do verme seguido pela expulsão das fezes. Realizados em placas com NGM contendo bactéria *E. coli* e analisados em microscópio, foram obtidos três intervalos de defecação e realizada uma média entre eles. Oito vermes foram analisados por grupo de exposição.

2.7 Preparação das amostras e análise da atividade da AChE

Após a exposição, os vermes foram lavados em tampão M9, contados e transferidos cerca de cinco mil vermes para tubos de microcentrífuga, após os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada, congelados em nitrogênio líquido por três vezes e, após, mantidos em gelo durante o processo de sonicação, que ocorreu 15 vezes por 10 segundos cada com intervalo também de 10 segundos. A sonicação é o procedimento utilizado para romper a cutícula que recobre o corpo do verme, essa sonicação promove a homogeneização e permite o acesso às proteínas internas. O teor de proteína foi determinado por método colorimétrico, conforme metodologia de BRADFORD (1976). A atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE) foi determinada em vermes em estágio adulto segundo metodologia de COLE et al. (2004).

2.8 Análise estatística

Os dados de análise dos solos foram submetidos à ANOVA para comparação entre o solo referência e os solos tratados, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Já os dados de

análise dos sucos foram submetidos a uma estatística descritiva. Os dados da avaliação comportamental e da atividade da AChE foram submetidos à ANOVA para comparação entre o grupo controle e os grupos tratados, seguido pelo teste Dunnett ao nível de significância de 95% e 99% ($p < 0,05$ e $p < 0,01$).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação do cobre no solo e nos sucos de laranja e uva

A partir as análises realizadas determinamos que o cobre esta presente de forma significativa nos solos de produção orgânica de laranjas e uvas que receberam o tratamento com a calda bordalesa, quando comparados com o solo de planta nativa que nunca recebeu tratamento, o que indica o impacto nas concentrações de cobre oriundo da aplicação do fungicida (Figura 1).

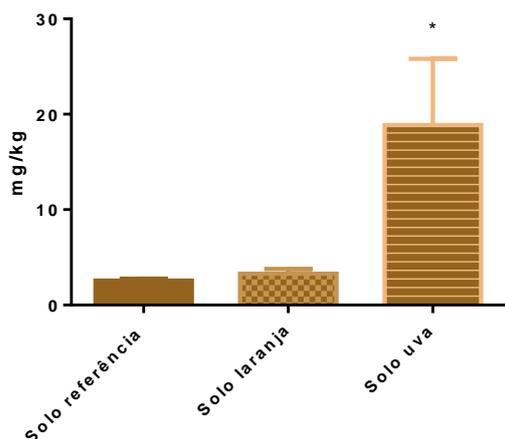


Figura 1. Análise de cobre em solos de produção orgânica de uvas e laranjas: (A) solo de produção de laranja Valência; (B) solo de produção de uva Isabel. Os dados foram expressos com média \pm D.P e analisados pelo teste ANOVA * Indica diferença significativa $p < 0,05$. N= 9.

Ao avaliar dos dados da figura 1 sobre os teores de cobre nos solos de produção orgânica de laranja e uva, é possível observar que a concentração presente no solo de uva é maior que o solo de laranja que recebeu a aplicação com o fungicida composto por cobre.

Ao analisar a presença dos teores de cobre nos sucos, obteve-se um valor médio de 0,25 mg/L (\pm 0,08 mg/L) de cobre em relação aos grupos de suco de laranjas. Já nos grupos de sucos de uvas analisados, a concentração média de cobre obtida foi de 0,69 mg/L (0,22 mg/L).

3.2 Parâmetros comportamentais

A exposição aguda e crônica ao cobre inibiu e estimulou os padrões comportamentais. Houve um decréscimo na taxa de batimentos faríngeos no grupo de exposição 0,05 mg/L, se comparado com o grupo controle (Fig.2A), o que indica uma redução na taxa de alimentação do verme. O cobre causou um aumento no comprimento do ciclo de defecação nos grupos expostos ao cobre nas doses 0,1 mg/L e 0,3 mg/L, quando comparados com o grupo controle (Fig.3A).

Nos grupos de exposição crônica obteve-se uma redução na taxa de batimentos faríngeos na concentração 0,7 mg/L, acompanhado de uma redução no comprimento do ciclo de defecação na concentração de 0,3 mg/L quando comparados com o grupo controle (Fig.2B e Fig.3B).

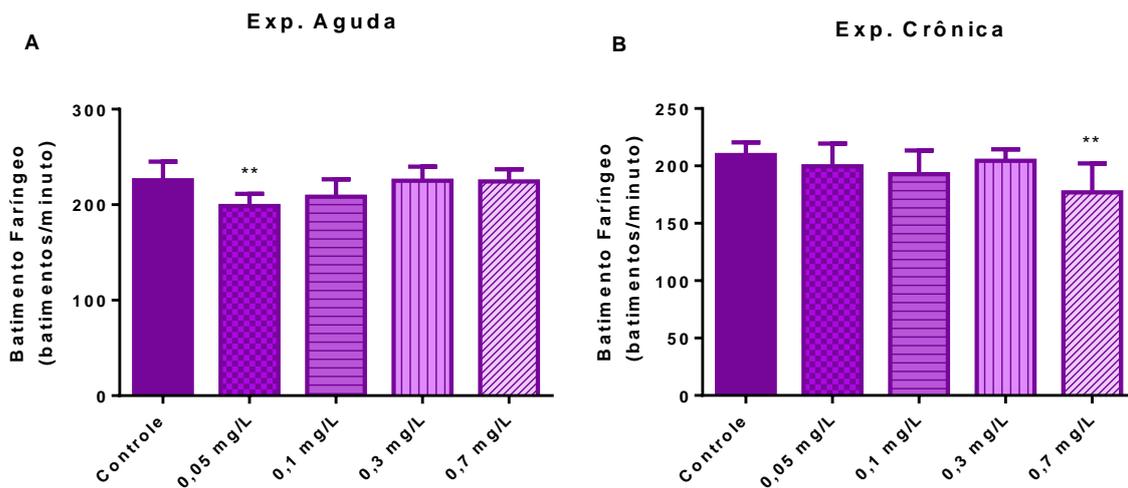


Figura 2 - Efeito da exposição aguda e crônica ao cobre nos batimentos faríngeos em *C. elegans*. A figura mostra batimentos em exposição aguda (A) e batimentos em exposição crônica (B). Os dados foram expressos com média \pm D.P e analisados pelo teste ANOVA. * Indica diferença significativa $p < 0,05$. ** Indica diferença significativa $p < 0,01$. N=8.

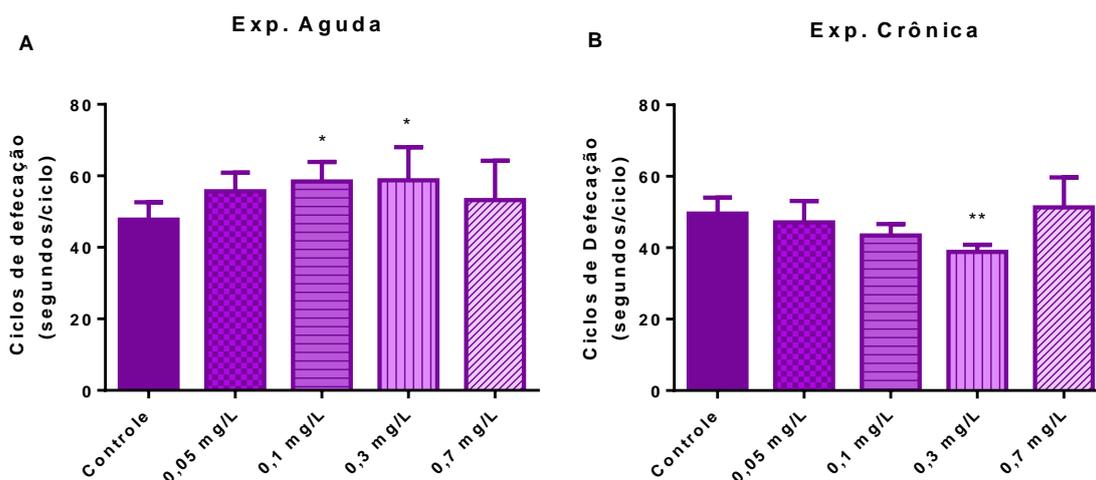


Figura 3 - Efeito da exposição aguda e crônica ao cobre no ciclo de defecação em *C. elegans*. A figura mostra taxa de defecação em exposição aguda (A) e taxa de defecação em exposição crônica (B). Os dados foram expressos com média \pm D.P e analisados pelo teste ANOVA. * Indica diferença significativa $p < 0,05$. ** Indica diferença significativa $p < 0,01$. N=8.

3.3 Atividade da AChE.

Os dados mostraram um aumento significativo na atividade da AChE em exposição aguda nos grupos de tratamento de 0,05 mg/L, 0,1 mg/L e 0,7 mg/L se comparados com o grupo controle (Fig. 4A). A atividade da AChE após exposição crônica ao cobre foi caracterizada por uma redução na atividade da enzima na concentração de 0,05 e 0,1 mg/L e um aumento na atividade enzimática nas doses de 0,3mg/L e 0,7mg/L, quando comparados com o grupo controle (Fig. 4B).

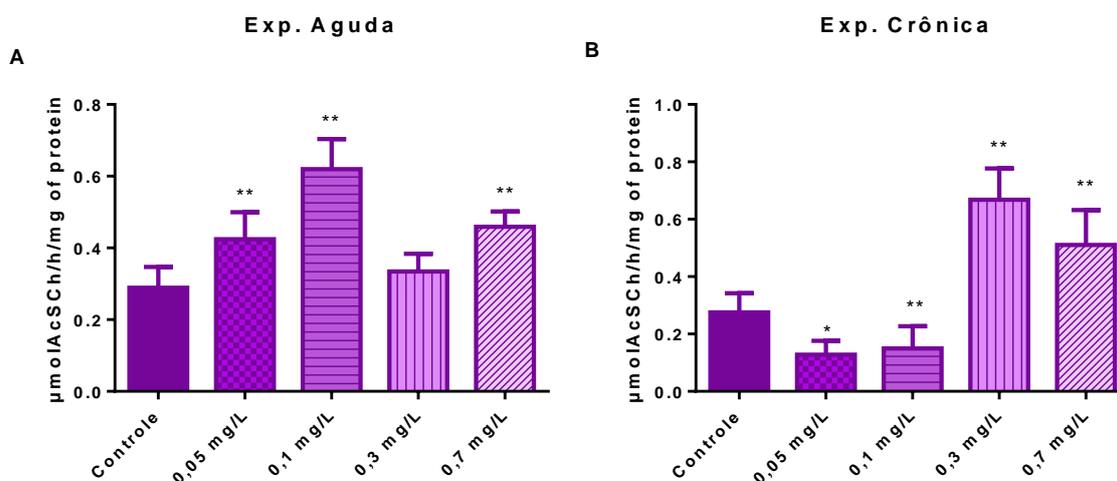


Figura 4 - Efeito de exposição ao cobre na atividade da AChE em exposição aguda (A) e exposição crônica (B). Os dados foram expressos com média \pm D.P e analisados pelo teste ANOVA. * Indica diferença significativa $p < 0,05$. ** Indica diferença significativa $p < 0,01$. N = 5.000

4 DISCUSSÃO

Aqui nós mostramos que as concentrações de cobre comumente encontradas nos solos de cultivo orgânico de uvas e laranjas são maiores que as no solo de referência e que essas concentrações são neurotóxicas para o modelo animal *C. elegans*.

A concentração de cobre nos solos das culturas cultivadas no sistema orgânico e tratadas com calda bordalesa foi maior que o solo referência. Ainda, os solos coletados da área de produção de videiras apresentaram os maiores níveis de cobre, quando comparados aos solos de laranjas. Segundo Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária a concentração de sulfato de cobre na aplicação da calda bordalesa em frutíferas como citros e uvas é a mesma, sendo que as aplicações ocorrem desde a fase de vegetação até a fase de maturação das frutas com intervalos de 10 a 15 dias entre uma aplicação e outra (BRASIL, 2016). De acordo com TIECHER et al. (2016), a concentração de cobre é maior em solos de videiras porque os herbicidas são pulverizados com frequência e geralmente estão localizados em áreas úmidas que apresentam maior probabilidade de desenvolver doenças, o que vai de acordo com o presente estudo.

O cobre se acumula na camada superficial do solo após anos de aplicações dos fungicidas, e por ser imóvel e não se degradar (EL HADRI et al., 2012), e este apresenta efeito ecotoxicológico para o ambiente (MACKIE et al., 2013). As plantas cultivadas em solos que apresentam toxicidade pelo cobre apresentam acúmulo deste elemento nas plantas (TIECHER et al., 2016).

Ao comparar os teores totais de cobre nos solos cultivados em vinhedos e citricultura com os limites críticos estabelecidos pela resolução 420/2009 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), os solos não apresentaram teor maior que o valor de prevenção para contaminação que é de 60 mg/kg de peso seco (BRASIL, 2009).

No entanto, é previsível que os resíduos permaneçam por tempo indeterminado na maioria dos solos e cause impacto na ecologia do solo (GHORBANI, 2007). cobre presente em altas concentrações no solo pode levar ao acúmulo em tecidos vegetais, causando respostas negativas nos aspectos bioquímicos e fisiológicos, variando de acordo com o órgão da planta, concentração do elemento e tolerância dos tecidos (TIECHER et al., 2016).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram baixas doses de cobre detectadas em ambos os solos analisados. GHORBANI (2007), TIECHER et al. (2016) e JACOBSON et al. (2005), relataram que concentrações relativamente baixas de cobre no solo podem resultar em efeitos a longo prazo, como redução da atividade microbiana do solo e posterior perda de

fertilidade. Preocupações quanto aos potenciais impactos de contaminação do cobre em solos agrícolas são uma das principais razões para a limitação sobre o uso de fungicidas composto por este elemento (GHORBANI, 2007).

Os teores de cobre detectados nos sucos apresentaram níveis médios de 0,25 mg/L no suco de laranja e 0,69 mg/L no suco de uva. Pode-se dizer que o aumento da concentração de cobre nas uvas se deve à maior área superficial da uva, ou seja, pelos grãos de uva, sendo que a casca da uva poderia permear mais o metal por ser mais fina. Conforme SAIDELLES (2010), vários fatores como variedade genética, idade, parte do tecido vegetal e ambiente onde é cultivada podem influenciar na quantidade de metais presente nas plantas. As plantas absorvem do solo, pelas raízes, elementos metabólicos na forma de íons e alguns fatores como condições geoclimáticas e atividades antropogênicas favorecem o aumento da concentração.

WANG; ZHOU; CANG (2014), relatam que a calda bordalesa é utilizada em pomares de frutas para combater doenças há mais de um século e muitos estudos tem mostrado que sua aplicação em longo prazo pode aumentar a concentração de cobre no solo, conforme os resultados observados no presente estudo. Os metais pesados são contaminantes e apresentam alta persistência e baixa degradabilidade (LIU; CAO; DOU, 2017), são liberados para o meio ambiente e podem bioacumular nas culturas alimentares, contaminando toda a cadeia alimentar (KHAN et al., 2016). A bioacumulação ocorre quando há um acúmulo de um agente químico, causando efeitos adversos à saúde humana por meio da contaminação ambiental (VINÍCIUS; GOMES; SATO, 2011).

Alguns metais são essenciais para a nutrição humana, porém outros podem representar toxicidade nos alimentos (FRANKE et al., 2006), entre eles o cobre, necessário como cofator enzimático. A contaminação em terras agrícolas por metais pesados pode resultar em exposição dietética através da transferência de solo-planta-cadeia alimentar (YANG et al., 2016). Nos seres humanos, a dieta é a principal via de exposição a metais tóxicos, 75-99% ocorre pela ingestão de alimentos (GHORBANI, 2007), sendo necessário reduzir esta fonte de contaminação (LÓPEZ-ALONSO et al., 2017; QUINTANEIRO; RANVILLE; NOGUEIRA, 2015).

Neste estudo, os teores de cobre detectados nos sucos de uva não excederam os valores determinados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que limita o contaminante inorgânico cobre no máximo 1 mg/L em produtos derivados da uva (BRASIL, 2010). Os valores obtidos nos sucos de laranja também não estiveram acima do limite de

detecção para o cobre em frutas de acordo com a Portaria N° 685, de 27 de agosto e 1998 (10 mg/kg) (BRASIL, 1998). No entanto, KHAN et al. (2016) cita que mesmo em baixas concentrações, os metais são tóxicos e podem causar problemas sérios na saúde das plantas, animais e humanos pelo fato de não ser degradáveis e apresentar alta taxa de bioacumulação e biotoxicidade.

O cobre é um elemento essencial para a síntese de enzimas, mas devido a sua reação de oxirredução ele pode desenvolver espécies tóxicas de oxigênio. Além disso, uma deficiência ou excesso pode afetar as funções cerebrais. As deficiências dos mecanismos homeostáticos do metabolismo do cobre no cérebro estão associadas à neurodegeneração (FERLAZZO et al., 2016) em humanos, como Doença de Menkes, Doença de Wilson, Doença de Alzheimer (SCHEIBER; MERCER; DRINGEN, 2014) e Doença de Parkinson (BULCKE et al., 2015).

Segundo FRANKE et al. (2006), o suco de laranja é composto por vários elementos e substâncias como proteínas, lipídeos, vitaminas, compostos fenólicos e fibras, porém a interação destes componentes com metais de transição podem resultar em efeitos cancerígenos e genotóxicos.

A exposição aguda a cobre aumentou a atividade da enzima AChE nas doses de 0,05, 0,1 e 0,7 mg/L. Já a exposição crônica ao cobre reduziu a atividade da AChE nas doses mais baixas (0,05 e 0,1 mg/L) e aumentou a atividade nas doses mais altas de 0,3 e 0,7 mg/L. A atividade da AChE em resposta à exposição crônica ao cobre, demonstra uma resposta bifásica ao metal, inibindo a enzima em baixas doses, e ativando-a em doses altas (KAIZER, 2008). A resposta bifásica é bem característica do efeito tóxico de metais, como encontrado em resposta a diferentes doses de alumínio que associado ao citrato ativou a atividade da AChE nas regiões de hipocampo, córtex e estriado em cérebros de ratos (KAIZER et al., 2005).

Em nosso estudo, a atividade da AChE foi estimulada a baixas concentrações de cobre na maioria dos grupos de exposição aguda. Um mecanismo como a hipótese de BAINY et al. (2006) explica que um aumento na atividade da AChE em exposições curtas se deve ao fato do metal se ligar aos receptores de ACh, bloqueando a ligação da ACh ao seu receptor e causando um acúmulo de ACh. Este acúmulo causaria um aumento inicial da enzima AChE. No entanto, em um período de exposição crônica dos metais nos receptores, seria produzido menos acetilcolina, gerando uma redução progressiva da AChE, o que somente foi observado

para as doses mais baixas. Um estudo realizado por DE LIMA; ROQUE; DE ALMEIDA (2013) para analisar a interferência de metais como o cobre, chumbo, ferro e cádmio em baixas concentrações (0,01 mM, 0,1 mM e 1,0 mM) na AChE do *Zebrafish* sugere que a inibição *in vivo* de esterases ocorre por mudanças fisiológicas em animais e, conseqüentemente, resultam da diminuição na atividade enzimática, sendo que essa inibição ocorre por efeitos indiretos dos metais.

Já as doses mais altas (0,3 e 0,7 mg/L) após exposição crônica, promoveram um aumento da AChE. Esse aumento da atividade enzimática por um tempo prolongado é prejudicial aos organismos, pois a rápida hidrólise do neurotransmissor ACh na fenda sináptica, antes mesmo deste ligar-se ao receptor no terminal pós-sináptico colinérgico, impede a continuidade da transmissão neuromuscular. Essa ativação observada após exposição prolongada ao cobre promoveu alterações comportamentais nos *C. elegans*, ou seja, a alteração neurológica repercutiu negativamente sobre o verme, pois há redução de taxa de alimentação e defecação, processos essenciais para a vida do organismo e que são controladas pelo sistema colinérgico.

O declínio significativo nos parâmetros comportamentais de batimento faríngeo após exposição aguda e crônica a diferentes concentrações de cobre e na defecação do organismo modelo em exposição aguda. Aqui, a acetilcolina, principal neurotransmissor em junções neuromusculares em nematódeos e a transmissão colinérgica está relacionada direta ou indiretamente em muitos comportamentos do *C. elegans* (RAND; MOLECULAR; BIOLOGY, 2007). Um acúmulo da acetilcolina na fenda sináptica pela inatividade da AChE promove um acréscimo da acetilcolina e uma hiperativação dos receptores colinérgicos e um aumento na contração muscular (ZENG et al., 2017). A inibição da AChE somente foi observada após exposição crônica ao cobre nas doses mais baixas (0,05 e 0,1 mg/L), porém nessas doses e nesse período de exposição não houve alteração nos parâmetros comportamentais avaliados.

Por outro lado, ambos os períodos de exposição, aguda e crônica, promoveram um aumento da atividade da AChE. A exposição aguda aumentou a atividade da AChE nas doses de 0,05, 0,1 e 0,7 mg/L, ou seja, somente a dose de 0,3 mg/L de cobre não apresentou alteração da atividade enzimática. Já a exposição crônica, apresentou um aumento da atividade da AChE nas doses de 0,3 e 0,7 mg/L de cobre, enquanto as doses mais baixas de 0,05 e 0,1 mg/L inibiram a AChE. A neurotoxicidade causada pela exposição ao metal no sistema colinérgico está relacionada à identificação de alterações biológicas e fornece

informações relevantes sobre o mecanismo neuroquímico envolvido nesta toxicidade (KRAFT et al., 2016).

Os resultados mostraram a presença de cobre nos solos e sucos de laranjas e uvas que utilizam a calda bordalesa como tratamento para a prevenção de doenças. Apesar de estarem dentro dos limites estabelecidos pela legislação, para os solos e sucos, as concentrações de cobre mostraram-se tóxicas para *C. elegans*. As exposições aguda e crônica ao metal promoveram ativação da enzima AChE, porém a exposição crônica a baixas doses de cobre inibiram esta enzima, evidenciando uma curva de dose resposta bifásica, típica da exposição a metais.

A importância do sistema de neurotransmissão colinérgica tem sido significativamente evidenciada, pois a nível de sistema nervoso central está relacionada a várias funções cerebrais, como ativação muscular, memória, neuromodulação e controle hormonal. Alterações neurodegenerativas que envolvem disfunções desse sistema podem ser observadas em quadros patológicos como a Doença de Alzheimer. A relação entre o sistema colinérgico e algumas doenças ressalta a importância do bom funcionamento desse sistema. Nossos resultados demonstram que as alterações observadas na atividade da AChE, repercutiram sobre os parâmetros comportamentais avaliados em *C. elegans*. Assim, a alteração da transmissão colinérgica provocada pela exposição aguda e crônica às concentrações de cobre encontradas em sucos de frutas orgânicos, resultaram na redução do batimento faríngeo, o que indica redução na taxa de alimentação dos vermes. Ainda, a exposição aguda aumentou o comprimento do ciclo de defecação dos *C. elegans*, enquanto que a exposição crônica teve efeito contrário, aumentando a taxa de defecação, esta resposta é correspondente à inibição da AChE nas doses mais altas. Essa inibição da AChE diminui a taxa de hidrólise do neurotransmissor ACh que se acumulando na fenda sináptica pode excitar as junções neuromusculares e aumentar taxa de defecação.

Assim, a partir dos resultados obtidos podemos observar que as concentrações de cobre encontradas em sucos de frutas atuam como moduladores do sistema colinérgico, e alteram os parâmetros comportamentais em comparação com o grupo controle. Assim, considerando o fato de que *C. elegans* é um organismo modelo que conserva mecanismos bioquímicos com alta homologia com vertebrados, como o sistema colinérgico, e que o cobre é um metal com potencial bioacumulador, o uso da calda bordalesa como fungicida em produtos orgânicos deve ser revisto, já que a as concentrações de cobre encontrados nos sucos

de frutas orgânicas trazem prejuízos a este sistema e às funções controlados por este, como alimentação e movimentação intestinal de vermes.

REFERÊNCIAS

ANJOS, J.B. Extrator de sucos vegetais a vapor. **Embrapa Semi-Árido**, 85, 1-3, 1999.

BAINY, A.C.D.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P.; ALMEIDA, E.A. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. **Biotemas**, v. 19, n. 1, p. 35-39, 2006.

BAURAND, P. E. et al. Metallothionein gene expression in embryos of the terrestrial snail (*Cantareus aspersus*) exposed to cadmium and copper in the Bordeaux mixture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 4, p. 3068–3072, 2016.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA. Coordenação de Agroecologia. Ficha Agroecológica: Aplicação de calda bordalesa em frutíferas. 20 de dezembro de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA. Portaria nº. 259, de 31 de maio de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, 31 de maio de 2010.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº. 420, de 28 de dezembro de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de dezembro de 2009. p. 81-84.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº. 689, de 27 de agosto de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 de agosto de 1998.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, p. 71-94, 1974.

BULCKE, F. et al. Modulation of copper accumulation and copper-induced toxicity by antioxidants and copper chelators in cultured primary brain astrocytes. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 32, p. 168–176, 2015.

COLE, R.D.; ANDERSON, G.L.; WILLIAMS, P.L. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 194, p.248-256, 2004.

COLMENARES, D. et al. Delivery of dietary triglycerides to *Caenorhabditis elegans* using lipid nanoparticles: Nanoemulsion-based delivery systems. **Food Chemistry**, v. 202, p. 451–457, 2016.

COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

DAGOSTIN, S. et al. Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? **Crop Protection**, v. 30, n. 7, p. 776–788, 2011.

DE LIMA, D.; ROQUE, G. M.; DE ALMEIDA, E. A. Invitro and invivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 45–51, 2013.

DONKIN, S.G., WILLIAMS, P.L. Influence of developmental stage, salts and food presence on various end points using *Caenorhabditis elegans* for aquatic toxicity testing. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 14, p.2139–2147, 1995.

EL HADRI, H. et al. Assessment of diffuse contamination of agricultural soil by copper in Aquitaine region by using French national databases. **Science of the Total Environment**, v. 441, p. 239–247, 2012.

EYCKMANS, M. et al. Comparative proteomics of copper exposure and toxicity in rainbow trout, common carp and gibel carp. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 7, n. 2, p. 220–232, 2012.

FERLAZZO, N. et al. Natural iron chelators: Protective role in A549 cells of flavonoids-rich extracts of Citrus juices in Fe³⁺-induced oxidative stress. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 248–256, 2016.

FITSANAKIS, V.A.; NEGGA, R.; HATFIELD, H.E. *Caenorhabditis elegans* as a model for biomarkers of diseases and toxicities. In: Biomarkers in toxicology. United States: Elsevier, 2014. p.113-128.

FRANKE, S. I. R. et al. Influence of orange juice in the levels and in the genotoxicity of iron and copper. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 425–435, 2006.

GHORBANI, R. Reducing copper-based fungicide use in organic crop protution systems. In: Handbook of organic food safety. Cambidge, England: Woodhead Publishing Limited, 2007. p. 392-408.

GUERROUJ, K. et al. Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, p. 20–28, 2016.

GUO, X. et al. Perfluorooctane sulfonate exposure causes gonadal developmental toxicity in *Caenorhabditis elegans* through ROS-induced DNA damage. **Chemosphere**, v. 155, p. 115–126, 2016.

HAMPEL, M; BLASCO, J; MARTÍN DÍAZ, M.L. Biomarkers and Effects. In: Marine Ecotoxicology: current knowledge and future issues. United States: Elsevier, 2016. p.121-165.

HAVERROTH, G. M. B. et al. Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 440–447, 2015.

JACOBSON, A. R. et al. Diuron mobility through vineyard soils contaminated with copper. **Environmental Pollution**, v. 138, n. 2, p. 250–259, 2005.

JORGE, M. B. et al. Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*) chronically exposed to copper. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 137–147, 2013.

KAIZER, R. R. et al. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 9 SPEC. ISS., p. 1865–1870, 2005.

KAIZER, R.R. **Sistemas purinérgicos e colinérgicos e perfil oxidativo no encéfalo de roedores: influência do alumínio e de diferentes dietas**. 2008. 134f. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) - Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

KHAN, A. et al. Toxic metal interactions affect the bioaccumulation and dietary intake of macro- and micro-nutrients. **Chemosphere**, v. 146, p. 121–128, 2016.

KRAFT, A. D. et al. Neurotoxicology and Teratology Unmasking silent neurotoxicity following developmental exposure to environmental toxicants. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 55, p. 38–44, 2016.

LEELAJA, B. C.; RAJINI, P. S. Biochemical and physiological responses in *Caenorhabditis elegans* exposed to sublethal concentrations of the organophosphorus insecticide, monocrotophos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 94, p. 8–13, 2013.

LIU, J.; CAO, L.; DOU, S. Bioaccumulation of heavy metals and health risk assessment in three benthic bivalves along the coast of Laizhou Bay, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 117, n. 1–2, p. 98–110, 2017.

LÓPEZ-ALONSO, M. et al. Identifying sources of metal exposure in organic and conventional dairy farming. **Chemosphere**, v. 185, p. 1048–1055, 2017.

MACKIE, K. A. et al. Long-term copper application in an organic vineyard modifies spatial distribution of soil micro-organisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 65, p. 245–253, 2013.

MARTINS, V. et al. Copper transport and compartmentation in grape cells. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 11, p. 1866–1880, 2012.

MARTINS, V. et al. Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 82, p. 270–278, 2014.

OLIVEIRA, R. P. DE et al. Produção de citros orgânico no Rio Grande do Sul. p. 296, 2010.

POHANKA, M. Copper, aluminum, iron and calcium inhibit human acetylcholinesterase in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 455–459, 2014.

QUINTANEIRO, C.; RANVILLE, J.; NOGUEIRA, A. J. A. Effects of the essential metals copper and zinc in two freshwater detritivores species: Biochemical approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 37–46, 2015.

QUIST-JENSEN, C. A. et al. Direct contact membrane distillation for the concentration of clarified orange juice. **Journal of Food Engineering**, v. 187, p. 37–43, 2016.

RAND, J. B. Acetylcholine In: The *C. elegans* Research Community, WormBook. 1–21, 2007.

RIZZETTI, T. M. et al. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 196, p. 25–33, 2016.

SAIDELLES, A. P. F.; KIRCHNER, R. M.; SANTOS, N. R. Z.; FLORES, E. M. M.; BARTZ, F. R. Análise De Metais Em Amostras Comerciais De Erva-Mate Do Sul Do Brasil. **Brazilian Journal of ...**, v. 21, p. 259–265, 2010.

SCHEIBER, I. F.; MERCER, J. F. B.; DRINGEN, R. Metabolism and functions of copper in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 116, p. 33–57, 2014.

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas para avaliação da fertilidade do solo**. Brasília Embrapa: Informação Tecnológica, 2009.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M. Evaluation of a simple and fast method for the multi-elemental analysis in commercial fruit juice samples using atomic emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3466–3472, 2013.

TIECHER, T. L. et al. The potential of *Zea mays* L. in remediating copper and zinc contaminated soils for grapevine production. **Geoderma**, v. 262, p. 52–61, 2016.

VINÍCIUS, M.; GOMES, T.; SATO, Y. Rio São Francisco À Jusante Da Represa De Três Marias , Minas Evaluation of Heavy Metal Contamination in Fish of the São Francisco River , Downstream From the Três Marias Dam , Minas Gerais , Brazil. **Saúde e Ambiente**, v. 6, n. 1, p. 24–30, 2011.

WANG, M. C.; O'ROURKE, E. J.; RUVKUN, G. Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. **Science**, p. 957-60, 2008.

WANG, Q. Y.; ZHOU, D. M.; CANG, L. Bioavailability of soil copper from different sources: Integrating chemical approaches with biological indicators. *Pedosphere*, v. 24, n. 1, p. 145–152, 2014.

WU, Q. et al. Quantum dots increased fat storage in intestine of *Caenorhabditis elegans* by influencing molecular basis for fatty acid metabolism. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 5, p. 1175–1184, 2016.

YANG, J. et al. Co-contamination of Cu and Cd in paddy fields: Using periphyton to entrap heavy metals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 304, p. 150–158, 2016.

ZENG, R. et al. Deltamethrin affects the expression of voltage-gated calcium channel $\alpha 1$ subunits and the locomotion, egg-laying, foraging behavior of *Caenorhabditis elegans*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através deste trabalho avaliamos a influência do cobre sobre o organismo do *C. elegans*. Como já era esperado, os níveis de cobre estavam elevados nos solos que receberam o fungicida a base de cobre, assim como encontrado para os sucos. No entanto, observou-se que as doses encontradas nos sucos promoveram alterações relevantes no sistema colinérgico o que repercutiu no comportamento dos vermes. Assim, recomenda-se maior critério para aplicação de calda bordalesa, considerando que o cobre por ser um metal tem potencial de bioacumulação nos sistemas biológicos.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- ANDOW, D. A. et al. Heterogeneity in Intention to Adopt Organic Strawberry Production Practices Among Producers in the Federal District, Brazil. **Ecological Economics**, v. 140, p. 177–189, 2017.
- BALINT, R.; SAID-PULLICINO, D.; AJMONE-MARSAN, F. Copper dynamics under alternating redox conditions is influenced by soil properties and contamination source. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 173, 83–91, 2015.
- BAURAND, P. E. et al. Metallothionein gene expression in embryos of the terrestrial snail (*Cantareus aspersus*) exposed to cadmium and copper in the Bordeaux mixture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 4, p. 3068–3072, 2016.
- BRENNER, S. The nematode *Caenorhabditis elegans*. In: W.W.a.t.C.o.C.e Researchers (Ed.), Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1988.
- CARDOSO, J. DE F.; CASAROTTO FILHO, N.; CAUCHICK MIGUEL, P. A. Application of Quality Function Deployment for the development of an organic product. **Food Quality and Preference**, v. 40, n. PA, p. 180–190, 2015.
- CEKO, M. J.; AITKEN, J. B.; HARRIS, H. H. Speciation of copper in a range of food types by X-ray absorption spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 164, n. May, p. 50–54, 2014.
- CHEN, C. W.; CHEN, C. F.; DONG, C. DI. Copper contamination in the sediments of salt river mouth, Taiwan. **Energy Procedia**, v. 16, n. PART B, p. 901–906, 2011.
- CHEN, J. et al. Comparison of two mathematical prediction models in assessing the toxicity of heavy metal mixtures to the feeding of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 94, p. 73–79, 2013.
- COLMENARES, D. et al. Delivery of dietary triglycerides to *Caenorhabditis elegans* using lipid nanoparticles: Nanoemulsion-based delivery systems. **Food Chemistry**, v. 202, p. 451–457, 2016.
- COSTA, J.C.; LILLEY, C.J.; ATKINSON, H.J.; URWIN, P.E. Functional characterisation of a cyst nematode acetylcholinesterase gene using *Caenorhabditis elegans* as a heterologous system. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 849–858, 2009.
- DE LIMA, D.; ROQUE, G. M.; DE ALMEIDA, E. A. Invitro and invivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 45–51, 2013.
- FENG, J. et al. Tolerance and bioaccumulation of Cd and Cu in *Sesuvium portulacastrum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, n. August 2017, p. 306–312, 2018.
- FERRANTE, M. et al. Bioaccumulation of metals and biomarkers of environmental stress in *Parablennius sanguinolentus* (Pallas, 1814) sampled along the Italian coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 122, n. 1–2, p. 288–296, 2017.

GHORBANI, R. Reducing copper-based fungicide use in organic crop production systems. In: Handbook of organic food safety. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, 2007. p. 392-408.

HAVERROTH, G.M.B et al. Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 440–447, 2015.

HUNT, P.R.; OLEJNIK, N.; SPRANDO, R.L. Toxicity ranking of heavy metals with screening method using adult *Caenorhabditis elegans* and propidium iodide replicates toxicity ranking in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3280–3290, 2012.

KADUKOVÁ, J.; VIRČÍKOVÁ, E. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. **Environment International**, v. 31, n. 2, p. 227–232, 2005.

LI, J.; LE, W. Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Neurology**, v. 250, p. 94–103, 2013.

LEELAJA, B. C.; RAJINI, P. S. Biochemical and physiological responses in *Caenorhabditis elegans* exposed to sublethal concentrations of the organophosphorus insecticide, monocrotophos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 94, p. 8–13, 2013.

MARTINS, V. et al. Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 82, p. 270–278, 2014.

MUKHERJEE, S.; RAY, M.; RAY, S. Shift in aggregation, ROS generation, antioxidative defense, lysozyme and acetylcholinesterase activities in the cells of an Indian freshwater sponge exposed to washing soda (sodium carbonate). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 187, 19–31, 2016.

SHEN, L., XIAO, J., YE, H., WANG, D. Toxicity evaluation in nematode *Caenorhabditis elegans* after chronic metal exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 125–132, 2009.

VIDAL-LIÑAN, L., et al. Bioaccumulation of PCB-153 and effects on molecular biomarkers acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione

peroxidase in *Mytilus galloprovincialis* mussels. **Environmental Pollution**, v. 214, p. 885–891, 2016.

WANG, S.; WU, L.; WANG, Y.; LUO, X.; LU, Y. Copper-induced germline apoptosis in *Caenorhabditis elegans*: The independent roles of DNA damage response signaling and the dependent roles of MAPK cascades. **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, p. 151–157, 2009.

YU, Z.Y.; ZHANG, J.; YIN, D.Q. Toxic and recovery effects of copper on *Caenorhabditis elegans* by various food-borne and water-borne pathways. **Chemosphere**, v. 87, p. 1361–1367, 2012.