



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Mariana Furio Franco

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO EM
TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS AOS
HERBICIDAS COMBINE *500SC (TEBUTIUROM) E VELPAR
K® WG (DIUROM + HEXAZINONA)

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

Co-orientador: Prof. Dra. Lucilene Regina Maschio

Dissertação apresentada para
obtenção do título de mestre em
Biologia Animal, área de
toxicologia, junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Animal
do Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São
José do Rio Preto.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Mariana Furio Franco

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO EM
TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS AOS
HERBICIDAS COMBINE *500SC (TEBUTIUROM) E VELPAR K® WG
(DIUROM + HEXAZINONA)

BANCA EXAMINADORA

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
UNESP- São José do Rio Preto

2º Examinador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre
UFSC – Santa Catarina

3º Examinador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta
USP – Ribeirão Preto

1º Suplente: Profª. Dra. Aparecida Marin Morales
UNESP – Rio Claro

2º Suplente: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodríguez
UNESP- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 15/02/2012

Dedicatória

Aos meus pais Uidelson José Franco e Nadir Furio Franco, e ao meu irmão Lucas Fúrio Franco, a “Grande Família” que me auxiliou e me apoiou nas minhas escolhas

Ao meu namorado Leandro Lazarin Bernardes, que com amor e compreensão, esteve ao meu lado me aconselhando e incentivando durante a realização deste trabalho. Te amo !

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida, que me permitiu realizar esse trabalho, sempre me ensinando e me direcionando pelos caminhos da toxicologia. Obrigada por me orientar com dedicação, paciência, motivação, e com um enorme senso de humor.

À minha co-orientadora, Dra. Lucilene Regina Maschio, que me apresentou à ecotoxicologia, me auxiliou e me aconselhou durante toda a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade e por minha formação profissional.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre, Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta, Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales e Prf. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodríguez, pela aceitação e disponibilidade em avaliar o trabalho.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, que disponibilizou seu laboratório para as análises histológicas, e às professoras Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira e Dra. Sonia Maria Olini, que disponibilizaram seus laboratórios para as análises de microscopia.

Ao prof. Dr. Sérgio Ricardo Batlouni e ao Centro de aquicultura da UNESP de Jaboticabal, por fornecer os peixes utilizados no trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE), pelo transporte dos peixes, pela ajuda no transporte de água até os aquários e pela atuação de suas funções, importante para a realização de todo trabalho dentro do Instituto.

A todos os companheiros de laboratório, pela imprescindível ajuda na montagem dos experimentos e na dissecação dos peixes, sem a qual eu não poderia ter realizado o trabalho. Agradeço também pela companhia e pelos momentos de descontração no laboratório e fora dele.

Ao meu irmão Lucas, pela ajuda nos gráficos do Excel, pela companhia e descontração

Ao meu namorado Leandro, pela ajuda nos gráficos, compreensão, motivação e companheirismo.

A toda minha família, pelo apoio e compreensão.

Às minhas amigas, Suélen, Ariane, Daniele, Caroline, Maysa, Tamires, Natália (Tinga), Valéria, Mariana S., Marianna Z e Vanessa, pelos momentos de convívio alegre e descontraído.

À FAPESP, pelo incentivo e apoio financeiro, com o qual pude comprar os materiais necessários para a realização do trabalho e participar de reuniões científicas que me proporcionaram uma melhor formação.

As convicções são inimigas mais perigosas da verdade do que as mentiras

Friedrich Nietzsche

Resumo

A composição do ambiente aquático influencia diretamente os organismos que nele vivem e a liberação de xenobióticos neste meio pode perturbar sua estrutura e funcionamento. Os praguicidas são graves contaminantes, pois são desenvolvidos para eliminar alguma forma de vida, atingindo também espécies não-alvo. Para avaliar os impactos desses poluentes na qualidade ambiental, é importante mensurar seus efeitos nos organismos vivos, usando-se biomarcadores. O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos/ mutagênicos, bioquímicos e histológicos de diferentes concentrações dos herbicidas Combine *500 SC (0,125; 0,25 e 0,5 ml/L) e Velpar K® WG (0,125; 0,25 e 0,5 mg/L) em *Oreochromis niloticus*. Dois experimentos foram realizados em animais de 10 e 20 cm. Para cada tamanho havia o grupo controle e três grupos com as diferentes concentrações do herbicida testado. Os peixes foram expostos por 72 horas e sacrificados. Com o fígado foi realizada a análise da etoxirresorufina-O-desetilase (EROD); com o fígado e brânquias foram feitas as análises da glutathione-S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e peroxidação lipídica; e com o sangue foram feitos o teste do micronúcleo e o ensaio cometa. Além disso, parte do fígado dos peixes maiores foi utilizada em análise histológica. Os resultados indicaram que ambos os herbicidas induziram a atividade EROD, mas não produziram alteração na atividade GST. Não foi evidenciada peroxidação lipídica por meio da análise de MDA, mas pode ter ocorrido uma maior formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), pouco evidenciada pelas enzimas antioxidantes CAT e SOD. O ensaio cometa revelou maior frequência de células com danos no DNA em indivíduos expostos aos herbicidas do que nos indivíduos controle, porém, não houve diferença significativa na frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares entre os diferentes grupos. A análise histológica não apontou danos aos hepatócitos em decorrência dos herbicidas. Os resultados sugerem que a maior atividade de enzimas de biotransformação da fase I (EROD) gera ERO que podem ter aumentado a frequência de cometas dos indivíduos expostos. Esses danos, porém, provavelmente foram reparados, o que é indicado pelo teste do micronúcleo, que não evidencia maior frequência de danos em peixes expostos. Além disso, pôde-se perceber que não houve diferença na resposta dos peixes ao toxicante dependendo do tamanho dos indivíduos. Com base nesses dados, pode-se perceber que os herbicidas Combine *500 SC e Velpar K® WG provocam alterações bioquímicas e genotóxicas em Tilápias do Nilo.

Palavras-chave: herbicida; mutagenicidade; biomarcadores de poluição; histologia.

Abstract

The composition of the aquatic environment influences the organisms that live at this environment, and the release of xenobiotics into the environment may disrupt its structure and functioning. Pesticides are serious contaminants because they are designed to eliminate pests, but affecting non-target species. To assess the impacts of these pollutants on environmental quality, it is important to measure their effects on living organisms, using biomarkers. The present study aimed to evaluate the genotoxic/mutagenic, biochemical and histological effects of different concentrations of herbicides Combine * 500 SC (0.125, 0.25 and 0.5 ml / L) and Velpar K® WG (0.125, 0.25 and 0, 5 mg / L) in *Oreochromis niloticus*. Two experiments were performed. Each one with two groups of animals of different mean sizes: 10 and 20 cm. For each size we had the control group and three groups with different concentrations of the tested herbicide. Fish were exposed for 72 hours and thereafter sacrificed. Etoxiresorufin-O-desetilasis analysis (EROD) was performed in the liver; the analysis of glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), and lipid peroxidation were done in liver and gills; and the comet assay and micronucleus test were performed in the blood. In addition, part of the larger fish liver was used in histological analysis. The results indicated that both herbicides induced the EROD activity, but produced no change in GST activity. There was no evidence of lipid peroxidation by MDA analysis, but an increase in the formation of reactive oxygen species (ROS) can be occurred, evidenced by SOD and CAT. The comet assay showed higher frequency of cells with DNA damage in animals exposed to herbicides than in control ones, however, there were no significant difference in the frequency of micronuclei and nuclear abnormalities among different groups. Histological analysis showed no damage to hepatocytes due to the herbicides. The results suggest that the higher activity of enzymes on phase I biotransformation (EROD) produces ROS, which may have increased the frequency of comets on exposed animals. This damage, however, were probably repaired, which is indicated by the micronucleus test, that does not show a higher frequency of damage in exposed fish. Moreover, we could notice no difference in the response of the fish toxicant depending on the size of individuals. Based on these data, we can conclude that the Combine * 500SC and Velpar K ® WG causes biochemical and genotoxic changes in Nile tilapia.

Keywords: herbicide; mutagenicity; pollution biomarkers; histology

Sumário

1. Introdução	01
1.1. Poluição aquática e herbicidas.....	01
1.2. Biomarcadores	04
1.3. Marcadores bioquímicos	05
1.3.1. Etoxiresorufina-O-desetilase	07
1.3.2. Glutathione-S-Transferase	08
1.3.3. Superóxido dismutase	09
1.3.4. Glutathione Peroxidase	09
1.3.5. Catalase	10
1.3.6. Peroxidação lipídica.....	10
1.4. Marcadores genotóxicos e mutagênicos	11
1.4.1. Micronúcleo e anormalidades nucleares	11
1.4.2. Ensaio cometa.....	14
1.5. Marcadores morfológicos.....	15
1.5.1. Histologia	15
1.6. <i>Oreochromis niloticus</i> como organismos-teste e bioensaio	15
2. Objetivos.....	17
3. Material e métodos	17
3.1. Material biológico	17
3.2. Exposição controlada e concentrações testadas	19
3.3. Preparação das amostras para análises bioquímicas	20
3.4. Análise da atividade da EROD	21
3.5. Análise da atividade da GST.....	21
3.6. Análise da atividade da SOD	22
3.7. Análise da atividade da GPx	23
3.8. Análise da atividade da CAT	23
3.9. Quantificação de proteínas.....	23
3.10. Análise da peroxidação lipídica	24
3.11. Teste do micronúcleo e teste de anormalidades nucleares	25
3.12. Ensaio cometa	25
3.13. Análise histológica	26
3.14. Tratamento estatístico dos dados.....	27

4. Resultados.....	27
4.1. Herbicida Combine *500SC.....	27
4.1.1. Avaliação de mortalidade.....	27
4.1.2. EROD.....	28
4.1.3. GST.....	29
4.1.4. SOD.....	30
4.1.5. GPx.....	31
4.1.6. CAT.....	31
4.1.7. Peroxidação lipídica.....	32
4.1.8. Micronúcleos e anormalidades nucleares.....	33
4.1.9. Ensaio Cometa.....	35
4.1.10. Histologia.....	36
4.1.11. Médias e Desvios-padrão.....	36
4.2. Herbicida Velpar K [®] WG.....	37
4.2.1. Avaliação de mortalidade.....	37
4.2.2. EROD.....	38
4.2.3. GST.....	39
4.2.4. SOD.....	39
4.2.5. GPx.....	41
4.2.6. CAT.....	42
4.2.7. Peroxidação lipídica.....	42
4.2.8. Micronúcleos e anormalidades nucleares.....	43
4.2.9. Ensaio Cometa.....	44
4.2.10. Histologia.....	45
4.2.11. Médias e Desvios-padrão.....	45
5. Discussão.....	46
6. Conclusões.....	51
7. Referências bibliográficas.....	52

Lista de abreviaturas e siglas

CAT: Enzima catalase

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

COOH : Grupo funcional carboxila

CYP: Citocromo P450

ERO: Espécies Reativas de oxigênio

EROD: Etóxi-resorufina-O-desetilase

GA: Ácido glicurônico

GPx: Enzima glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

GSH: Glutathione em sua forma reduzida

GSSG: Glutathione em sua forma oxidada

GST: Enzima glutathione-S-transferase

H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio

HPAs: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

MDA: Malondialdeído

NADPH: Nicotinamida-adenina dinucleotídeo-fosfato em sua forma reduzida

NH_2 : Radical amino

$\text{O}_2^{\cdot-}$: Radical ânion superóxido

OH : Radical hidroxila

PCBs: Bifenilas policloradas

SH : Radical sulfídrico

SOD: Enzima superóxido dismutase

TBA: Ácido tiobarbitúrico

Lista de figuras

01. Estrutura química do herbicida tebutiuram. Em destaque o grupo das uréias.....	03
02. Estrutura química dos herbicidas diuron (em destaque o grupo das uréias) e hexazinona (em destaque o grupo das triazinonas).....	03
03. Fases I e II do metabolismo de xenobióticos.....	06
04. Esquema mostrando a modificação do xenobiótico ($RH \rightarrow ROH$) pelo CYP.....	08
05. Micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i>	13
06. Imagem dos nucleóides formando cometas de classe 0 (sem dano), classe 1 (pouco dano) classe 2 (dano médio) e classe 3 (muito dano) respectivamente	14
07. Espécime de <i>Oreochromis niloticus</i>	16
08. A: Aclimação dos peixes no laboratório de Ecologia Animal. B: Detalhe de uma das caixas d'água	18
09. Esquema do experimento com herbicida, mostrando um grupo de indivíduos de cada tamanho em aquários compartimentalizados	20
10. Foto do experimento com herbicida, mostrando um grupo de indivíduos de cada tamanho (10 cm e 20 cm) em aquários totalmente compartimentalizados	20
11. Reação mostrando a atividade do citocromo P450 sobre a 7-etóxi-resorufina, formando a 7-hidroxi-resorufina, produto fluorescente detectado pelo fluorímetro.....	21
12. Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDNB. A GSH é introduzida na posição 1 no lugar do CL, dando origem a um conjugado.....	22
13. Esquema mostrando a reação da SOD presente na amostra, que compete pelo radical com o citocromo C.....	22
14. Esquema mostrando a reação utilizada para a leitura da GPx	23
15. Esquema mostrando a reação utilizada para a análise da peroxidação lipídica.....	25

16. Atividade da EROD em fígado de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L.....	28
17. Atividade da GST em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L.	29
18. Atividade da SOD em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L.	30
19. Atividade da GPx em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5ml/L	31
20. Atividade da CAT em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L.	32
21. Peroxidação lipídica em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5ml/L.....	33
22. Micronúcleos e anormalidade nucleares em sangue de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5ml/L	34
23. Micronúcleos e anormalidade nucleares em eritrócitos de <i>O. niloticus</i>	34
24. Ensaio cometa em sangue de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L.....	35
25. Imagem dos nucleóides formando cometas.....	35
26. Histologia de fígado de <i>O. niloticus</i> corado com Hematoxilina-eosina.....	36
27. Atividade da EROD em fígado de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L	38
28. Atividade da GST em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L.	39
29. Atividade da SOD em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg	40

30. Atividade da GPx em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L	41
31. Atividade da CAT em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L	42
32. Peroxidação lipídica em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L.....	43
33. Micronúcleos e anormalidades nucleares em sangue de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L.	44
34. Ensaio cometa em sangue de <i>O. niloticus</i> pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L	44

1. Introdução

1.1. Poluição aquática e herbicidas

O ambiente recebe continuamente produtos químicos (xenobióticos) liberados pelas comunidades urbanas, agrícolas e pelas indústrias. No século 20, milhares de poluentes orgânicos foram produzidos e, em parte, liberados no meio ambiente. Desde o início dos anos sessenta a humanidade tomou consciência do potencial em longo prazo dos efeitos adversos destes produtos químicos em geral e seus potenciais riscos para os ecossistemas terrestres, e em particular, aquáticos, uma vez que o destino final de muitos destes contaminantes é o meio aquático, devido a descargas diretas ou a processos hidrológicos e atmosféricos (STEGEMAN; HAHN, 1994 apud VAN DER OOST et al., 2003).

O meio aquático é um habitat para grande número de seres vivos e sua composição influencia diretamente estes organismos (ALLOWAY; AYRES, 1997). A liberação proposital ou acidental de compostos químicos danosos para o ambiente tem o potencial de perturbar a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas naturais (PRETTI, 2007). A contaminação ambiental pode emanar de uma localização definida (poluição pontual), como as emissões de efluentes líquidos da descarga de esgotos, ou pode ser proveniente de uma maior área de superfície (poluição não pontual), como o escoamento de praguicidas pela precipitação até os corpos d'água (LEVENGOOD; BEASLEY, 2007).

Os praguicidas são um dos contaminantes aquáticos mais graves decorrentes das atividades antropogênicas, pois são desenvolvidos para eliminar alguma forma de vida, como as pragas da agricultura, e atingem também espécies não-alvo (GRISOLIA, 2005 apud BERTI et al., 2009). O crescimento da população, a partir de 1800, e o surgimento da indústria química moderna no século XX alteraram de maneira significativa a produção agrícola mundial. A demanda cada vez maior da quantidade de alimentos produzidos trouxe consigo a justificativa para a utilização de produtos químicos no controle de organismos que afetam essa produção (BEDOR, 2008).

Segundo a Lei Federal nº7. 802 de 11/07/1989 (BRASIL, 1989), praguicidas são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de

crecimento. É um termo utilizado que agrupa herbicidas (controlam plantas daninhas), inseticidas (usado no controle de insetos), fungicidas (controlam fungos causadores de doenças), nematicidas (controlam nematóides) e acaricidas (usados no controle de ácaros) (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

Para identificar herbicidas é útil agrupá-los de acordo com seu mecanismo de atuação nas plantas e sua estrutura química básica. Considera-se que o mecanismo de ação diz respeito ao primeiro ponto do metabolismo das plantas onde o herbicida atua. Um dos mecanismos de ação desses praguicidas é a inibição da fotossíntese dos organismos-alvo. Os inibidores da fotossíntese são considerados inibidores do transporte de elétrons (MORELANDE; HILTON, 1976 apud OLIVEIRA Jr, 2001). Esses herbicidas dividem-se em dois grupos distintos: o que atua sobre o fotossistema II e o que atua no fotossistema I da fotossíntese (OLIVEIRA Jr, 2001).

Os herbicidas inibidores do fotossistema II exercem sua ação fitotóxica ligando-se ao sítio da proteína D1, no qual a quinona B deveria ligar-se para receber os elétrons da quinona A. Isto bloqueia o transporte de elétrons no fotossistema e gera moléculas de clorofila mais carregadas energeticamente (KRUSE et al., 2001). Essa clorofila reage com o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO). Todas essas moléculas altamente reativas irão reagir com os lipídios formadores das membranas, originando a peroxidação lipídica, que, além de formar novos radicais lipídicos, danificam irreversivelmente as membranas celulares (HESS, 2000).

Dentre os inibidores do fotossistema II, encontram-se os que são derivados dos grupos químicos das triazinas (herbicida atrazine), triazinonas (herbicida hexazinona) e uréia (herbicidas diurom e tebutiurom) (OLIVEIRA Jr, 2001). Os praguicidas também são classificados por sua periculosidade ambiental como Altamente Perigoso (Classe I), Muito Perigoso (Classe II), Perigoso (Classe III) ou Pouco Perigoso ao meio ambiente (Classe IV). É uma classificação feita segundo parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico (RIEDER, et al., 2004).

O herbicida de marca comercial Combine* 500SC é composto pelo herbicida tebutiurom (50% m/v, ou 500g/L), cuja estrutura química está evidenciada na figura 01, e por ingredientes inertes (63,3% m/v, ou 633g/L). É seletivo, recomendado para o controle de plantas infestantes na cultura da cana-de-açúcar. Este produto é classificado como perigoso ao meio ambiente (classe III). É altamente móvel, apresentando alto potencial de deslocamento no solo, podendo atingir águas subterrâneas (COMBINE* 500 SC).

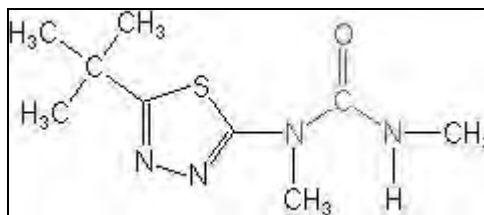


Figura 01. Estrutura química do herbicida tebutiuron. Em destaque o grupo das uréias

O herbicida de marca comercial Velpar K® WG é composto pelos herbicidas diuron (46,8% m/m, ou 468g/Kg) e hexazinona (13,2% m/m, ou 132g/Kg) (Figura 02), além de outros ingredientes (40,0% m/m, ou 400g/Kg). É um herbicida seletivo de ação sistêmica utilizado para o controle seletivo de plantas infestantes na cultura da cana-de-açúcar. Em relação à periculosidade, é classificado como muito perigoso ao meio ambiente (classe II). Este produto é altamente móvel, apresentando alto potencial de deslocamento no solo, podendo atingir lençóis freáticos (VELPAR K® WG).

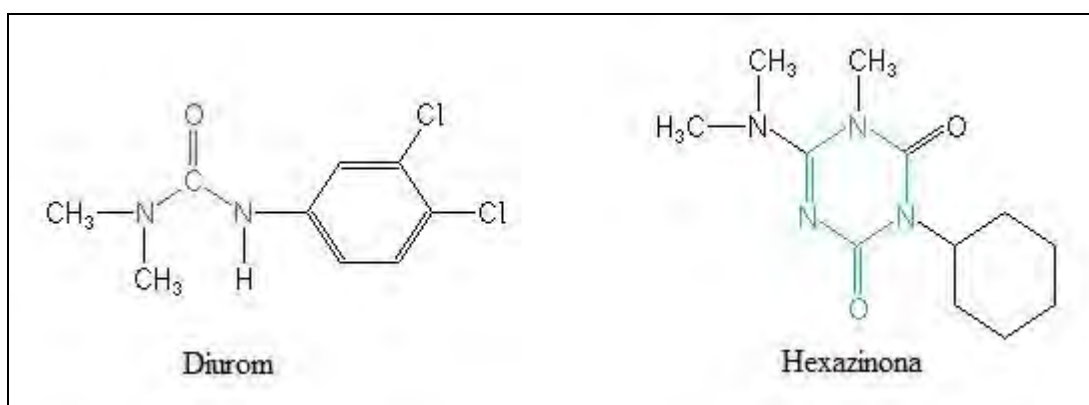


Figura 02. Estrutura química dos herbicidas diuron (em destaque o grupo das uréias) e hexazinona (em destaque o grupo das triazinonas).

Entende-se por seletividade a capacidade de um determinado herbicida em eliminar as plantas daninhas de uma cultura, sem reduzir a produtividade e a qualidade do produto de interesse econômico (NEGRISOLI et al., 2004). A cana-de-açúcar não é prejudicada com o uso desses herbicidas, que agem na fotossíntese, porque podem ser detoxificadas. Segundo Oliveira Junior (2001 b), a detoxificação dos herbicidas no metabolismo das plantas pode ocorrer devido à produção de enzimas, que metabolizam a molécula herbicida. No sistema fotossintético da cana-de-açúcar há pequeno prejuízo na fase inicial, mas que não é suficiente para prejudicar a produção e qualidade dessa cultura.

Uma vez que esses herbicidas agem no fotossistema II da fotossíntese de plantas daninhas, eles são altamente seletivos, atingindo principalmente os organismos-alvo. No

entanto, as águas que saem das lavouras, por exemplo, podem afetar diretamente ou indiretamente a vida de muitos organismos não-alvo, como os peixes (ORUÇ; ÜNER, 1999; BRETAUD et al., 2000). As contaminações de recursos hídricos ocorrem frequentemente por carreamento através do solo após aplicação na lavoura e a ocorrência de chuva, pela lavagem dos tanques de pulverização e por disseminação após aplicação aérea (GRISOLIA, 2005).

Vários organismos não-alvo são expostos à herbicidas de diferentes classes químicas, que podem ser ingeridos ou absorvidos através da pele ou do sistema respiratório (LIVINGSTONE, 2001). Esses praguicidas podem provocar vários efeitos, como alterações genéticas, bioquímicas e morfológicas nos organismos expostos.

1.2. Biomarcadores

Para se diagnosticar a contaminação ambiental existem diferentes abordagens. Uma delas é avaliar a presença de compostos xenobióticos em um segmento de um ecossistema, porém, essa avaliação feita de maneira isolada não indica, por si só, os efeitos prejudiciais que esses contaminantes podem provocar nos organismos expostos. Devem-se estabelecer comparações entre os níveis de exposição externa e início de efeitos adversos à esses organismos (VAN DER OOST et al., 2003). Portanto, avaliar a quantidade de poluentes presentes no ambiente e nos animais não é suficiente, havendo a necessidade de se detectar e avaliar os efeitos destes poluentes nos organismos expostos, devido ao fato de existirem diferenças na forma de metabolizar os xenobióticos. Para se poder detectar e avaliar os efeitos biológicos dos contaminantes utiliza-se o estudo de biomarcadores (RAMSDORF, 2007).

Segundo Ribeiro et al (2003), biomarcador é qualquer resposta biológica a uma substância química ao nível sub-individual, que pode ser medida em um organismo (células, tecidos, etc) ou em seus produtos (urina, fezes, cabelo, etc.), indicando uma alteração do estado normal que não pode ser detectada em um organismo que não foi exposto a esse químico.

Os biomarcadores podem ser utilizados após a exposição a fontes alimentares, ambientais ou ocupacionais, para esclarecer relações de causa / efeito e dose / efeito na avaliação de risco à saúde, em diagnósticos clínicos e para fins de monitoramento.

Geralmente, as respostas de biomarcadores são consideradas intermediárias entre as fontes de poluentes e os efeitos de nível superior, ou seja, visíveis sem o uso de biomarcadores (SUTER, 1990 apud VAN DER OOST et al., 2003). Efeitos de nível superior são sempre precedidos por alterações anteriores em processos biológicos, alterações essas que

são notadas apenas com o uso de biomarcadores, que funcionam como um sinal de alerta precoce dos efeitos de nível superior (BAYNE et al., 1985 apud VAN DER OOST et al., 2003). Considerando-se que muitos biomarcadores são indicadores rápidos de efeitos adversos crônicos, eles podem permitir uma intervenção antes que efeitos prejudiciais irreversíveis tornem-se inevitáveis (RIBEIRO et al., 2003).

Porém, deve-se ressaltar que a aplicação ou interpretação inadequada das respostas do biomarcador pode levar a conclusões falsas quanto ao estresse causado por poluentes ou quanto à qualidade ambiental. Algumas respostas estabelecidas para uma espécie não são necessariamente válidas para outras espécies (VAN DER OOST et al., 2003).

Uma situação de estresse em decorrência da exposição a poluentes normalmente desencadeia uma cascata de respostas biológicas, cada uma podendo, em tese, servir como um biomarcador. Pela triagem de múltiplas respostas de biomarcadores, informações importantes serão obtidas sobre a exposição e estresse de um organismo ao toxicante (McCARTHY et al., 1991 apud VAN DER OOST et al., 2003).

Diversos componentes moleculares e celulares em diferentes espécies têm sido usados como biomarcadores, incluindo parâmetros bioquímicos, genéticos e morfológicos (VAN DER OOST et al., 2003). Dentre eles, podemos examinar as enzimas de biotransformação de xenobióticos, as enzimas antioxidantes, o estresse oxidativo, os testes de genotoxicidade e a histopatologia de alguns órgãos.

1.3. Marcadores bioquímicos

A maioria dos xenobióticos que entra no organismo é lipofílica, uma propriedade que permite que esses compostos exógenos penetrem nas membranas lipídicas e sejam transportados por lipoproteínas nos fluidos corpóreos (HODGSON; GOLDSTEIN, 2001). Uma substância química pode ser eliminada pelo organismo por duas formas principais: ou é excretada na sua forma original ou é biotransformada. A biotransformação geralmente leva à formação de um composto mais hidrofílico que é mais facilmente excretado que o composto original (VERMEULEN, 1996).

A biotransformação pode ser subdividida nas fases I, II e III. A Fase I envolve reações que levam à alteração da molécula original do xenobiótico, que pode ser conjugada na fase II e catabolizada na fase III, por enzimas (por exemplo, peptidases, hidrolases) que catalisam o catabolismo dos metabólitos conjugados (COMMANDEUR et al., 1995 apud VAN DER OOST et al., 2003). As fases I e II estão esquematizadas na figura 03.

Segundo Van der Oost et al (2003) a primeira fase do metabolismo expõe ou adiciona grupos funcionais reativos ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{SH}$, $\cdot\text{NH}_2$, $\cdot\text{COOH}$) por meio de reações de oxidação, redução ou hidrólise. Dessa forma, a característica mais importante dessa fase é transformar compostos lipofílicos em produtos mais solúveis em água, facilitando a excreção destes metabólitos. Para a maioria dos compostos químicos as reações dessa fase são catalisadas por enzimas monooxigenases microssomais, como o citocromo P450 (CYP) (BUCHELI; FENT, 1995).

As reações de fase II envolvem a conjugação do xenobiótico, na sua forma original ou seus metabólitos oriundos da fase I, com compostos endógenos presentes nas células em altas concentrações e resultam no aumento da solubilidade na água e nas taxas de eliminação, podendo reduzir a toxicidade do xenobiótico (LECH; VODICNIK, 1985 apud VAN DER OOST et al., 2003). As enzimas de fase II catalisam as reações de conjugação pela adição de grupamentos mais polares como o tripeptídeo glutatona (GSH) ou o ácido glicurônico (GA) à molécula do xenobiótico. A principal via de conjugação para os compostos eletrofílicos e seus metabólitos é a conjugação, por meio da Glutathione-S-transferase (GST), com a glutatona reduzida, enquanto para compostos nucleofílicos a conjugação com o ácido glicurônico é mais importante (VAN DER OOST et al., 2003).

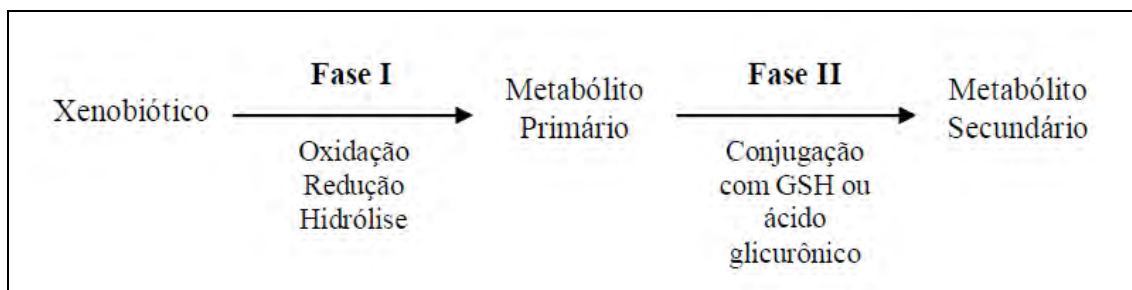


Figura 03. Fases I e II do metabolismo de xenobióticos.

Embora essa seqüência de eventos corresponda geralmente a um mecanismo de detoxificação, em alguns casos os produtos intermediários ou finais podem ser ainda mais tóxicos que os compostos originais, e, a seqüência, nesse caso, pode ser denominada de bioativação (VAN DER OOST et al., 2003).

A biotransformação de xenobióticos é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO), que correspondem aos produtos da redução incompleta do oxigênio molecular, como o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (STEGEMAN et. al., 1992). Essas ERO são oxidantes extremamente potentes, capazes de reagir com macromoléculas celulares críticas, possivelmente levando à

inativação enzimática, peroxidação lipídica, danos no DNA e, finalmente, a morte celular (VAN DER OOST et al., 2003). A peroxidação lipídica é o resultado da atuação dos radicais livres sobre as membranas biológicas que são ricas em ácidos graxos poliinsaturados (ORUÇ e USTA, 2007 apud CLASEN, 2009). Assim, a geração de ERO, mediada pelo citocromo P-450 durante o processo de biotransformação, pode ser considerada uma “reação colateral” indesejada das enzimas de biotransformação de xenobióticos (LACKNER, 1998).

Os organismos aeróbicos, entretanto, apresentam diferentes mecanismos, enzimáticos e não-enzimáticos, de defesa antioxidante que podem prevenir a formação das ERO, reagir com esses intermediários reativos, bem como reparar os danos causados pelos mesmos. As enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) formam um sistema de defesa que tende a diminuir a concentração de oxirradicais. Tais enzimas são importantes na conversão de radicais reativos em moléculas não reativas (VAN DER OOST et al., 2003).

As ERO são formadas e degradadas por organismos aeróbios em suas condições fisiológicas normais (NORDBERG; ARNER, 2001). O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção dessas ERO excede a taxa de sua decomposição por sistemas antioxidantes, levando a um aumento do dano oxidativo em diferentes alvos celulares (ALMEIDA, E. A. et al., 2005). A biotransformação de compostos químicos pode gerar uma quantidade excessiva de ERO, podendo levar o organismo a uma situação de estresse oxidativo (LÓPEZ-BAREA; PUEYO, 1998).

Dessa forma, as enzimas envolvidas no processo de biotransformação, como o CYP 1A e a GST, e as enzimas antioxidantes, como a SOD, GPx e CAT, são importantes biomarcadores bioquímicos na avaliação da toxicologia ambiental, uma vez que a atividade dessas enzimas pode ser alterada em resposta a xenobióticos. Além disso, a mensuração da peroxidação lipídica também é um biomarcador importante, pois é capaz de indicar os danos causados pelo estresse oxidativo gerado pela exposição a certos contaminantes.

1.3.1. Etoxiressorufina-O-desetilase

O citocromo P450, que catalisa as reações de fase I, são heme-proteínas ligadas à membrana, localizadas predominantemente no retículo endoplasmático de células hepáticas (STEGEMAN ET AL, 1992; BUCHELI E FENT, 1995). Em menor escala, também têm sido encontradas em várias outras organelas e tecidos (VAN DER OOST et al., 2003).

As enzimas CYP são importantes no metabolismo de uma grande variedade de compostos endógenos tais como esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, leucotrienos e

outros. Além disso, metabolizam xenobióticos, incluindo fármacos, poluentes ambientais, produtos naturais e outros (NELSON, 1993).

A reação básica catalisada pelo CYP é a monooxigenação, na qual um átomo do oxigênio molecular é incorporado ao substrato lipofílico RH, que corresponde ao xenobiótico, e o outro é reduzido à água, sendo os elétrons necessários para a redução fornecidos pelo NADPH (Figura 04). Nessa reação, o xenobiótico (RH) é convertido para um produto mais solúvel em água (ROH), após a incorporação de um átomo de oxigênio proveniente do oxigênio molecular (LANDIS; YU, 1995).

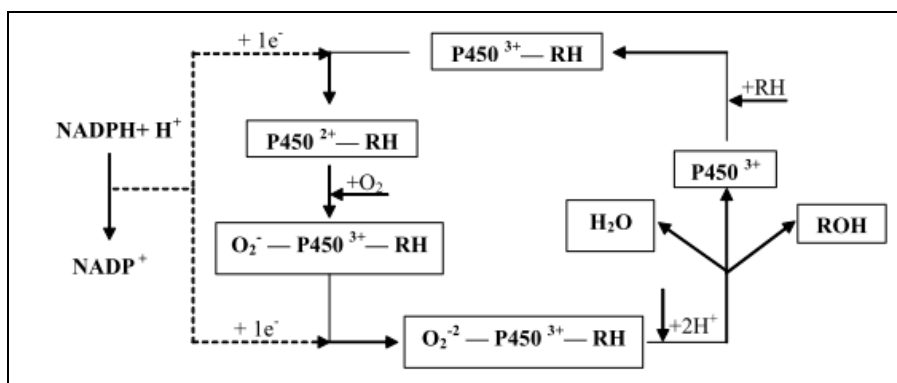


Figura 04. Esquema mostrando a modificação do xenobiótico (RH → ROH) pelo CYP.

Embora a maioria das proteínas da família do CYP não mostre nenhuma resposta a poluentes, a indução forte e seletiva de algumas isoformas da família do CYP pode causar a elevação significativa nos níveis totais de CYP. Dessa forma, sua atividade pode servir como um indicador biológico de exposição a determinadas classes de produtos químicos xenobióticos. Nos peixes, a classe de isoformas CYP1A é a responsável pela biotransformação de uma miríade de compostos xenobióticos (HPAs, PCBs, dioxinas, etc) (BUCHELI; FENT, 1995; STEGEMAN; HAHN, 1994 APUD VAN DER OOST, 1993).

1.3.2. Glutathione-S-Transferase

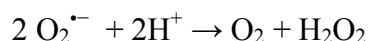
As GSTs, família de enzimas primariamente citosólicas atuantes na fase II da biotransformação, têm o fígado como principal fonte, onde essa enzima corresponde a uma grande fração das proteínas hepáticas solúveis. A atividade da GST também já foi descrita em órgãos extra-hepáticos, entretanto sua atividade nesses tecidos é geralmente menor do que no fígado (SIJM; OPPERHUIZEN, 1989 apud VAN DER OOST et al., 2003).

Devido ao papel que as GSTs desempenham na conjugação de eletrófilos, a indução destas enzimas deve ser considerada benéfica, embora a ativação metabólica de xenobióticos

pela GST também seja reconhecida (COMMANDEUR et al., 1995). A avaliação da GST tem sido bastante relatada em peixes como bioindicadora na avaliação de impacto ambiental (AHMAD et al., 2000; PEIXOTO et al., 2006; YI et al., 2007).

1.3.3. Superóxido dismutase

As SODs, família de metaloenzimas que desempenham papel antioxidante central (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2005), catalisam a conversão do ânion reativo superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular, conforme a reação a seguir (VAN DER OOST et al., 2003):



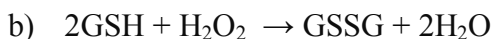
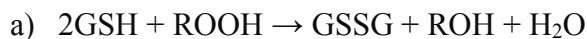
O H_2O_2 é também uma ERO, que é posteriormente detoxicado por diferentes enzimas, como a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (VAN DER OOST et al., 2003).

Existem diferentes tipos de SOD que podem variar quanto a sua estrutura e localização. Nos peixes, assim como em outros animais, existem duas formas de SOD que contêm cobre e zinco (CuZn-SOD): uma delas corresponde à enzima presente principalmente no citoplasma das células, mas que também pode estar presente nos lisossomos, peroxissomos, núcleo e espaço intermembranoso das mitocôndrias; um outro tipo de CuZn-SOD corresponde à SOD extracelular, normalmente associadas à superfície das células, especialmente nos vasos sanguíneos. Um terceiro tipo de SOD é aquele que contém um íon manganês, no estado de valência Mn^{+3} , e está localizado na mitocôndria. A Mn-SOD desempenha papel central na regulação da concentração de $O_2^{\bullet-}$ intra-mitochondrial e, portanto, na proteção da mitocôndria contra o estresse oxidativo (HERMES-LIMA, 2004).

Em relação à presença de contaminantes, vários trabalhos mostram que a atividade da SOD tende a ser alterada em locais poluídos, sugerindo que sua atividade pode ser usada para medir a severidade do impacto ambiental (VAN DER OOST et al., 2003).

1.3.4. Glutathione Peroxidase

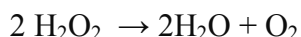
As peroxidases são enzimas antioxidantes que reduzem uma variedade de peróxidos a seus álcoois correspondentes. A principal peroxidase em peixes é uma enzima tetramérica citosólica dependente de selênio que emprega glutathione reduzida (GSH) como co-fator. A GPx catalisa o metabolismo de peróxidos lipídicos (ROOH) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), envolvendo a oxidação concomitante da GSH reduzida à sua forma oxidada (GSSG), conforme as reações a seguir (VAN DER OOST et al., 2003):



A GPx pode estar localizada no citosol, bem como na matriz mitocondrial, e divide com a catalase a habilidade para detoxificar o H_2O_2 . Entretanto, como a catalase está geralmente restrita aos peroxissomos, os peróxidos da matriz citoplasmática e mitocôndrias são então detoxificados principalmente pela GPx (LACKNER, 1998). Assim como as demais enzimas antioxidantes, a atividade da GPx pode ser alterada por poluentes ambientais (VAN DER OOST et al., 2003).

1.3.5. Catalase (CAT)

As catalases (CATs) são enzimas que facilitam a remoção do H_2O_2 , que é metabolizado em oxigênio molecular (O_2) e água, conforme a reação a seguir:



Ao contrário de algumas peroxidases que podem reduzir vários peróxidos lipídicos, as CATs podem reduzir apenas o H_2O_2 (STEGEMAN et al., 1992). Além disso, quando o H_2O_2 está presente em baixas concentrações (condição fisiológica normal) a GPx é quem se encarrega de transformá-lo em água (CHANCE et al., 1979).

As CATs ocorrem primariamente nos peroxissomos e a proliferação peroxissômica é a principal causa para a elevação da atividade catalásica nos tecidos. A catalase está presente em todos os tecidos de vertebrados, com atividade particularmente alta nos eritrócitos e no fígado (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2005).

Em geral, tanto a indução como a inibição da CAT pode ser observada após a exposição a poluentes ambientais (VAN DER OOST et al., 2003).

1.3.6. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica, consequência do estresse oxidativo, consiste em uma reação em cadeia na qual oxidantes fortes causam a quebra dos fosfolípidios de membrana que contém ácidos graxos polinsaturados. Os danos da peroxidação lipídica para as membranas biológicas podem ser de vários níveis de severidade, dependendo da natureza e concentração do oxidante, variando desde reduções localizadas na fluidez da membrana até a ruptura total da integridade da bicamada (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2005). Além disso, os hidroperóxidos resultantes da peroxidação são instáveis e se decompõem em misturas complexas de aldeídos, cetonas, alcanos e ácidos carboxílicos que podem formar aductos com o DNA (VAN DER OOST et al., 2003).

Muitos estudos têm demonstrado o aumento da peroxidação lipídica em vários tecidos de peixes expostos a diversos tipos de contaminantes (STEGEMAN et al., 1992). Dessa forma, a peroxidação lipídica pode ser usada como biomarcador. Mas esse processo também pode ocorrer como consequência de danos celulares de outra natureza, e o aumento da peroxidação lipídica isolado é insuficiente para indicar que mecanismos mediados por ERO sejam a base para a toxicidade de um determinado composto.

1.4. Marcadores genotóxicos e mutagênicos

Além dos biomarcadores bioquímicos, os biomarcadores genéticos também são importantes na avaliação do impacto ambiental causado por xenobióticos. Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa, ou mesmo quebras da molécula de DNA. Na grande maioria dos casos a lesão é reparada pelo próprio sistema de reparo da célula ou a mesma é eliminada. Caso a lesão seja fixada, provocando mutações, que podem perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é considerado mutagênico (UMBUZEIRO; ROUBICEK 2003). Embora as mutações possam surgir espontaneamente, a maioria delas é provocada por agentes físicos, químicos ou biológicos (MATSUMOTO, 2004).

As mutações são a fonte de variabilidade genética de uma população, sendo, portanto fundamentais para a manutenção das espécies. Porém, podem causar danos tanto aos indivíduos como a seus descendentes, dependendo da quantidade, do tipo e do local onde ocorrem (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2003). É possível, por meio de testes citogenéticos, avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos de um determinado composto, o que torna estes tipos de testes imprescindíveis nestas avaliações (RABELLO-GAY et al., 1991).

A função primária dos testes de toxicologia genética é investigar, usando células ou organismos, o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas ou que possam ser transmitidas às futuras gerações (DA SILVA et al., 2003). O teste do micronúcleo e ensaio cometa são ensaios amplamente utilizados na avaliação genotóxica, principalmente por causa da sensibilidade de ambos para detectar danos no DNA (AVAS; KONEN, 2007 apud CAVALCANTE et al., 2008).

1.4.1. Micronúcleos e Anormalidades Nucleares

Os micronúcleos são formações de material nuclear que aparecem no citoplasma como pequenos núcleos satélites do núcleo principal. Os micronúcleos podem ser resultantes de eventos celulares que levam a fragmentação do material genético, como, por exemplo, os

fragmentos acêntricos, decorrentes de quebras cromossômicas durante o processo de divisão celular (agente clastogênico); ou ainda de perdas de cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo principal, durante o ciclo celular, pela inativação do fuso mitótico (agente aneugênico). Assim, as substâncias indutoras de micronúcleo podem ser classificadas como de ação clastogênica ou aneugênica (FENECH, 2000).

A presença de micronúcleo é um fenômeno natural, porém as exposições a compostos genotóxicos aumentam a sua frequência nas células. Os micronúcleos formados por agentes genotóxicos só aparecem após um ciclo de divisão celular (SALVADORI et al., 2003), portanto, a frequência de micronúcleos dentro de uma população de células é altamente dependente da cinética da proliferação celular. Essa cinética pode variar de acordo com a espécie, com o tecido estudado e com as alterações ambientais, entre outros fatores (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

A limitação do uso de micronúcleos para a identificação de danos citogenéticos é que agentes ou substâncias que não quebram cromossomos ou não causam a perda destes na anáfase, não serão detectados, como por exemplo, as aberrações que envolvem rearranjo cromossômico sem ocorrência de fragmento acêntrico (HEDDLE et al., 1983). Apesar disso, HEDDLE et al. (1991) destacam que micronúcleos respondem em curto prazo a uma substância genotóxica, de modo que a sua expressão depende da intensidade da exposição à poluição e da taxa de divisão celular.

O teste de micronúcleo, que avalia a frequência de formação destes pequenos fragmentos de cromatina, é uma técnica citogenética bem conhecida e facilmente aplicável para avaliar danos cromossomais em diferentes organismos causados por estressores ambientais (BOLOGNESI et al. 2006). A metodologia utilizada para avaliar os micronúcleos é fácil e requer apenas o uso de um microscópio. Este teste consiste na contagem de células que contenham um ou mais micronúcleos citoplasmáticos (VIARENGO et al. 2007).

Os eritrócitos de peixes são muito apropriados para a aplicação deste teste por formarem micronúcleos de fácil contagem e pelo fato do sangue ser de fácil obtenção (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Vários estudos utilizam o tempo de exposição a contaminantes por 72 horas, período necessário para que ocorra divisão celular, e consequentemente formação de micronúcleos em peixes.

O sangue periférico é vantajoso na análise de micronúcleos, uma vez que após cessada a exposição, os micronúcleos ainda permanecem por um período. Para verificar a persistência de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico, Schlegel e Macgregor (1982) retiraram amostras de sangue periférico de camundongo, tratados com agentes mutagênicos. Os

resultados mostraram que eritrócitos micronucleados, induzidos por agentes mutagênicos, acumulam-se no sangue periférico, tendo uma pequena ou nenhuma remoção dessas células da circulação.

Além da análise de micronúcleos, algumas alterações na morfologia e no envoltório nuclear, decorrentes de efeitos de substâncias químicas presentes na água podem ser observadas em eritrócitos de peixes. Essas anormalidades foram classificadas como: *blebbed* (evaginações sutis do envoltório nuclear); *lobed* (evaginações proeminentes do envoltório nuclear); *notched* (invaginação do envoltório nuclear ou núcleo em forma de rim) e *broken eggs* (pequena porção nuclear ligada ao núcleo principal por uma pequeno filamento nucleoplasmático) (CARRASCO et al., 1990 apud MASCHIO, 2009) (Fig. 05). Estas alterações podem estar relacionadas com falhas na divisão celular, processo de morte celular e reações decorrentes de genotoxicidade e/ou mutagenicidade de químicos ambientais (FENECH, 2000) e, portanto, podem ser usadas como indicativas de reatividade com o material genético, complementando a análise de micronúcleo.

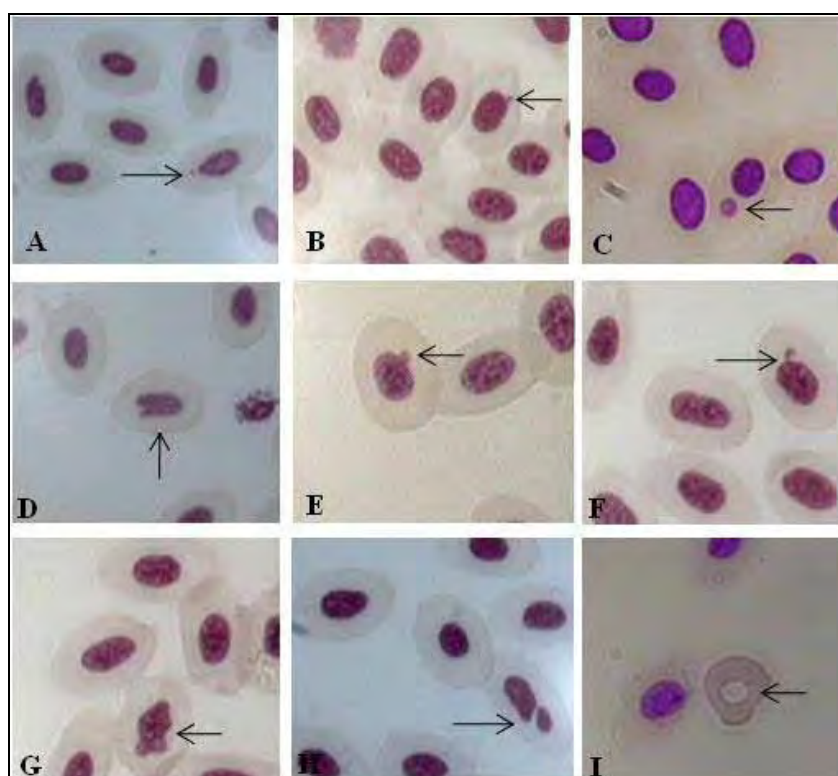


Figura 05: Micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. A-C: Células micronucleadas; D: Núcleo *notched* (seta); E: Núcleo *lobed* (seta); F: *Brokeneggs* (seta); G: Núcleo *blebbed* (seta); H: Célula binucleada (seta); I. Cariólise (seta). MASCHIO (2009).

1.4.2. Ensaio cometa

A detecção de danos no DNA por meio do ensaio do cometa analisa núcleos celulares isolados submetidos a uma solução alcalina para relaxamento do DNA. Estes núcleos, chamados agora de nucleóides, passam por uma eletroforese na qual os fragmentos de DNA migram assumindo o aspecto de um cometa, sendo que o tamanho da cauda do cometa reflete a extensão do dano ao DNA (DAVID, 2007) (Figura 06).

Deve-se ter em mente que não existe célula sem dano no DNA, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar lesões diárias no DNA/célula. O que se faz, rotineiramente é modular as condições técnicas (tempo de relaxamento e eletroforese) para que um mínimo de DNA migre da cabeça para a cauda do cometa nos controles negativos (TICE, 1995).

O ensaio do cometa tem sido amplamente aplicado em eritrócitos do sangue periférico porque estes tipos celulares podem ser facilmente amostrados e a dissociação celular não é necessária (BELPAEME et al., 1998), porém outros tecidos também têm sido testados, pois os efeitos de genotoxicidade de contaminantes podem ser muitas vezes tecido-específicos (BELPAEME et al., 1998).

As vantagens de se empregar o ensaio do cometa para avaliar danos no DNA incluem: mensuração de danos em células individuais; o baixo número de células necessário para a realização do teste; possibilidade de ser realizado em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada e ser um método muito sensível para detectar danos no DNA (LEE; STEINERT, 2003).

O ensaio cometa não é utilizado para verificar mutações, mas sim lesões genômicas que se não forem corrigidas, podem ser processadas levando às mutações (TICE, 2003) o que as caracteriza como lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001). Diferentemente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção (TICE, 1995).

O cometa foi considerado como um método rápido, confiável e sensível de medida quantitativa de danos ao DNA em células eucarióticas e procarióticas. É cada vez mais usado em testes de substâncias para o teste análise de genotoxicidade (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005)

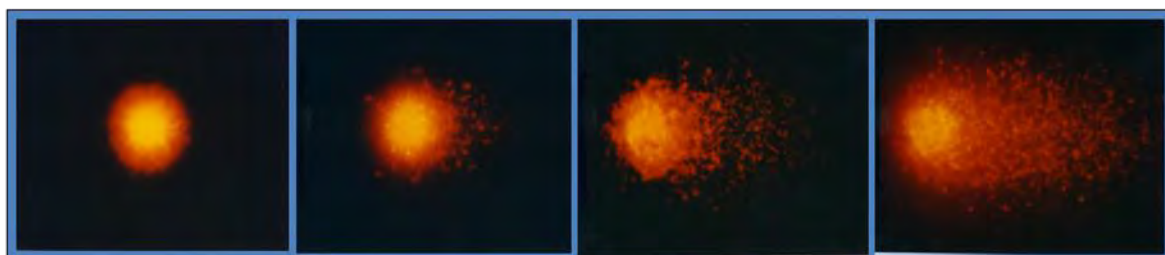


Figura 06: Imagem dos nucleóides formando cometas de classe 0 (sem dano), classe 1(pouco dano) classe 2 (dano médio) e classe 3 (muito dano) respectivamente. KOBAYASHI et al., 1995

1.5. Marcadores morfológicos

A análise morfológica de tecidos fornece informações importantes a respeito da fisiopatologia celular. Assim, padrões morfológicos celulares, teciduais e anatômicos podem ser analisados como biomarcadores de exposição aos contaminantes (VAN DER OOST et al., 2003; BERNET et al., 1999; MURTY, 1986).

A determinação de efeitos adversos de xenobióticos pode ser analisada histopatologicamente, investigando-se lesões, alterações ou formação de tumores (neoplasias) nos tecidos dos peixes (VAN DER OOST ET et al., 2003).

1.5.1. Histologia

A detecção de alterações morfológicas com técnicas de histopatologia pode ser utilizada em diversos tecidos e analisa, principalmente, a exposição a estressores subletais (BERNET et al., 1999). As análises histopatológicas fornecem informação sobre a saúde geral dos animais e sobre modificações teciduais específicas para os diferentes contaminantes (SUNILA, 1987).

A vantagem do uso da histopatologia como um biomarcador está em sua localização intermediária no que diz respeito ao nível de organização biológica. As alterações histológicas aparecem como resposta a médio-prazo quando comparadas às alterações bioquímicas, mas a histologia é um método rápido na detecção dos efeitos dos tóxicos no organismo (BERNET et al., 1999).

Segundo os autores Bruslé e Anadon (1996), o fígado dos peixes é extremamente sensível a variações ambientais e poluentes. Assim, alterações morfológicas encontradas no tecido hepático podem vir a constituir valiosas ferramentas como biomarcadores de contaminação do organismo.

1.6. *Oreochromis niloticus* como organismos-teste e bioensaio

Os peixes têm sido considerados bons indicadores para a detecção de contaminação de recursos hídricos (FARAH et al., 2003). Várias espécies são fáceis de serem mantidas em laboratório e de serem expostas a substâncias tóxicas e, por esse motivo, diversos ensaios laboratoriais têm utilizado espécies de peixe, tanto *in vitro* como *in vivo*, como sistema modelo para estudos toxicológicos (POWERS, 1989). Deve-se destacar, entretanto, a existência de sensibilidade diferenciada entre diferentes espécies de peixes, o que pode dificultar generalizações (RAMSDORF, 2007).

A tilápia é um bom modelo biológico que tem sido utilizado em estudos em que se pretende avaliar o efeito de poluentes em ecossistemas aquáticos dulcícolas, assim como das injúrias resultantes da exposição a esses poluentes (ALMEIDA et al., 2002).

Oreochromis niloticus Linneaus (Tilápia do Nilo, figura 07) é uma espécie de peixe originária da África, que foi introduzida na região nordeste do Brasil em 1971, e então disseminada pelo resto do país. Essa espécie é uma das mais cultivadas no mundo nos dias de hoje, atrás apenas da cultura de carpas e salmonídeos. As suas características, que contribuem para esse bom resultado são: rusticidade; resistência a condições adversas do meio e enfermidades; crescimento rápido e adaptação ao confinamento; hábito alimentar onívoro; aceitação de rações com grande facilidade, desde o período de pós-larva até a fase de terminação. Além disso, entre as espécies de peixes mais cultivadas é a que melhor resiste à altas temperaturas, a baixa concentração de oxigênio dissolvido e a alta concentração de amônia na água (BOSCOLO et al, 2001; El-SAYED, 1999).

Além da escolha do organismo teste, é importante selecionar variáveis como o tamanho. Peixes maiores e com maior teor em gordura podem apresentar maior resistência, por meio da bioacumulação de alguns tóxicos na gordura, em particular quando se trata de pesticidas lipossolúveis (MUNOZ-DE-TORO et al., 2006; SHI et al., 2006 apud PEIXOTO et al., 2009).

Para melhor se entender sobre a ação tóxica de contaminantes, pode-se trabalhar com experimentos laboratoriais, chamados bioensaios, ou por meio de estudos no campo, os biomonitoramentos. O uso de bioensaios permite estudar os efeitos tóxicos de determinados contaminantes de forma isolada ou associados, minimizando a influência das variáveis ambientais. Os resultados obtidos por meio de bioensaios não podem ser transferidos diretamente para o ambiente, mas auxiliam no fornecimento de uma base de dados visando um melhor entendimento dos fatores que estão interferindo na saúde dos organismos e/ou alterando as condições do próprio ambiente (RAMSDORF, 2007).



Figura 07 . Espécime de *Oreochromis niloticus*.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar biomarcadores genéticos e bioquímicos em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas aos herbicidas Combine *500SC (tebutiurum) e Velpar K®WG (diurum + hexazinona) com os seguintes objetivos:

- a) Verificar se há alteração na atividade das enzimas de biotransformação etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e glutathione-S-transferase (GST) em *Oreochromis niloticus* expostas aos herbicidas Combine *500SC (tebutiurum) e Velpar K®WG (diurum + hexazinona);
- b) Verificar a possível existência de estresse oxidativo em *Oreochromis niloticus* expostas aos herbicidas Combine *500SC (tebutiurum) e Velpar K®WG (diurum + hexazinona) evidenciado por peroxidação lipídica e verificar possível aumento na formação de ERO evidenciada por alterações na atividade das enzimas antioxidante superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT);
- c) Verificar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos da exposição de *Oreochromis niloticus* ao herbicida Combine *500SC (tebutiurum) e ao herbicida Velpar K®WG (diurum + hexazinona) por meio do ensaio cometa e teste do micronúcleo;
- d) Analisar a morfologia das células do fígado de *O. niloticus* expostas aos herbicidas Combine *500SC (tebutiurum) e Velpar K®WG (diurum + hexazinona);
- e) Verificar se há diferença nos efeitos causados pelo herbicida Combine *500SC (tebutiurum) e pelo herbicida Velpar K®WG (diurum + hexazinona) em *Oreochromis niloticus* dependendo da concentração em que os espécimes são expostos (se o efeito é dose-dependente);
- f) Verificar se há diferença nos efeitos causados pelo herbicida Combine *500SC (tebutiurum) e pelo herbicida Velpar K®WG (diurum + hexazinona) em *Oreochromis niloticus* de diferentes portes (tamanho);
- g) Verificar se há diferença entre os efeitos do herbicida Combine *500SC (tebutiurum) e do herbicida Velpar K®WG (diurum + hexazinona);

3. Material e métodos

3.1. Material biológico

Os organismos-teste utilizados para a realização do estudo foram espécimes de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), conhecidas como Tilápias do Nilo. Os peixes

foram fornecidos pelo centro de aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (CAUNESP), e em seguida, levados para o Laboratório de Ecologia Animal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE), onde permaneceram por uma semana aclimatando em temperatura média de 28 °C, para posteriormente serem usados nos experimentos (Fig. 08).

O trabalho compreendeu a realização de dois experimentos: um expondo os espécimes ao herbicida Combine *500SC (tebutiurum) e outro ao herbicida Velpar K®WG (diurom + hexazinona). Em ambos os experimentos foram utilizados 48 espécimes, sendo 24 de aproximadamente 10 cm de comprimento e 45 g de massa (peixes de menor porte) e 24 de aproximadamente 20 cm de comprimento e 200 g de massa (peixes de maior porte). No teste com o Combine *500SC, os peixes de menor porte apresentaram comprimento médio de $11,68 \pm 1,23$ cm e massa média de $47,19 \pm 15,5$ g; e os de maior porte, comprimento médio de $20,74 \pm 1,79$ cm e massa média de $284,16 \pm 77,95$ g. No segundo experimento os peixes menores tinham comprimento médio de $10,73 \pm 1,72$ cm e massa média de $43,00 \pm 13,42$ g; e os maiores, comprimento médio de $18,76 \pm 2,15$ cm e massa média de $182,51 \pm 58,39$ g. No presente trabalho, os indivíduos de menor porte serão considerados como peixes de 10cm, e os de maior porte como peixes de 20cm.

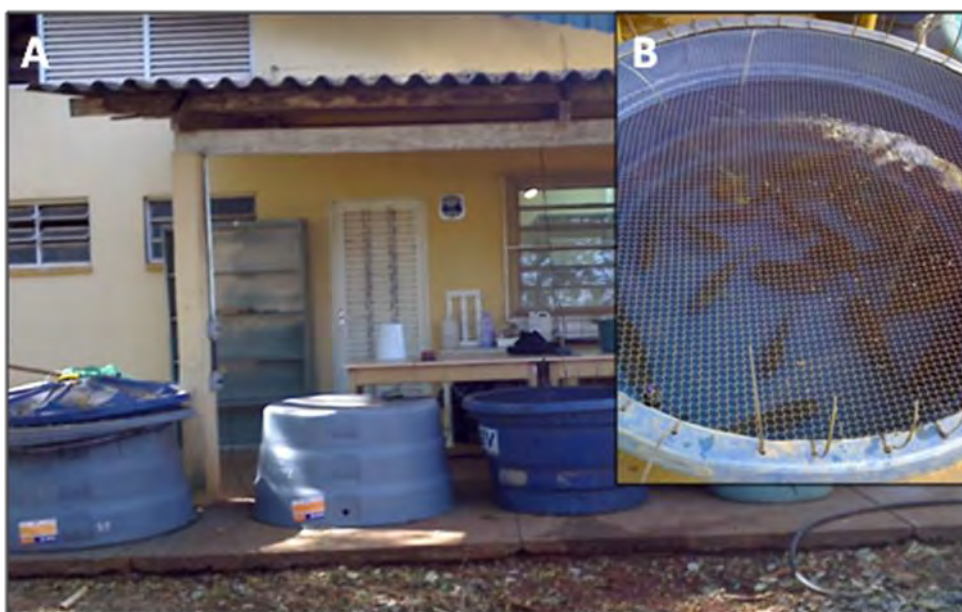


Figura 08. A: Aclimação dos peixes no laboratório de Ecologia Animal. B: Detalhe de uma das caixas d'água.

3.2. Exposição controlada e concentrações testadas

Em ambos os experimentos, utilizou-se oito aquários de vidro com capacidade de 100L, sendo que cada aquário apresentava seis compartimentos de 17 L isolados um do outro, reduzindo assim a interação entre os espécimes, e consequentemente, o estresse. Foi colocado apenas um peixe em cada compartimento, totalizando seis peixes por aquário (Figs. 09 e 10).

No primeiro experimento, dois aquários foram destinados para os controles negativos, contendo apenas água de poço artesiano, sendo que um deles para peixes de 10 cm, e o outro, para os peixes de 20cm. Os demais aquários tiveram destinações distintas. Três deles, contendo os peixes menores, receberam concentrações crescentes do herbicida Combine *500SC (tebutiurum), enquanto os outros três, contendo os peixes de maiores, também receberam as mesmas concentrações crescentes do herbicida. Dessa forma, cada um dos três aquários destinados à exposição de peixes de tamanho específico ao herbicida continha uma determinada concentração de Combine *500SC: 0,125; 0,25 e 0,5 ml/L. Essa concentração é referente às seguintes concentrações de tebutiurum: 62,5; 125 e 250 mg/L.

O segundo experimento foi semelhante ao primeiro, diferindo apenas quanto ao herbicida testado (Velpar K®WG) e quanto as concentrações utilizadas: 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L. Essa concentração é referente às seguintes concentrações de diurum: 58,5; 111 e 234 mg/L, e às seguintes concentrações de hexazinona: 16,5; 33 e 66 mg/L.

As concentrações utilizadas tiveram como base a diluição da solução indicada para uso na agricultura. No caso do experimento com o Combine *500SC, a concentração de 0,5 ml/L consiste em uma diluição de 10x o recomendado na agricultura. Já no caso do experimento com o Velpar K®WG, a concentração de 0,5 mg/L é uma diluição de 1000x o utilizado na agricultura. Considerando que no ambiente o herbicida aplicado a uma lavoura sofrerá diluição até atingir um corpo d'água, ponderamos na escolha de uma concentração diluída em relação àquela aplicada na lavoura.

A unidade utilizada no caso do primeiro experimento (ml/L) é devido à forma de suspensão concentrada do Combine *500SC. No experimento com o Velpar K®WG, usa-se mg/L porque o herbicida é um granulado dispersível.

Os aquários foram mantidos sob constante aeração e temperatura, nenhum alimento foi fornecido aos peixes durante o experimento e os espécimes permaneceram nos respectivos aquários por 72 h, para se estimar os possíveis efeitos do herbicida. Esse tempo de exposição foi escolhido porque sabe-se que dentro desse período, é possível surgir alterações nos biomarcadores analisados.

Após esse período, os animais foram anestesiados com benzocaína para retirada de fígado, brânquias e sangue. Com o sangue retirado, foram confeccionadas lâminas histológicas para análise de micronúcleo e cometa no mesmo dia da coleta. Já o fígado e as brânquias foram congelados à temperatura de -80°C para posterior análise enzimática. Uma pequena fração do fígado foi mantida no fixador Karnovsky para o preparo histológico.

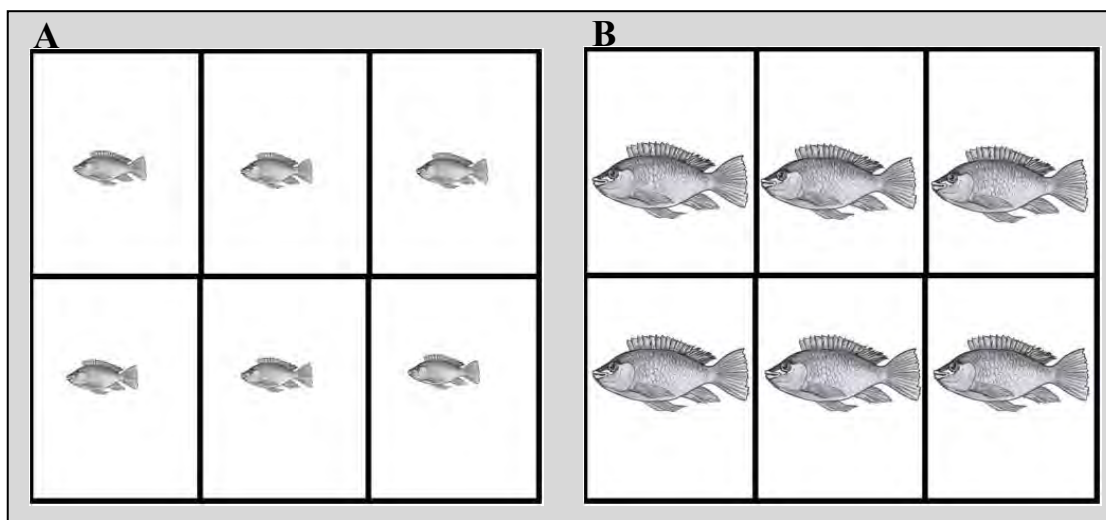


Figura 09. Esquema do experimento com herbicida, mostrando um grupo de indivíduos de cada tamanho em aquários compartimentalizados. **A:** aquário contendo peixes de média de 10 cm; **B:** aquário contendo peixes de média de 20 cm.

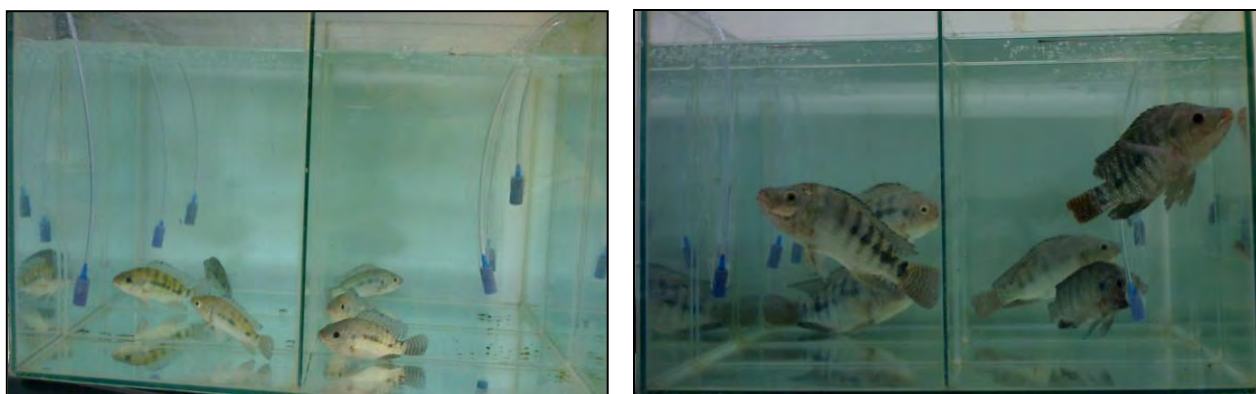


Figura 10. Foto do experimento com herbicida, mostrando um grupo de indivíduos de cada tamanho (10 cm e 20 cm) em aquários totalmentes compartimentalizados.

3.3. Preparação das amostras para análises bioquímicas

Para a análise das enzimas EROD, GST, SOD, GPx e CAT, os tecidos (fígado e brânquias) foram homogeneizados (1:4 massa:volume) em tampão Tris-HCl 20 mM, pH7,5, contendo sacarose 0,5 M, EDTA 1mM, DTT 1mM e KCl 0,15 M, contendo inibidor de protease (PMSF) a 1 mM, e em seguida centrifugados a $10.000 \times g$ por 30 minutos. A fração

sobrenadante foi então coletada e centrifugada novamente a 50.000 x g por uma hora, de forma a obtermos as frações de *pellet* e sobrenadante.

As atividades da GST, SOD, GPx e CAT foram medidas na fração sobrenadante. Para a análise da EROD, como indicativo da atividade do citocromo P450, utilizou-se a fração de *pellet*, que foi ressuspensa em 100 ml tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo EDTA 1mM, DTT 1mM, e KCl 0,1M.

3.4. Análise da atividade EROD

O método mais comumente utilizado para se determinar a atividade catalítica associada à CYP1A é o ensaio da 7-etóxi-resorufina-O-desetilase (EROD). Esta análise é um método cinético que mede a O-desalquilação, mediada pela CYP1A, do substrato não fluorescente 7-etóxi-resorufina em resorufina, um produto fluorescente detectado pelo fluorímetro ($\lambda_{excit}=537$ nm, $\lambda_{emiss}=583$ nm) (SARASQUETE; SEGNER, 2000) (Figura 21).

À cubeta foram adicionados 1950 μ L de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,4; 20 μ L de solução de 7-etóxi-resorufina 335 μ M, 20 μ L de NADPH 20 mM e 10 μ L da amostra. A reação foi observada por 180 s, a 30 °C, e a atividade enzimática calculada de acordo com a quantidade de produto formado por minuto, por miligrama de proteína. Para se quantificar o produto formado, a variação da emissão de fluorescência por minuto observada no fluorímetro foi usada comparativamente a uma curva padrão previamente construída com concentrações conhecidas de padrões autênticos de resorufina.

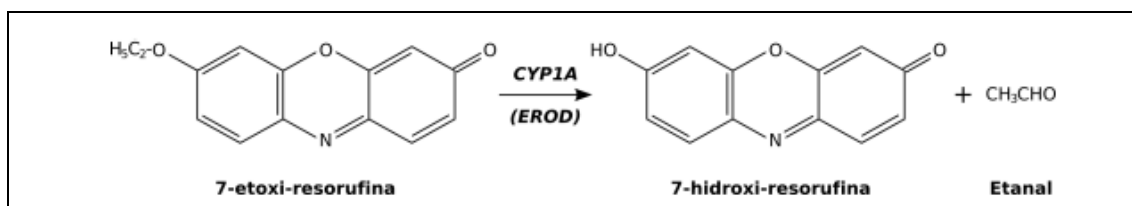


Figura 11. Reação mostrando a atividade do citocromo P450 sobre a 7-etóxi-resorufina, formando a 7-hidroxi-resorufina, produto fluorescente detectado pelo fluorímetro.

3.5. Análise da atividade GST

A maioria dos estudos determina a atividade GST total utilizando o substrato artificial 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), que é conjugado por três das quatro isoformas de GST (não é conjugado pelas enzimas classe q) (GEORGE, 1994; VAN DER OOST et al., 2003). O acompanhamento da formação do conjugado é feito por meio de espectrofotômetro. A reação está representada na figura 12.

A atividade GST foi feita pelo método de Keen et al., (1976). À cubeta foram adicionados tampão fosfato de potássio 0,2M, pH6,5, 1-cloro-2,4-dinitrobenzo (CDNB), GSH e a amostra, que contém GST. A reação leva a um aumento da absorbância a 340 nm, acompanhado no espectrofotômetro.

Uma unidade (U) é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de produto por minuto por miligrama de proteína.

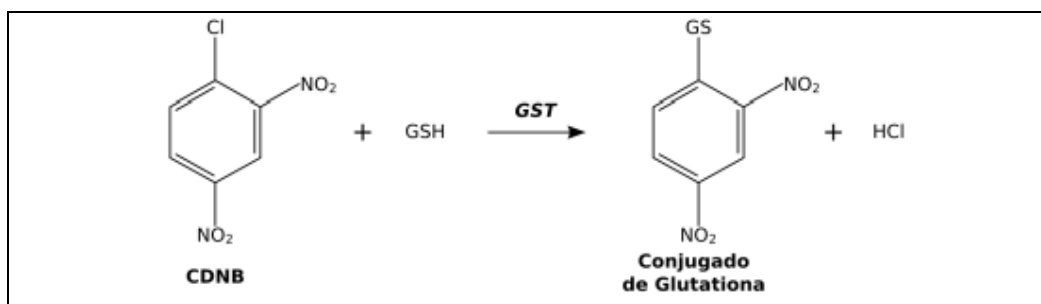


Figura 12. Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDNB. A GSH é introduzida na posição 1 no lugar do CL, dando origem a um conjugado

3.6. Análise da atividade SOD

A maioria das técnicas para a avaliação da atividade SOD são ensaios indiretos em que um composto indicativo compete com a SOD endógena pelo superóxido. Uma delas é a medida da redução do citocromo c por espectrofotômetro (Figura 13). A xantina oxidase oxida a xantina do meio de reação produzindo H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$. O citocromo C oxidado, também presente no meio de reação, é reduzido pelo radical superóxido, mudando de cor, provocando aumento de absorbância em 550 nm à 25 °C. A adição da amostra, que contém a SOD, promove uma inibição na velocidade de redução do citocromo c, pois a SOD compete com o citocromo pelo superóxido (McCORD, FRIDOVICH, 1969). Assim, uma unidade (U) de SOD é definida como a quantidade da enzima que promove 50% de inibição na redução do citocromo C, por minuto, a 25°, em pH 8,0 (STEGEMAN et al, 1992).

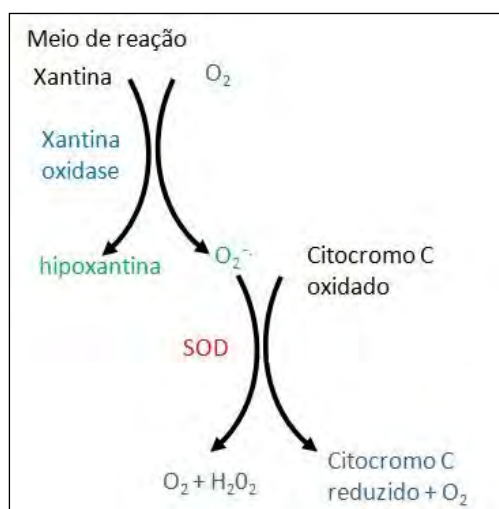


Figura 13. Esquema mostrando a reação da SOD presente na amostra, que compete pelo radical com o citocromo c.

3.7. Análise da atividade GPx

A medida da GPx foi feita pela técnica descrita por Sies et al. (1979). A análise é feita indiretamente, com a medida em espectrofotômetro do consumo do NADPH, que provoca um decréscimo na absorbância a 340 nm. O NADPH é utilizado pela glutathiona redutase (GR) na redução da glutathiona, que anteriormente foi oxidada pela GPx no processo de conversão do peróxido t-butil-OOH em seu álcool correspondente (figura 14). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, em que uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima que oxida 1 μmol de NADPH por minuto, à 30 °C, em pH 7,0.

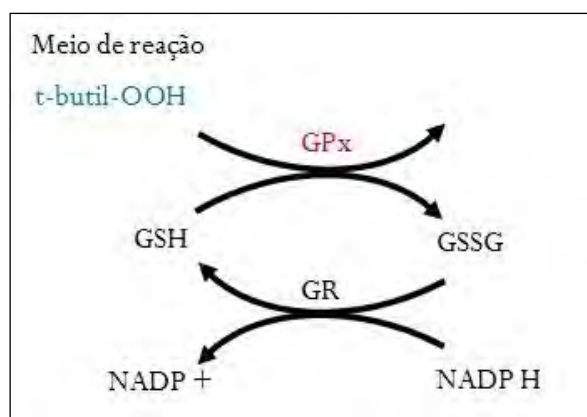
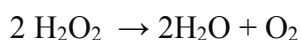


Figura 14. Esquema mostrando a reação utilizada para a leitura da GPx

3.8. Análise da atividade CAT

A atividade foi medida pelo método de Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima presente na amostra (STEGEMAN et al., 1992), através do decréscimo de absorbância em 240 nm, a 30° C.



Uma unidade de CAT corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de H_2O_2 por minuto, a 30 °C, em pH 8,0.

3.9. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976). O reagente de Bradford contém o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução ácida. Este, ao se ligar às proteínas, tem sua absorbância alterada de 465 nm para 595 nm devido à mudança de coloração de castanho para tons de azul, que é proporcional à concentração da proteína, em consequência da interação entre a proteína e o corante, estabilizando-o em sua forma aniônica. O valor de absorbância é determinado por espectrofotometria em 595 nm e realiza-se a

comparação dos resultados com a curva analítica, que contém valores de concentração proteica conhecidos, usando-se a Soro Albumina Bovina (BSA), o que fornece a concentração da proteína em estudo.

Em microtubos adicionou-se 995 μL de Reagente de Bradford comercialmente adquirido e 5 μL de amostra. As amostras e os padrões da curva analítica foram agitadas e colocadas no escuro por aproximadamente 40 minutos. Em seguida procedeu-se a leitura em espectrofotômetro em 595 nm. Calculou-se então a concentração de proteínas nas amostras com base na curva de calibração preparada com Soro Albumina Bovina (BSA) e Reagente de Bradford.

3.10. Análise da peroxidação lipídica

Vários métodos têm sido utilizados para a determinação da peroxidação lipídica em amostras biológicas. O presente trabalho utilizou a detecção do produto formado entre o malondialdeído (MDA), que é um dos produtos finais da peroxidação lipídica, e o ácido tiobarbitúrico (TBA). A reação está ilustrada na figura 15. (HEATH; PACKER, 1968).

Primeiramente as amostras são homogeneizadas (1:3 massa:volume) em tampão Tris HCl 0,1M, pH8,0. O ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é então adicionado e as amostras são mantidas em condições ácidas e em aquecimento por 60 min. Depois do resfriamento, utiliza-se butanol para a extração do produto formado entre o MDA e o TBA. Posteriormente, é feita a detecção desse produto nas amostras injetadas (20 μL), por cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) acoplada ao detector de Uv/Vis, em 532 nm (ALMEIDA et al., 2004). A quantificação se deu por meio da comparação com uma curva padrão previamente injetada no HPLC de padrões autênticos de MDA (obtidos pela hidrólise do tetrametoxipropano) reagido com o TBA nas mesmas condições que as amostras. O sistema de HPLC constitui-se de uma bomba modelo ESA 584 e de detector UV/Vis modelo ESA 526. A coluna utilizada foi ACE 5 C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm). O monitoramento do cromatograma e a identificação e quantificação do pico foram realizados por meio do software EZ Chrom Elite (Agilent Technologies). A fase móvel foi composta por solução fosfato de potássio monobásico 50mM, pH 7,0 (60%) em metanol (40%), bombeada isocraticamente (0,9 ml/min). Os dados foram expressos em nmol/mg de tecido.

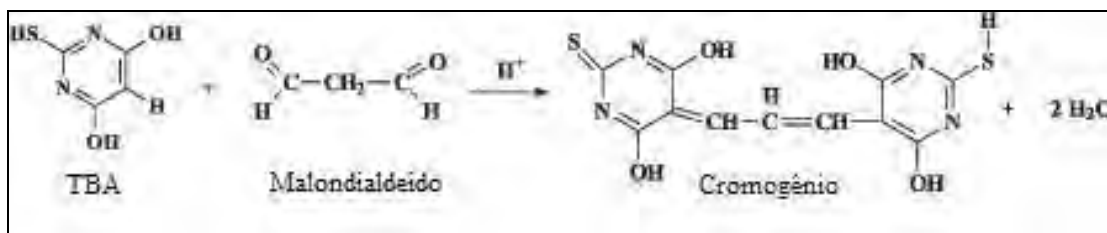


Figura 15. Esquema mostrando a reação utilizada para a análise da peroxidação lipídica.

3.11. Teste do micronúcleo e teste de anormalidades nucleares

Após 72 horas de exposição controlada aos herbicidas, foi realizada uma punção cardíaca, com seringa heparinizada, para a retirada de cerca de 3 cc de sangue de cada espécime. Para o preparo das lâminas, a primeira gota de sangue da seringa foi descartada, com o intuito de evitar a contaminação do sangue com o líquido corporal e muco. Três lâminas foram confeccionadas, pela técnica de esfregaço (extensões sanguíneas), para cada indivíduo. O material foi fixado, por 10 minutos, em metanol absoluto e, após 24 horas, submetido à reação de Feulgen, que compreende duas etapas: uma hidrólise ácida, em que o material é imerso em HCL 1 M, durante 11 minutos a 60 ° C, e a etapa de submissão ao reativo de Schiff, por 2 horas, em local escuro. Um total de 1000 eritrócitos foram analisados em cada lâmina, totalizando 3000 eritrócitos por peixe. Essa análise foi realizada em microscópio óptico, sob objetiva de imersão (100x). A frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares foi então calculada. Devido à contagem de todas as células do campo de visão do microscópio, é comum que a contagem passe de 3000 células, sendo o número variável para cada peixe. Assim, o número total de células contadas foi passado para porcentagem, da mesma forma que os números de micronúcleos e anormalidades. A frequência então está mensurada em porcentagem.

3.12. Ensaio cometa

O mesmo sangue coletado para o teste de micronúcleo foi utilizado para o ensaio do cometa, seguindo a seguinte metodologia: Uma amostra de 10 µl de sangue foi diluída em 1000 µl de solução fisiológica. As lâminas foram montadas com 10 µl da suspensão celular + 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5 %) a 37 °C. As lâminas permaneceram em uma solução de lise (1 mL de triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, para 1 L) em geladeira por uma hora. O papel da lise no ensaio cometa é o de remover os conteúdos

celulares, com exceção do material nuclear. O DNA permanece bem condensado devido à presença de proteínas não histônicas (YENDLE et al., 1997).

Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese, por 20 minutos à 25 V, 300 mA. Na solução de eletroforese, com pH maior que 13, a espiralização do DNA começa a relaxar a partir dos pontos de quebra da fita, permitindo, dessa maneira, que os mesmos sejam revelados pela eletroforese na sequência do teste (YENDLE et al., 1997). As lâminas foram, a seguir, neutralizadas com Tris 0,4 M (pH7,5), por 15 minutos e fixadas em etanol por 10 minutos.

O princípio desta técnica baseia-se no fato de que o DNA da célula que não apresentar dano migrará de forma homogênea formando um círculo. Caso o DNA pesquisado apresente dano, serão formados fragmentos de diversos tamanhos, de modo que, na eletroforese, os fragmentos menores migrem mais rapidamente em relação aos fragmentos maiores. Ocorrendo um dano intenso no material celular, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, originando a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990).

Para cada amostra de sangue foram analisados 100 nucleóides, utilizando a classificação visual baseada na migração dos fragmentos de DNA nuclear, segundo Kobayashi et al., (1995). As lâminas foram coradas com brometo de etídio (0,002 mg/mL). A análise foi feita ao microscópio de fluorescência, filtro B – 34 (excitação: $\lambda = 420 - 490$ nM, barreira $\lambda = 520$ nM), em objetiva de 40x. Os nucleóides foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos em: classe 0 (sem dano); classe 1 (pouco dano); classe 2 (dano médio); classe 3 (grande dano). Foi calculado então o escore de dano como a soma do número de células em cada classe e o total de cada classe multiplicado pelo valor da mesma (0-3); portanto, os escores podem variar de 0 (todas as células sem dano – 0×100) a 300 (todas as células com dano máximo – 3×100).

3.13. Análise histológica

A análise histológica foi realizada com fígado de peixes em torno de 20 cm de comprimento. Tal análise não foi feita com os peixes em torno de 10 cm devido ao pequeno tamanho do órgão, que foi suficiente apenas para a realização das análises bioquímicas.

O órgão foi fixado com Karnovsky com o objetivo de se preservar as estruturas, e posteriormente submetido a tratamento para inclusão em parafina. Lâminas foram confeccionadas a partir de corte em micrótomos (4 μ m) do material já incluso. Em seguida,

realizou-se a desparafinização das lâminas e a coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). O tecido foi observado em microscópio de luz sob objetiva de 12,5; 40 e 100X.

3.14. Tratamento estatístico dos dados

Para todos os testes, utilizou-se o software Statística 7, e as estatísticas de cada experimento foram analisadas separadamente. Em todos os casos normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo Levene. Foram considerados dados normais e homogêneos aqueles com $p > 0,05$.

Primeiramente, com o intuito de verificar os efeitos de cada contaminante nos organismos-teste, foi feita a comparação do controle com os tratamentos em cada experimento. Na exposição ao herbicida, analisou-se os grupos de peixes de 10cm e de 20cm separadamente, cada grupo tendo as diferentes concentrações do contaminante comparadas com o controle do tamanho correspondente.

Nesse caso, para os dados paramétricos, utilizou-se o teste ANOVA, e para os não paramétricos, o KRUSKAL-WALLIS. O teste *a posteriori* aplicado, no caso de dados paramétricos, foi o Tukey, e no caso de dados não paramétricos, o teste de Comparações múltiplas dos ranks médios. Para todas essas análises, considerou-se que houve diferença entre as comparações para um $p < 0,05$.

Além da comparação entre o controle e os tratamentos, para a verificação da variável “tamanho”, foi analisada a diferença entre os peixes de 10cm e de 20cm destinados ao controle. Para esse tipo de comparação, utilizou-se o teste T-Student para dados paramétricos e o Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para essas análises, considerou-se que houve diferença entre as comparações para um $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Herbicida Combibe *500 SC

4.1.1 Avaliação de mortalidade

No período de exposição ao herbicida Combibe *500SC, de um total de 48 espécimes, houve mortalidade de sete indivíduos, sendo um controle de 20cm, e seis de 10cm expostos à maior concentração do herbicida. Durante as primeiras 24 horas, um peixe de 10cm, e um de 20cm, ambos expostos à maior concentração testada (0,5 ml/L), morreram. Com 48 horas de

exposição, dois peixes de 10cm expostos à 0,5 ml/L, e um peixe de 20cm referente ao controle negativo (exposto apenas à água de poço artesiano) morreram. Após as 72 horas, morreram um peixe de 10cm, e um de 20cm, ambos expostos à maior concentração (Tabela 01).

Tabela 01. Número de indivíduos de 10 e 20cm expostos a cada concentração de Combine nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h.

	Peixes pequenos (10cm)				Peixes grandes (20cm)			
	C	0,125	0,25	0,5	C	0,125	0,25	0,5
0h	6	6	6	6	6	6	6	6
24h	6	6	6	5	6	6	6	5
48h	6	6	6	3	5	6	6	5
72h	6	6	6	2	5	6	6	4

4.1.2. EROD

A atividade EROD, mensurada no fígado, apresentou diferença significativa tanto entre o grupo de peixes de 10cm ($p = 0,016$, ANOVA) quanto entre o grupo de peixes de 20cm ($p = 0,00009$, ANOVA). Nos peixes menores, o grupo exposto à concentração de 0,25 ml/L diferiu em relação ao grupo controle (0,016, Tukey), mostrando maior atividade da EROD nos indivíduos expostos. Nos peixes grandes, o grupo exposto à concentração de 0,25 ml/L também apresentou maior atividade da enzima em relação ao controle ($p = 0,000192$, Tukey) (Figura 16).

Nesse caso, os dados do grupo de peixes pequenos expostos à 0,5 ml/L foram excluídos da análise estatística, uma vez que o n obtido foi de 1, tornando tal análise inviável.

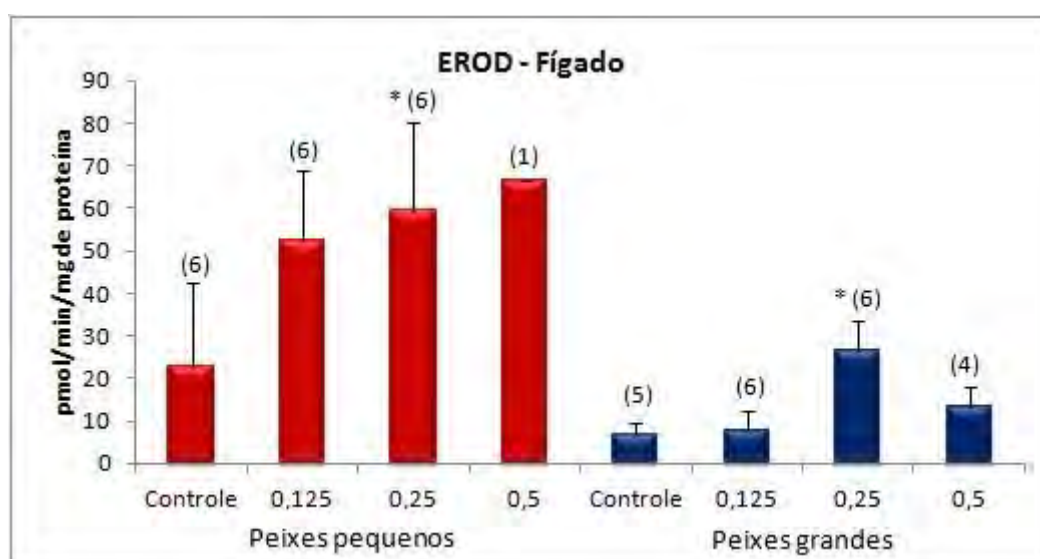


Figura 16. Atividade da EROD em fígado de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L.

*: Diferença em relação ao respectivo controle.

4.1.3. GST

A GST, no fígado, não apresentou diferença na sua atividade em peixes de 10cm nem em peixes de 20cm expostos ao Combine *500SC. Uma comparação entre diferentes tamanhos apontou que a atividade da enzima foi maior nos peixes de 20cm em relação aos de 10cm ($p = 0,0029$, teste T-Student) (Fig. 17).

Nas brânquias, não houve diferença na atividade da GST entre as concentrações de Combine *500SC e o controle em nenhum dos tamanhos analisados. A análise também não evidenciou diferença significativa entre peixes de diferentes tamanhos.

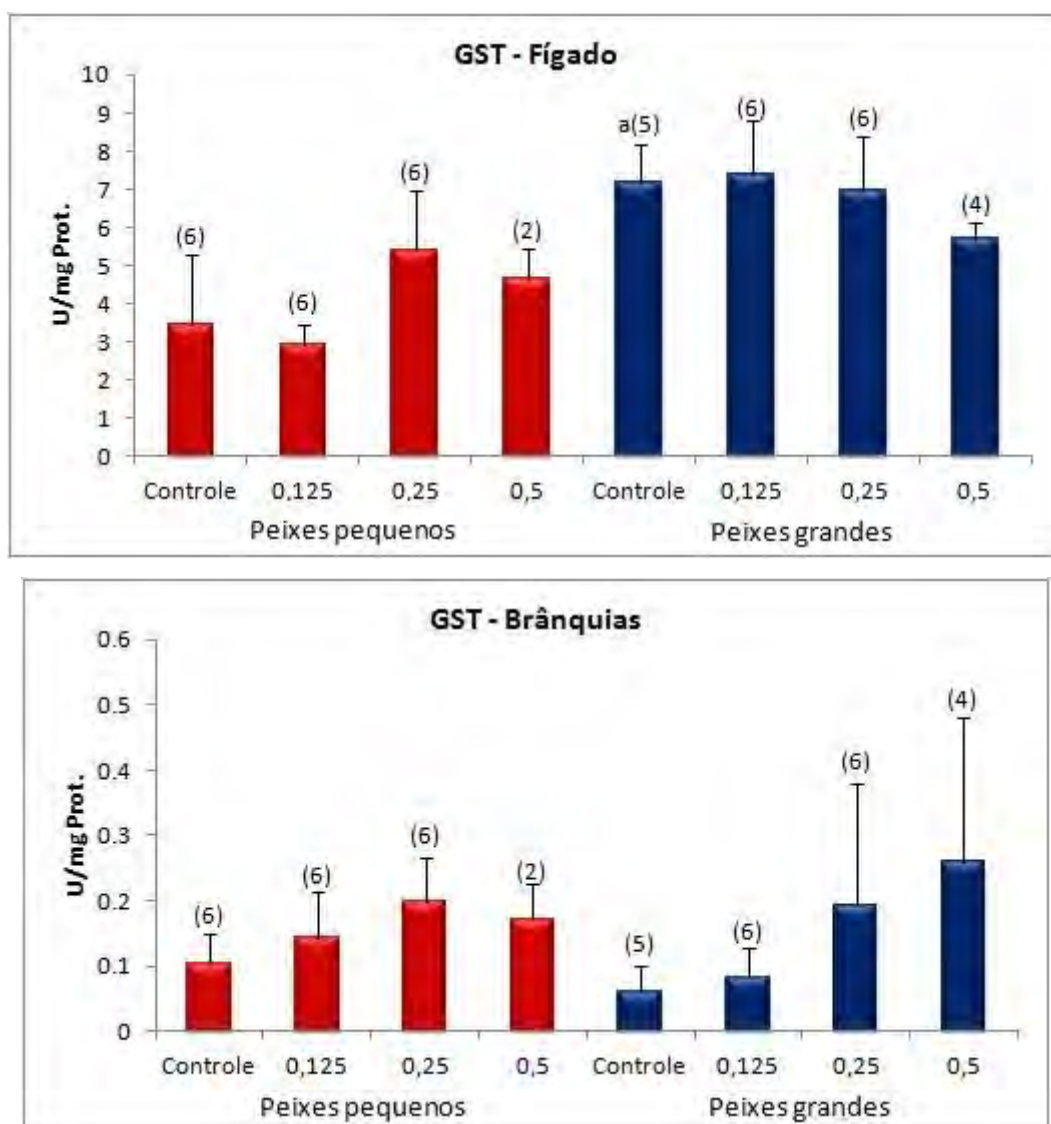


Figura 17. Atividade da GST em fígado e brânquias de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L. a: Diferença em relação ao grupo controle de menor porte.

4.1.4. Superóxido dismutase (SOD)

A análise estatística não apontou diferença na atividade da SOD entre o controle e os peixes expostos ao herbicida no fígado de peixes de ambos os tamanhos. A atividade da enzima também não diferiu significativamente entre as tilápias de 10cm e de 20cm (Fig. 18).

A atividade da SOD nas brânquias não diferiu entre o controle e os tratados, nem nos peixes de 10cm nem nos peixes de 20cm. Em relação ao tamanho, o test T-Student ($p = 0,004$) evidenciou que a enzima teve maior atividade no grupo controle de 20cm em comparação ao grupo controle de 10cm (Fig. 18).

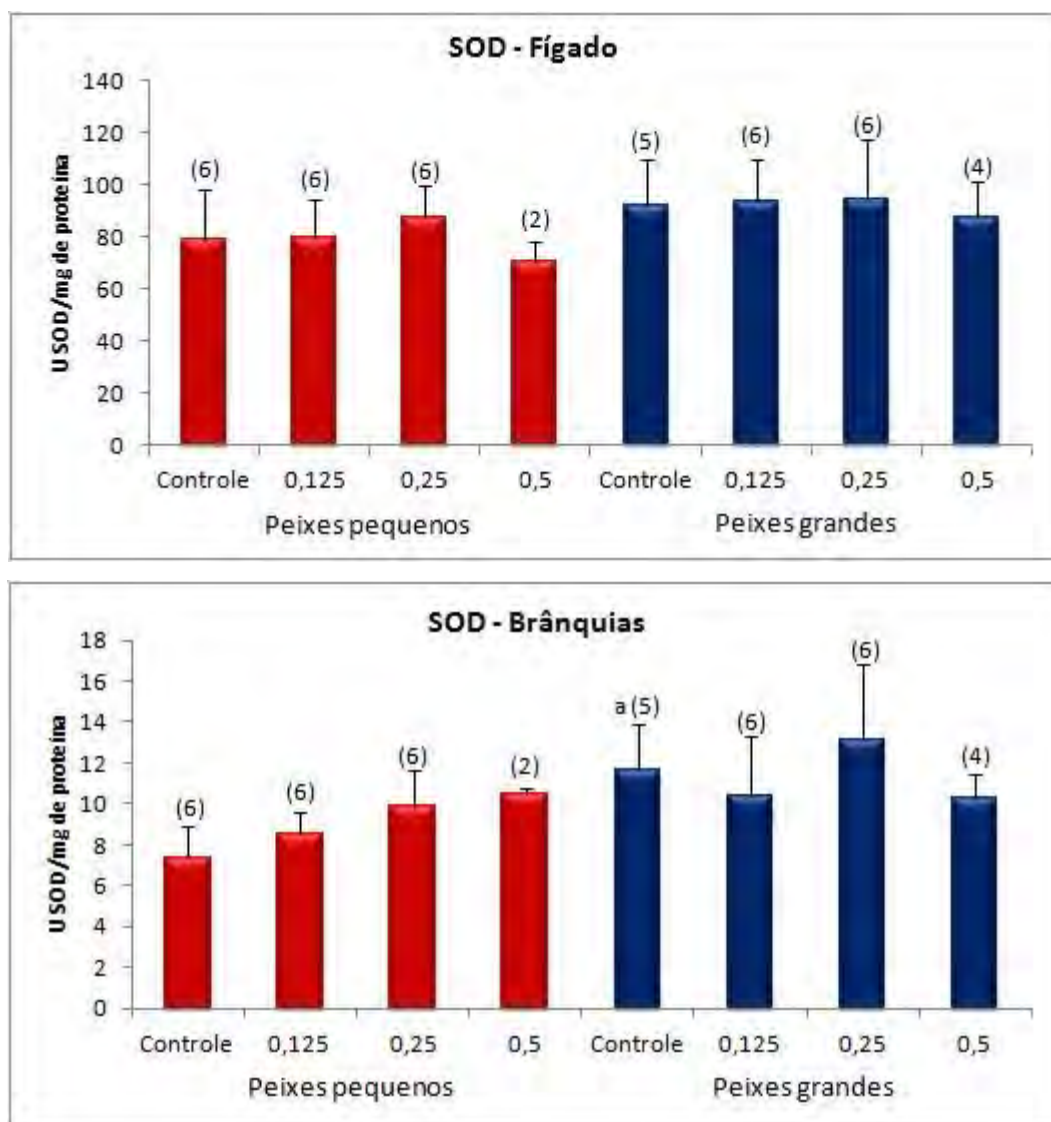


Figura 18. Atividade da SOD em fígado e brânquias de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L. a: : Diferença em relação ao grupo controle de menor porte.

4.1.5. Glutationa Peroxidase (GPx)

A análise da GPx, tanto no fígado quanto nas brânquias de peixes de ambos os tamanhos não mostrou diferença significativa entre o controle e as concentrações testadas. A atividade da enzima também não diferiu significativamente entre as tilápias de 10cm e 20cm, nem no fígado nem nas brânquias (Fig. 19).

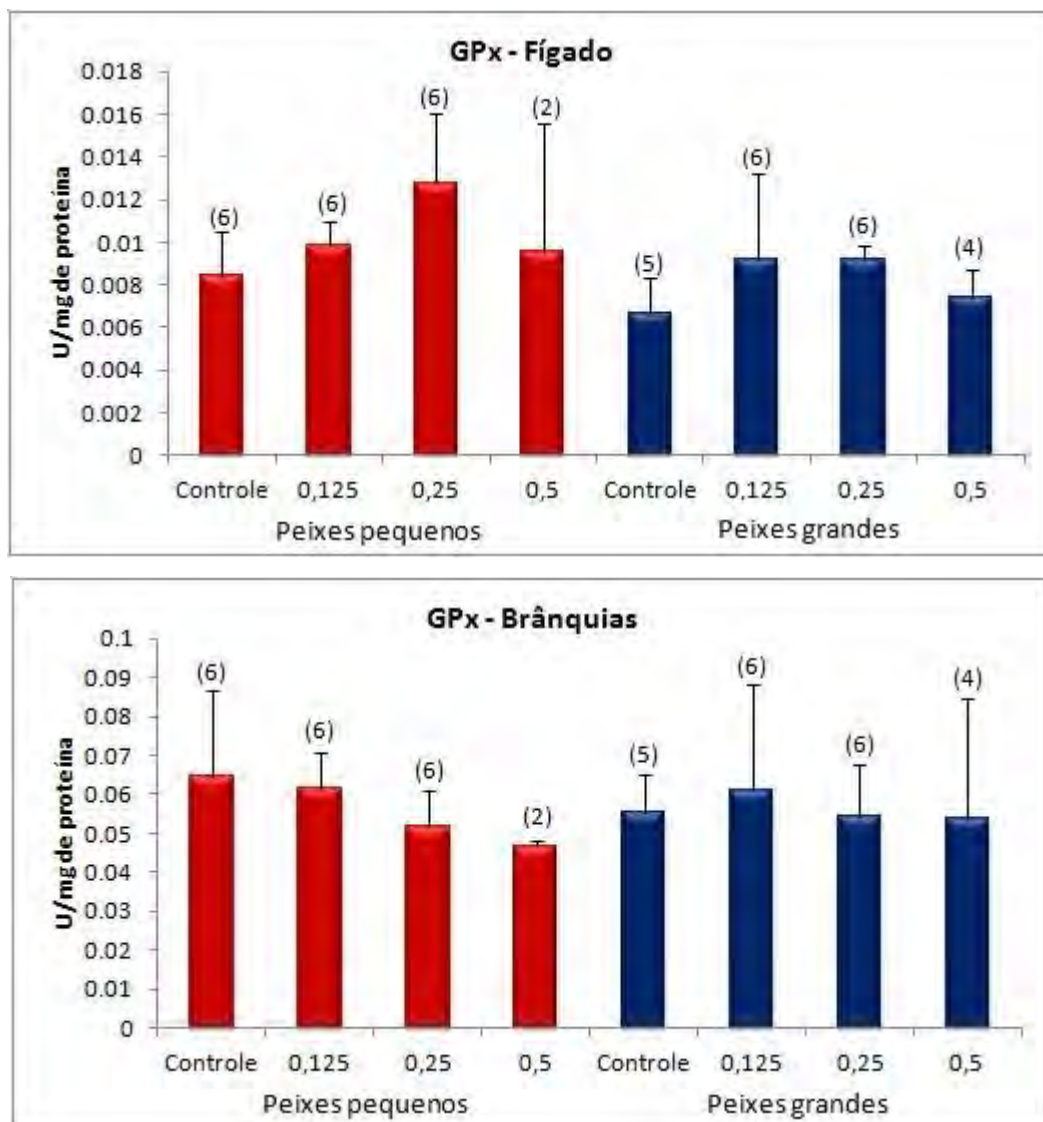


Figura 19. Atividade da GPx em fígado e brânquias de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L.

4.1.6. Catalase (CAT)

No fígado de peixes de 10cm, a CAT não apontou diferença entre o controle e os tratamentos. Em peixes de 20cm, no entanto, houve diferença significativa ($p = 0,045$, Kruskal-Wallis). O teste de Comparações múltiplas mostrou que os indivíduos expostos à

concentração de 0,125 ml/L apresentaram menor atividade do que o controle ($p = 0,039$). A atividade da CAT no fígado não foi diferente entre os tamanhos.

Nas brânquias das tilápias de ambos os tamanhos, não houve diferença na atividade da CAT entre o controle e as concentrações do herbicida. A atividade da enzima também não diferiu significativamente entre os peixes de 10cm e 20cm (Figura 20).

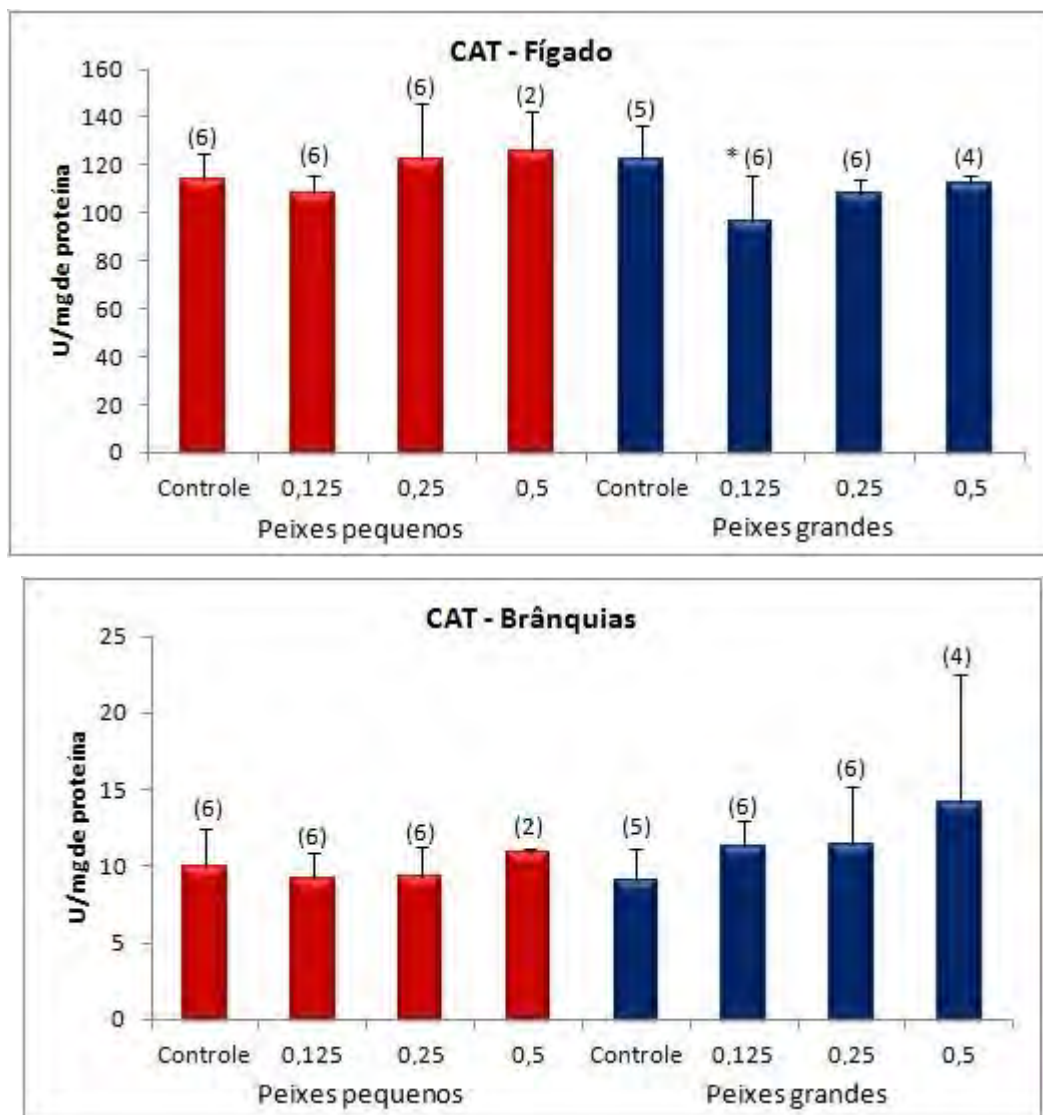


Figura 20. Atividade da CAT em fígado e brânquias de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L. *: Diferença em relação ao respectivo controle.

4.1.7. Peroxidação lipídica

Nesta análise, verificou-se a quantidade de MDA (produto da peroxidação lipídica) em cada grupo. No fígado de peixes de ambos os tamanhos, não houve diferença estatisticamente significativa. Em relação aos peixes de diferentes portes, a análise evidenciou maior

quantidade de MDA nos peixes de 20cm em comparação aos de 10cm ($p = 0,000004$, teste T-Student).

A análise de MDA nas brânquias não apontou diferença estatística significativa, nem comparando-se grupos de mesmo porte expostos à diferentes concentrações, nem comparando-se grupos de diferentes tamanhos (Figura 21).

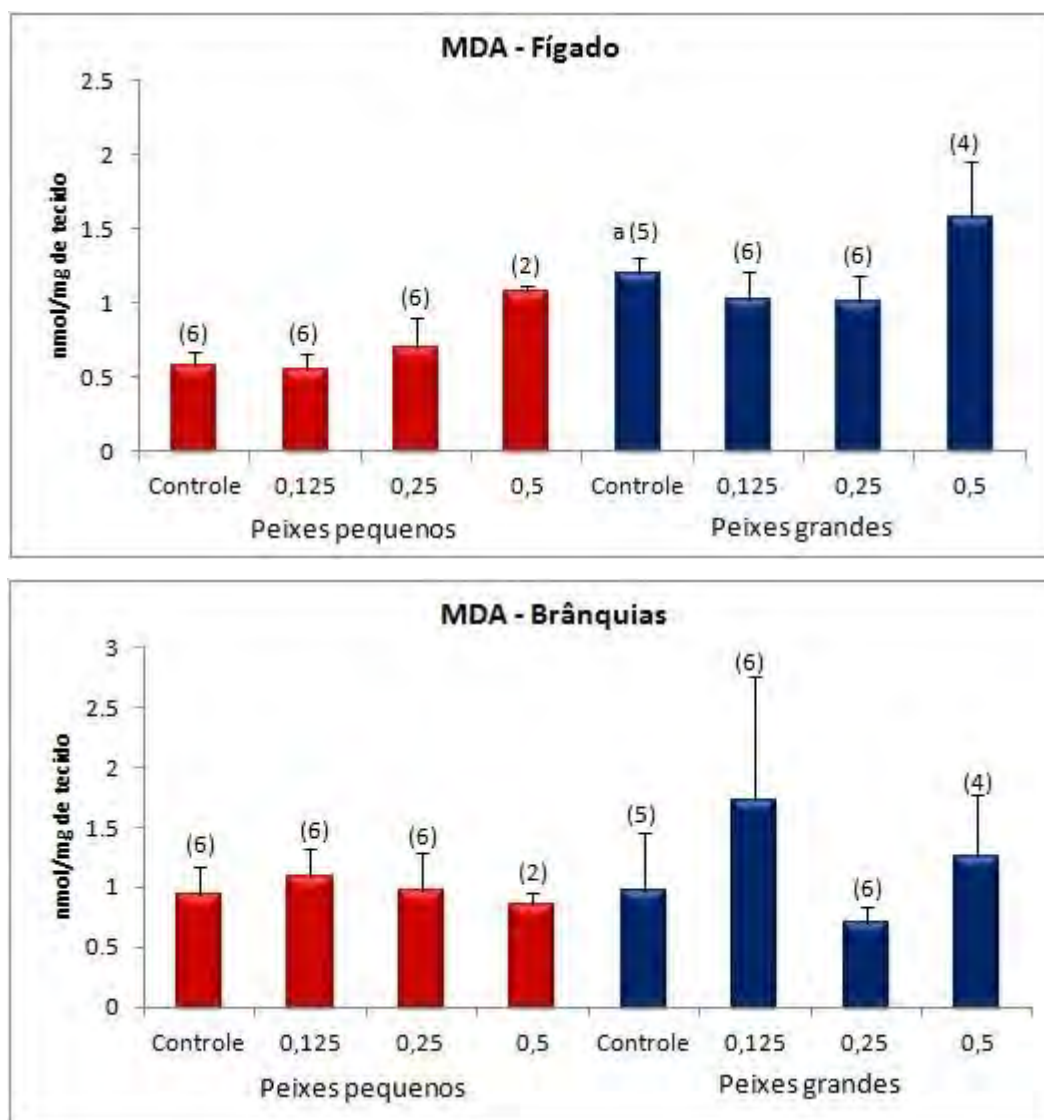


Figura 21. Peroxidação lipídica em fígado e brânquias de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L. a : Diferença em relação ao grupo controle de menor porte.

4.1.8. Micronúcleos e anormalidades nucleares

A frequência de micronúcleos, tanto nos peixes de 10 cm quanto nos de 20 cm, não mostrou diferença significativa entre os grupos expostos a diferentes concentrações de Combine *500SC em relação ao controle.

Por outro lado, quando essa porcentagem foi comparada entre peixes de diferentes tamanhos, uma diferença estatisticamente significativa foi observada. Observando-se a figura 22, é possível perceber que a frequência de micronúcleos é maior nos indivíduos de 10cm do que nos indivíduos de 20cm ($p = 0,028$, Mann-Whitney).

Na análise das anormalidades nucleares, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados nem entre os tamanhos (Figura 22).

A figura 23 mostra micronúcleos e anormalidades nucleares encontrados.

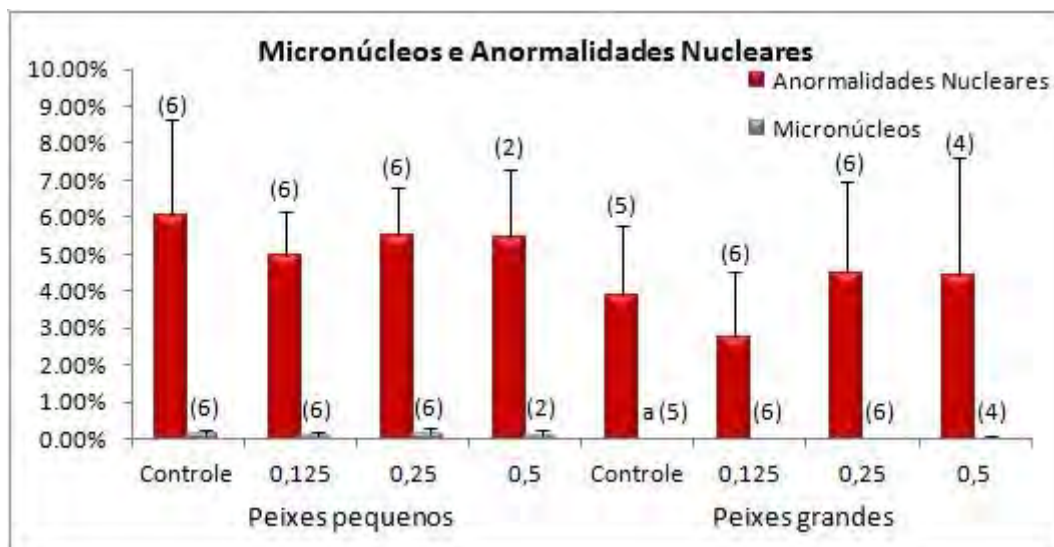


Figura 22. Micronúcleos e anormalidade nucleares em sangue de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L. a: Diferença em relação ao grupo controle de menor porte.

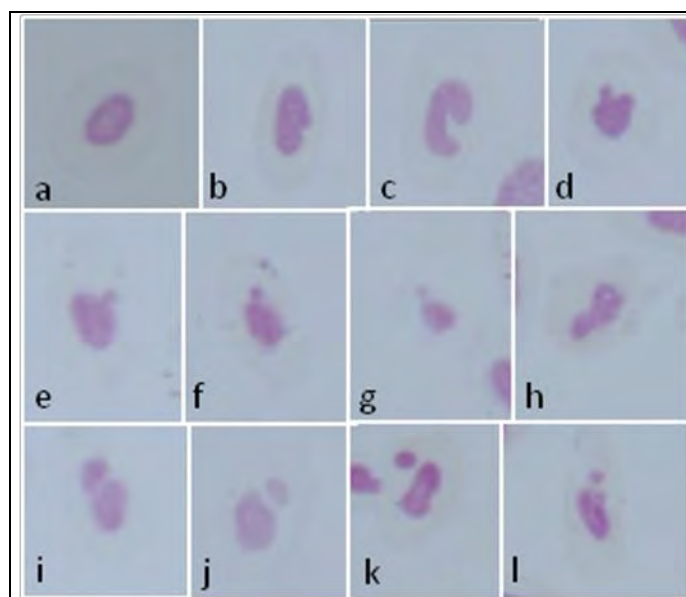


Figura 23. Micronúcleos e anormalidade nucleares em eritrócitos de *O. niloticus*. a: célula normal; b - d: Núcleo *notched*; e - f: Núcleo *lobed*; g: *Brokeneggs*; h: Núcleo *blebbed*; i: célula binucleada; j - l: micronúcleos

4.1.9. Ensaio Cometa

O ensaio cometa, realizado com o sangue dos indivíduos, evidenciou diferença nos escores de cometa entre os peixes pequenos ($p = 0,0362$, Kruskal-Wallis). O teste de comparações múltiplas do Kruskal-Wallis apontou essa diferença entre o grupo exposto à concentração de 0,25 ml/L e o controle ($p = 0,0324$). Não houve diferença estatística significativa entre os peixes de 20 cm.

Em relação aos peixes de diferentes portes, os peixes de 20cm apresentaram maior número de danos do que os peixes de 10cm ($p = 0,0142$, teste T-Student) (Figura 24).

A figura 25 mostra as diferentes classes do cometa.

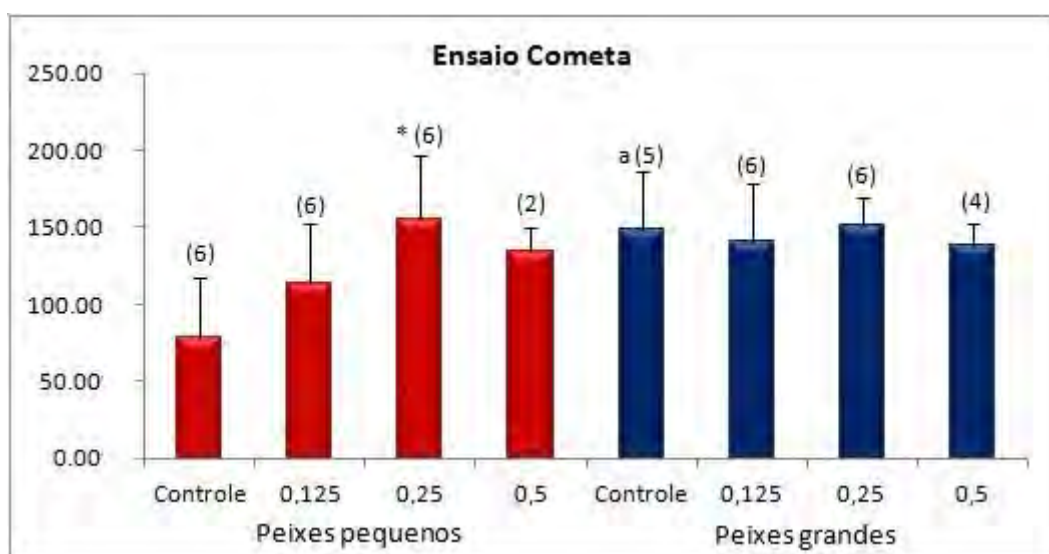


Figura 24. Ensaio cometa em sangue de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Combine, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 ml/L.

*: Diferença em relação ao respectivo controle; a: Diferença em relação ao grupo controle de menor porte.

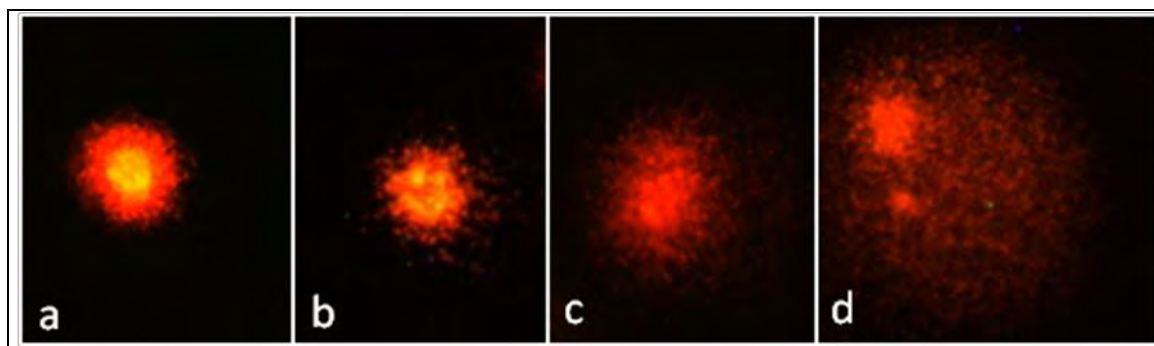


Figura 25: Imagem dos nucleóides formando cometas. a: classe 0; b: classe 1; c: classe 2; d: classe 3

4.1.10. Histologia

Na análise histológica, foi observada, tanto no fígado de peixes controle como no fígado de peixes expostos, uma vacuolização das células, ficando o citoplasma reduzido e o núcleo comprimido, característica de degeneração hidrópica.

Além disso, foi observado em um indivíduo do grupo de peixes expostos (0,125 ml/L), a presença de vacúolos de gordura, característica de esteatose ou degeneração gordurosa (Figura 26).

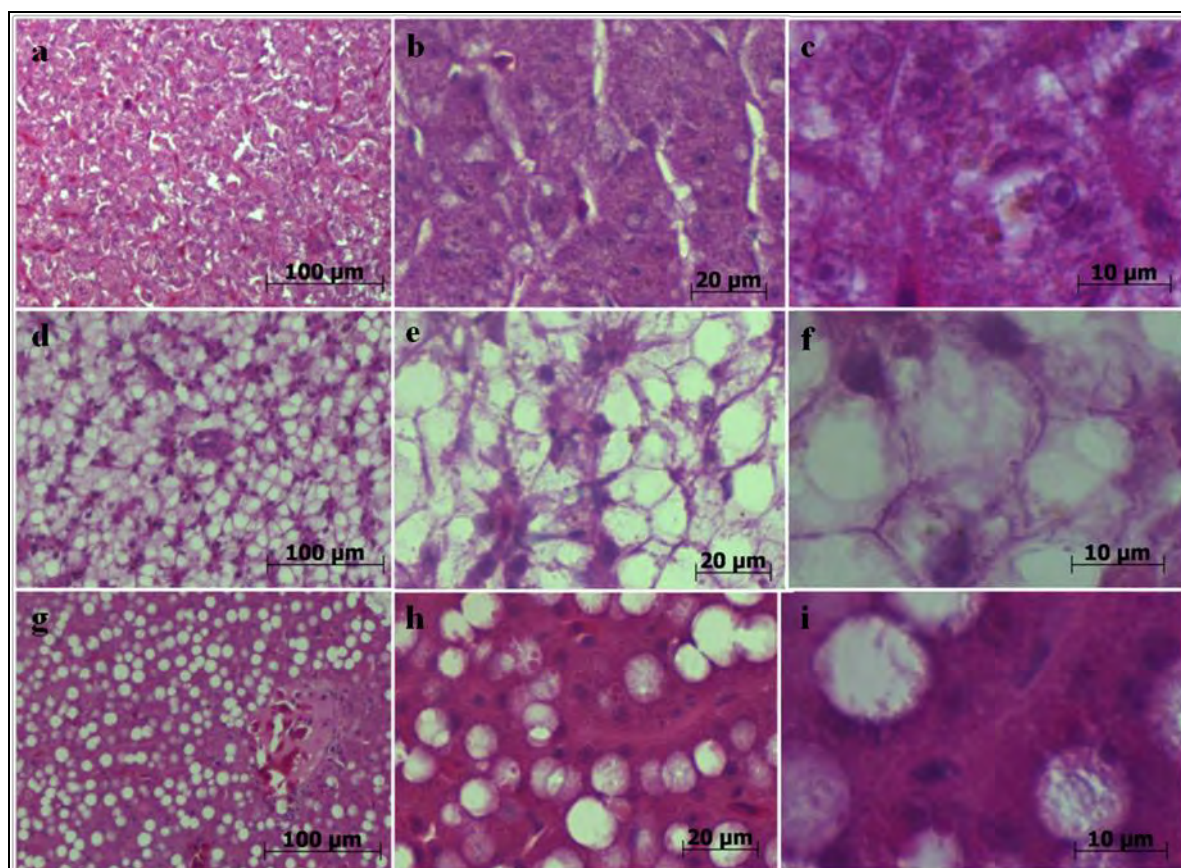


Figura 26. Histologia de fígado de *O. niloticus* corado com Hematoxilina-eosina. **a)** Tecido normal. Aumento: 125X. **b)** Tecido normal. Aumento: 400X. **c)** Tecido normal. Aumento: 1000X. **d)** Degeneração hidrópica. Aumento: 125X. **e)** Degeneração hidrópica. Aumento: 400X. **f)** Degeneração hidrópica. Aumento: 1000X. **g)** Esteatose. Aumento: 125X. **h)** Esteatose. Aumento: 400X. **i)** Esteatose. Aumento: 1000X.

4.1.11. Médias e Desvios-padrão

Os valores das médias e dos desvios-padrão dos biomarcadores analisados estão listados na tabela 02.

Tabela 02. Valores de médias e desvios-padrão dos biomarcadores EROD, GST, SOD, GPx, CAT, MDA, micronúcleo e anormalidades nucleares e cometa.

		Peixes pequenos (10cm)				Peixes grandes (20cm)			
		C	0,125	0,25	0,5	C	0,125	0,25	0,5
EROD	Média	22.76659	52.26508	59.59884	66.43653	6.654211	7.860699	26.70837	13.34705
	Desvio	19.73245	16.52973	20.58574	não tem	2.875349	4.350995	6.722253	4.751826
GST Fígado	Média	3.432218	2.931806	5.414489	4.635672	7.163265	7.366977	6.990705	5.718188
	Desvio	1.835353	0.533974	1.534443	0.790758	1.015444	1.435643	1.376794	0.406414
GST Brânquias	Média	0.10375	0.144199	0.19831	0.172041	0.059792	0.082899	0.191841	0.259119
	Desvio	0.046264	0.071041	0.067184	0.053666	0.040752	0.043981	0.18672	0.221601
SOD Fígado	Média	79.09544	79.55691	87.48438	70.56804	91.71143	93.25142	94.13206	87.1062
	Desvio	18.75311	14.66908	12.57521	7.473194	18.20486	16.63597	23.43395	14.355
SOD Brânquias	Média	7.36676	8.495587	9.883886	10.5218	11.67653	10.35688	13.11917	10.23504
	Desvio	1.515466	1.101521	1.789105	0.205919	2.25808	2.930747	3.707571	1.236275
GPx Fígado	Média	0.008443	0.009857	0.012794	0.009537	0.00663	0.009217	0.009176	0.007395
	Desvio	0.002028	0.001163	0.003289	0.006005	0.001681	0.004008	0.000682	0.001322
GPx Brânquias	Média	0.064477	0.061487	0.051934	0.046579	0.055338	0.060806	0.054159	0.054039
	Desvio	0.022453	0.009527	0.009076	0.001519	0.009693	0.027276	0.013504	0.030895
CAT Fígado	Média	113.8664	108.1656	122.1759	126	122.3643	96.69364	107.7812	112.0656
	Desvio	11.28114	7.697328	23.81519	16.0454	14.58609	19.14522	5.905648	3.243691
CAT Brânquias	Média	9.946236	9.205212	9.358385	10.86525	9.113665	11.27494	11.36805	14.1141
	Desvio	2.524481	1.676531	1.893434	0.326258	1.979908	1.698338	3.786099	8.461556
MDA Fígado	Média	0.581372	0.55717	0.699875	1.070904	1.1956	1.018273	1.01564	1.575388
	Desvio	0.096466	0.102223	0.205911	0.044458	0.107517	0.195987	0.168339	0.384657
MDA Brânquias	Média	0.931142	1.094433	0.965266	0.853556	0.966619	1.715774	0.709351	1.259293
	Desvio	0.237372	0.236384	0.319772	0.100098	0.483106	1.035355	0.126811	0.516413
Micronúcleo	Média	0.001514	0.000972	0.001549	0.001135	6.31E-05	0.000271	0	0.000404
	Desvio	0.001233	0.000783	0.001715	0.00115	0.000141	0.00032	0	0.00031
Anormalidades	Média	0.060211	0.049643	0.055262	0.054382	0.038938	0.027724	0.044545	0.044088
	Desvio	0.026098	0.011988	0.012979	0.018628	0.018828	0.017336	0.025183	0.032327
Cometa	Média	0.789247	1.138487	1.549368	1.346177	1.486007	1.405205	1.506205	1.379977
	Desvio	0.382717	0.384847	0.4166	0.149109	0.375525	0.385791	0.190336	0.148291

4.2. Herbicida Velpar K[®] WG

4.2.1. Avaliação de mortalidade

No período de exposição ao herbicida Velpar K[®] WG, não houve mortalidade. É importante ressaltar que a maior concentração utilizada nesse experimento foi de aproximadamente 1000x menor do que a recomendada na agricultura, diferentemente do experimento com o herbicida Combine *500SC, em que a maior concentração utilizada foi 10x menor do que a recomendada na agricultura. Essa concentração 1000x menor foi utilizada em decorrência da grande mortalidade que ocorreu no primeiro experimento, com o Combine *500SC (Tabela 03).

Tabela 03. Número de indivíduos de 10 e 20cm expostos a cada concentração de Combine nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h.

	Peixes pequenos (10cm)				Peixes grandes (20cm)			
	C	0,125	0,25	0,5	C	0,125	0,25	0,5
0h	6	6	6	6	6	6	6	6
24h	6	6	6	6	6	6	6	6
48h	6	6	6	6	6	6	6	6
72h	6	6	6	6	6	6	6	6

4.2.2. EROD

A EROD, no fígado de peixes de 10cm, apresentou diferença significativa entre os grupos expostos à diferentes concentrações do herbicida ($p = 0,010$, ANOVA). O teste de Tukey apontou que há diferença entre o grupo exposto à 0,25 mg/L e o controle ($p = 0,0137$) e entre o grupo exposto à 0,5 mg/L e o controle ($p = 0,0250$). No fígado de peixes de 20cm, não houve diferença significativa entre os grupos.

Comparando-se entre diferentes tamanhos, pôde-se observar que o grupo controle dos peixes de 20cm apresentou maior atividade da EROD do que o grupo controle dos peixes de 10cm ($p = 0,0373$, Mann-Whitney) (Figura 27).

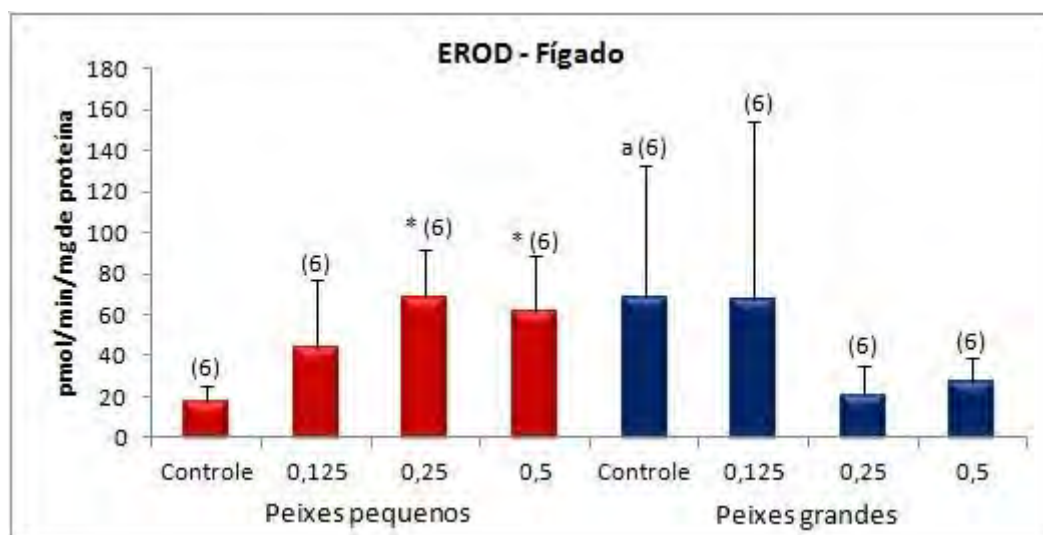


Figura 27. Atividade da EROD em fígado de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L.

*: Diferença em relação ao respectivo controle; a: Diferença em relação ao grupo controle de menor porte.

4.2.3. GST

A enzima GST, tanto no fígado quanto em brânquias, não mostrou diferença entre os peixes em torno de 10 cm nem entre os peixes em torno de 20 cm. A atividade da enzima também não mostrou variação significativa entre os peixes de diferentes tamanhos (Figura 28).

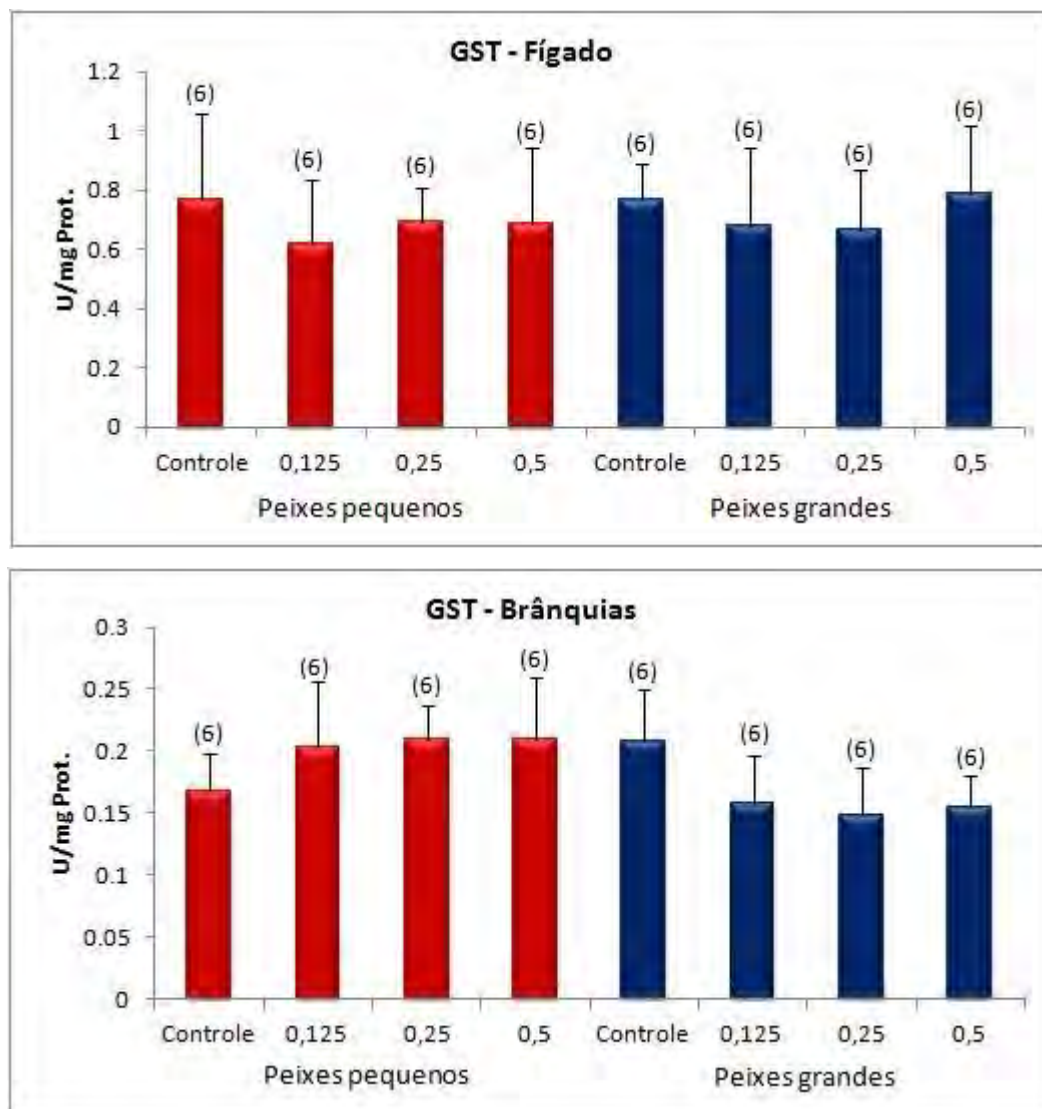


Figura 28. Atividade da GST em fígado e brânquias de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L.

4.2.4. SOD

Na análise da SOD no fígado, não houve diferença significativa estatisticamente na atividade da enzima em peixes de 10cm nem em peixes de 20cm. Entre os diferentes tamanhos, também não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 29).

Nas brânquias, a atividade SOD apontou diferença estatística entre os grupos de peixes de 10 cm ($p = 0,0063$, Kuskal-Wallis). Essa diferença foi evidenciada pelo teste de Comparações múltiplas do Kuskal-Wallis, que mostrou que os peixes expostos à 0,25 mg/L apresentaram menor atividade que seu respectivo controle ($p = 0,0056$).

Por meio da comparação entre peixes de diferentes portes, observou-se que os peixes de 20cm apresentaram menor atividade da SOD em relação aos peixes de 10 cm ($p = 0,0373$, Mann-Whitney) (Figura 29).

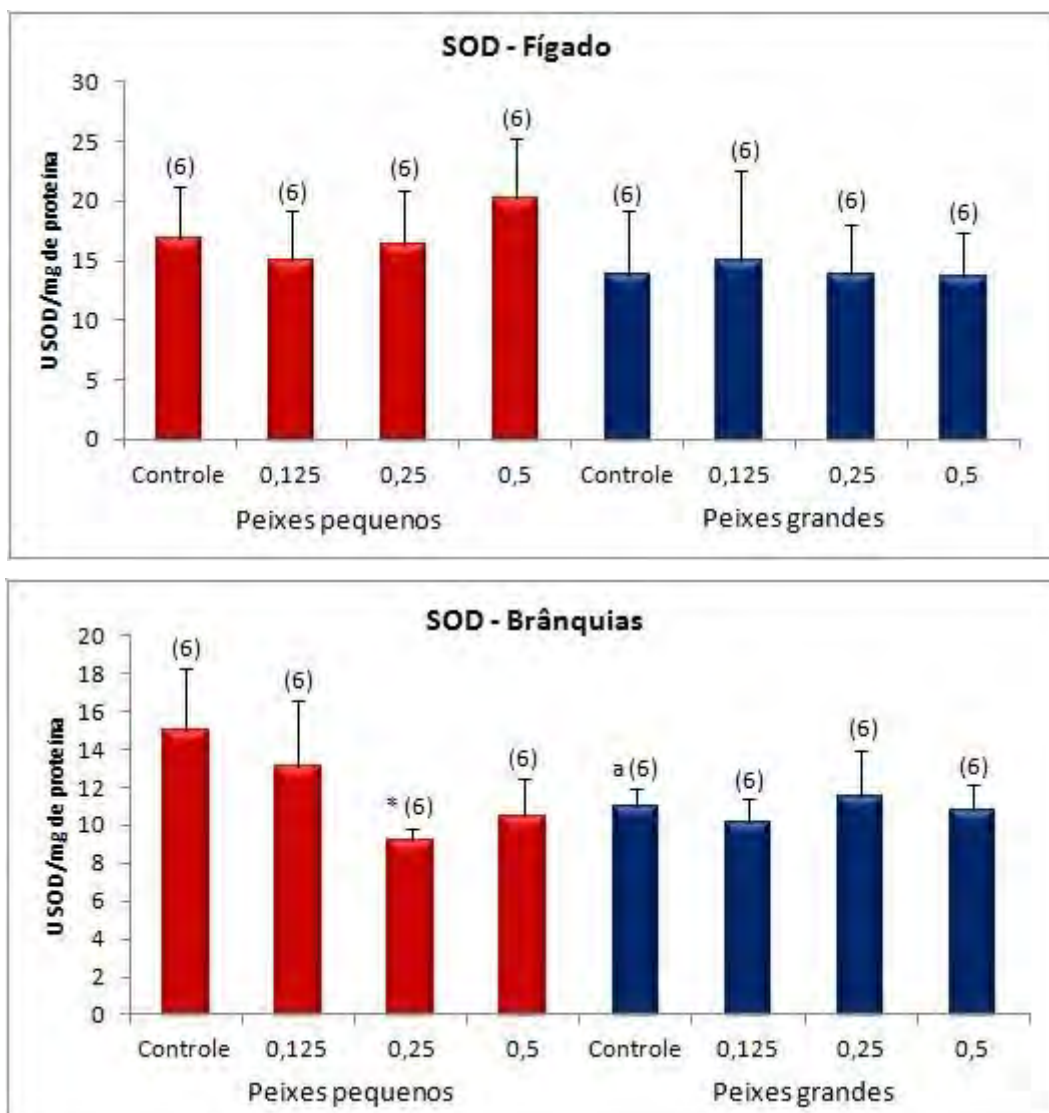


Figura 29. Atividade da SOD em fígado e brânquias de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L. *: Diferença em relação ao respectivo controle; a: Diferença em relação ao grupo controle de menor porte.

4.2.5. GPx

A GPx, no fígado, não mostrou diferença na sua atividade entre os grupos de peixes de 10cm nem entre os grupos de peixes de 20cm, como mostra a figura 30. Comparando-se grupos de diferentes tamanhos, os peixes maiores apresentaram maior atividade da GPx que os menores ($p = 0,0368$, teste T-Student).

Já nas brânquias, a GPx não apresentou diferença estatística entre os grupos expostos em relação aos respectivos controles, nem entre os grupos de diferentes tamanhos destinados ao controle(Figura 30).

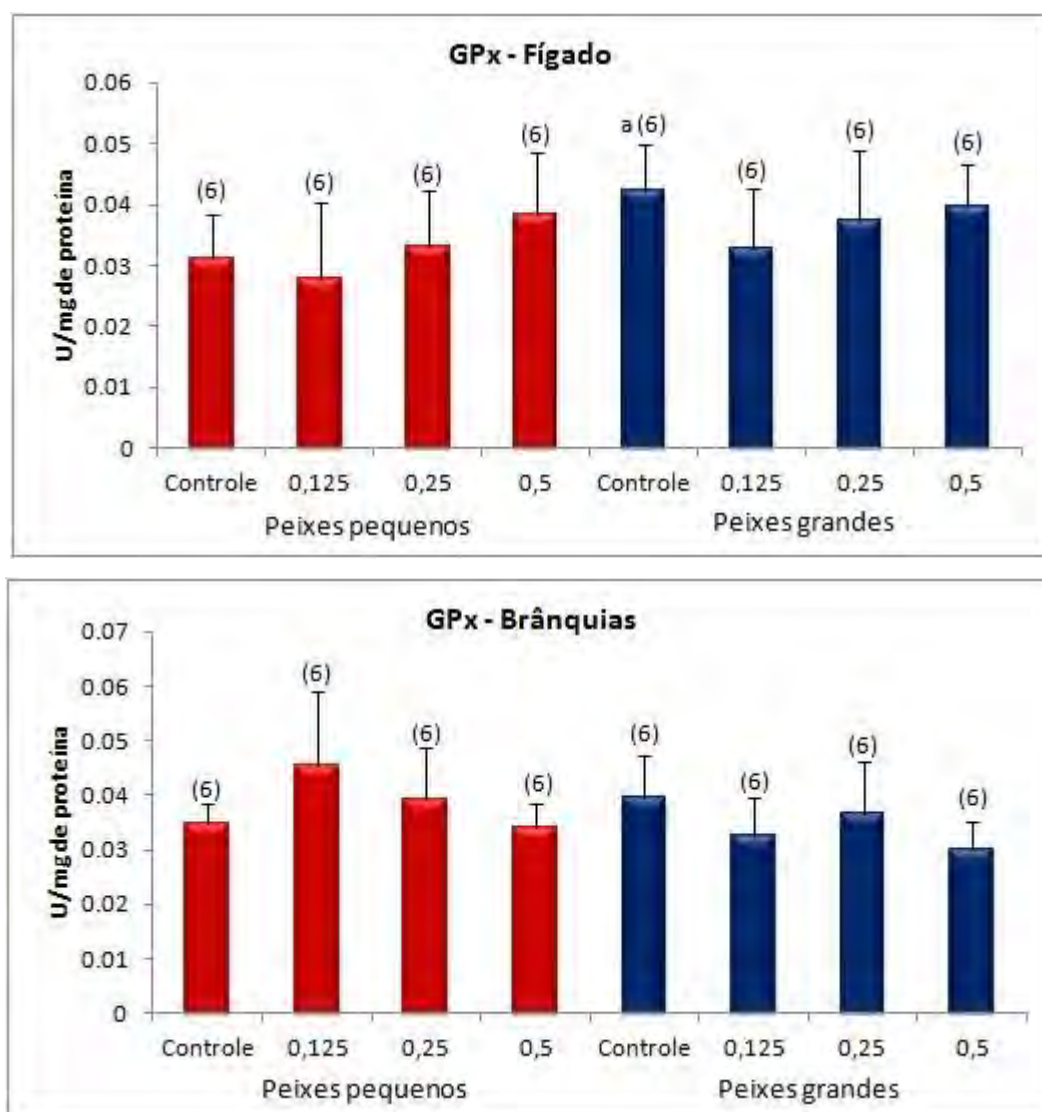


Figura 30. Atividade da GPx em fígado e brânquias de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L. a: Diferença em relação ao grupo controle de menor porte.

4.2.6. CAT

Tanto no fígado quanto nas brânquias, a CAT não diferiu significativamente nos peixes tratados em relação aos respectivos controle nem nos peixes de 20cm em comparação aos de 10cm (Figura 31).

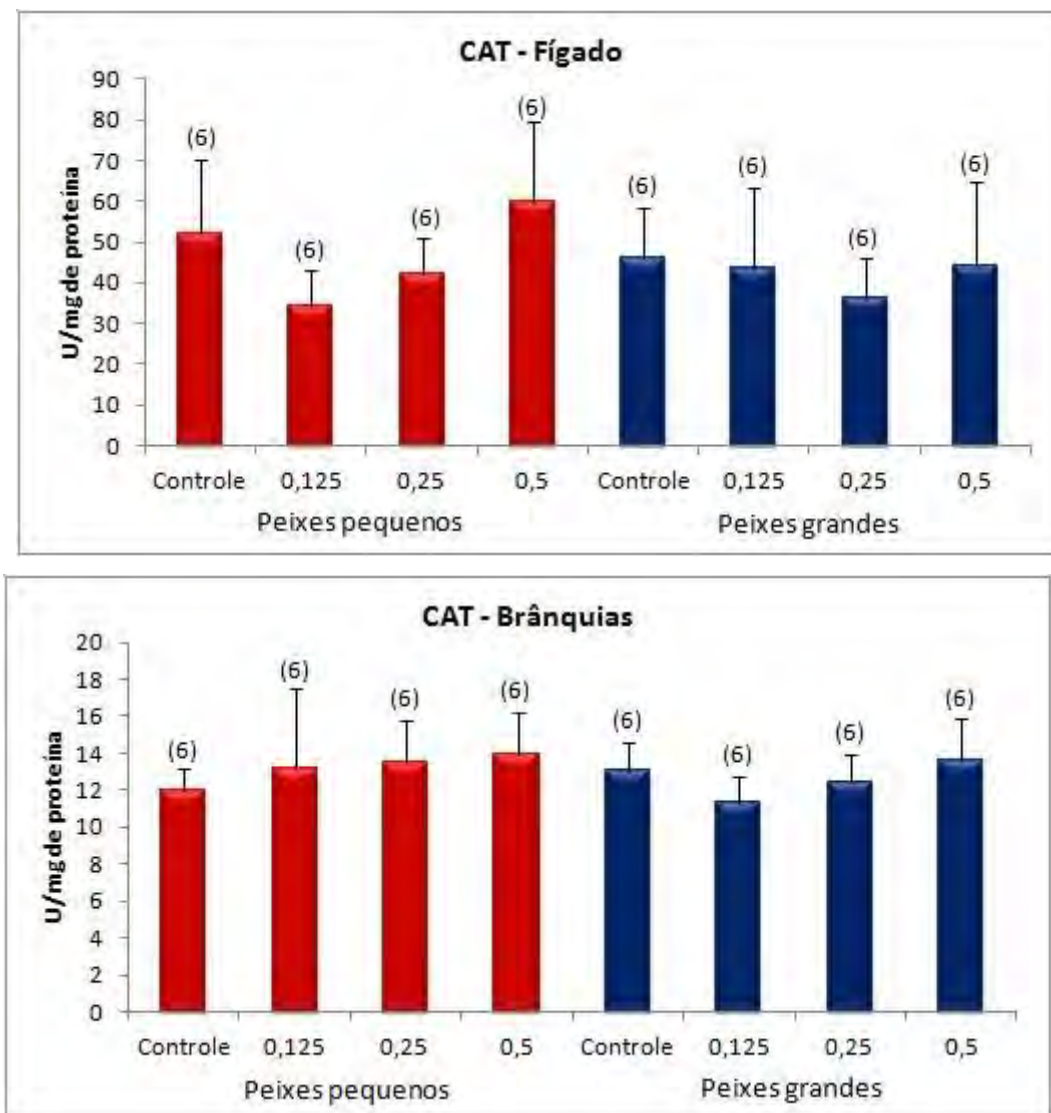


Figura 31. Atividade da CAT em fígado e brânquias de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L.

4.2.7. Peroxidação lipídica

O MDA, produto da peroxidação lipídica, tanto no fígado quanto nas brânquias, não apresentou diferença estatística nem entre peixes de 10cm nem entre peixes de 20cm. A análise também não diferença entre peixes de diferentes tamanhos (Figura 32).

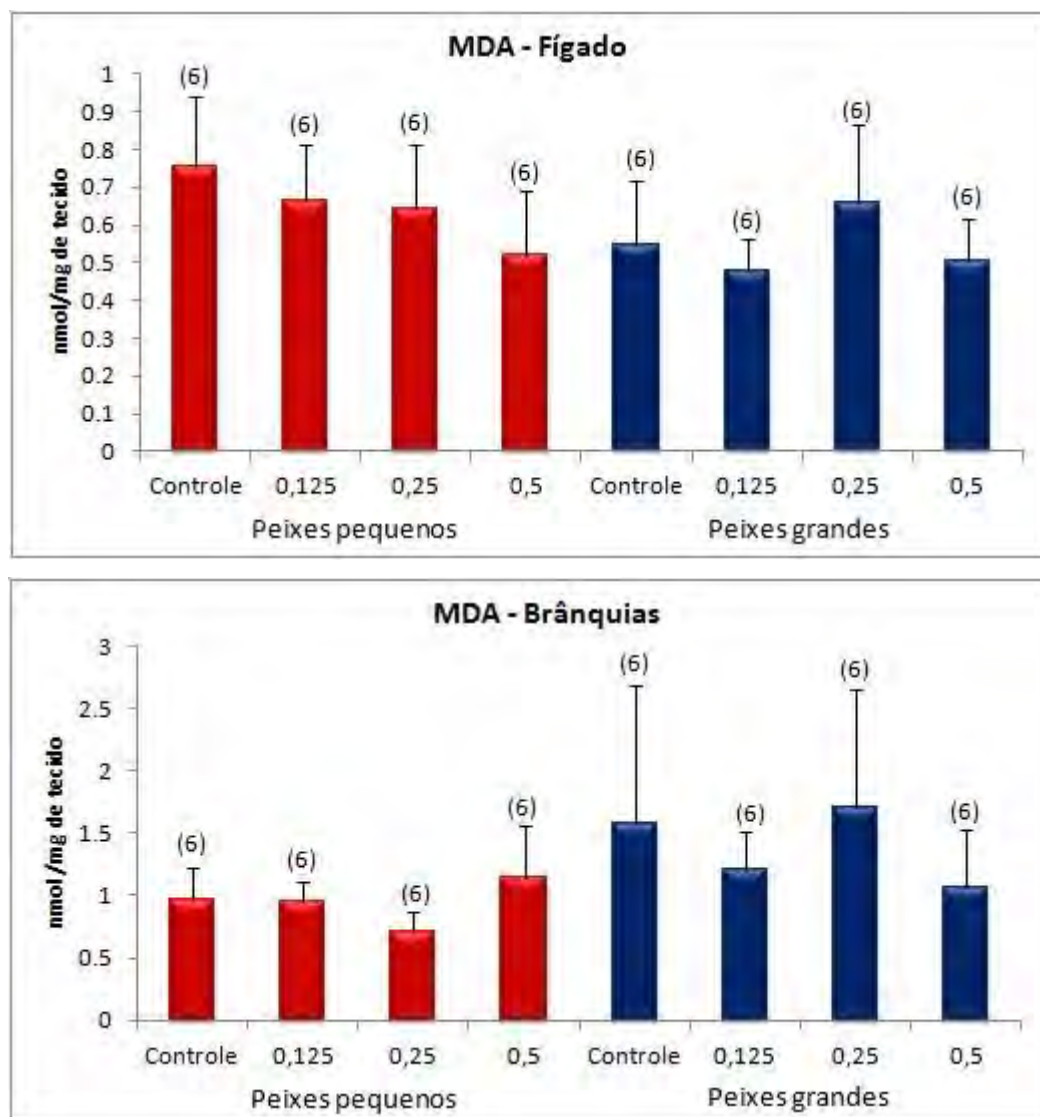


Figura 32. Peroxidação lipídica em fígado e brânquias de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L. d: Diferença em relação à respectiva concentração do menor porte.

4.2.8. Micronúcleos e anormalidades nucleares

No teste de micronúcleo e anormalidades nucleares, realizado com o sangue de *Oreochromis niloticus*, foi encontrada apenas uma célula micronucleada, no grupo controle de peixes de 20cm, por isso não foi realizado o teste estatístico com micronúcleos, que visualmente não diferiu entre os grupos de peixes pequenos, grandes, nem entre peixes de diferentes portes (Figura 33).

Anormalidades nucleares foram encontradas em todos os grupos analisados, porém, não houve diferença estatística significativa entre os peixes tratados em relação a seus respectivos controle nem entre os grupos de diferentes tamanhos.

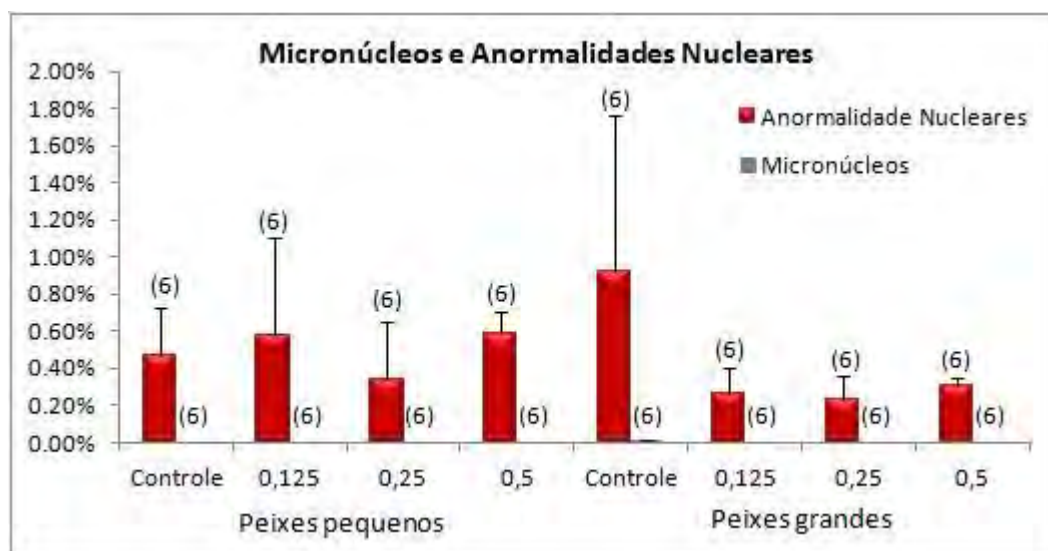


Figura 33. Micronúcleos e anormalidades nucleares em sangue de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L.

4.2.9. Ensaio cometa

A análise, no sangue de peixes de 10cm, não apresentou diferença nos escores de cometa entre os grupos expostos a diferentes concentrações. Em peixes de 20cm, no entanto, houve diferença significativa nos escores ($p = 0,0018$, Kruskal-Wallis). O teste de Comparações múltiplas do Kruskal-Wallis evidenciou que o grupo controle apresentou menor escore de cometa comparado tanto ao grupo exposto à 0,125 mg/L ($p = 0,0022$) quanto ao grupo exposto à 0,5 mg/L ($p = 0,0373$). Na comparação entre os peixes de diferentes tamanhos, não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 34).

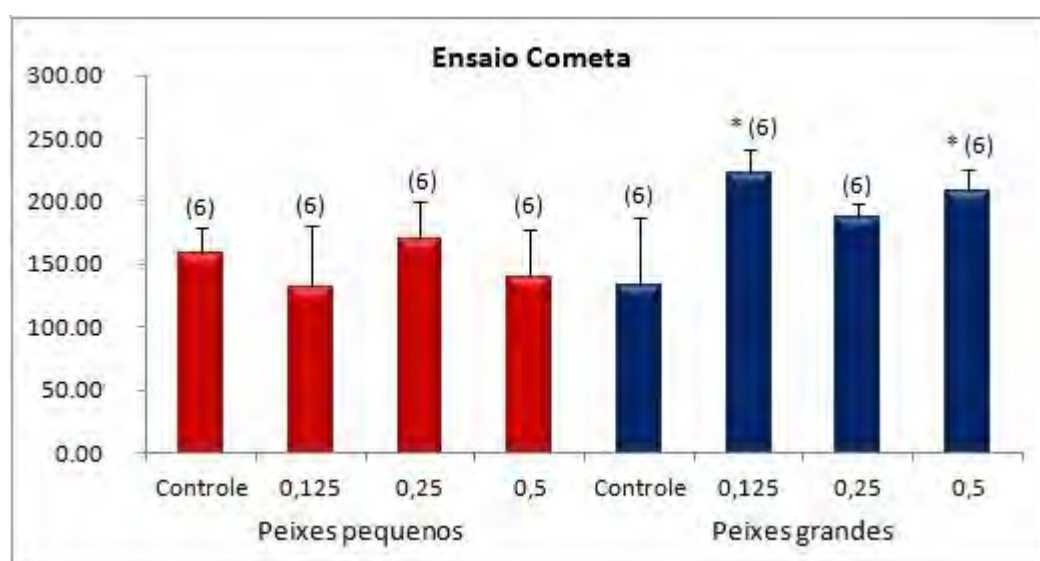


Figura 34. Ensaio cometa em sangue de *O. niloticus* pequenos e grandes expostos ao herbicida Velpar, nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mg/L.

*: Diferença em relação ao respectivo controle.

4.2.10. Histologia

A análise histológica apontou degeneração hidrópica em fígado de peixes de todos os grupos (controle e expostos) (Figura 26).

4.2.11. Médias e Desvios-padrão

Os valores das médias e dos desvios-padrão dos biomarcadores analisados estão listados na tabela 04.

Tabela 04. Valores de médias e desvios-padrão dos biomarcadores EROD, GST, SOD, GPx, CAT, MDA, micronúcleo e anormalidades nucleares e cometa.

		Peixes pequenos (10cm)				Peixes grandes (20cm)			
		C	0,125	0,25	0,5	C	0,125	0,25	0,5
EROD	Média	17.49655	44.35273	68.31345	61.91544	68.44862	66.92263	20.63395	27.75742
	Desvio	7.789694	33.07147	23.47605	27.34011	64.7103	87.51181	14.51213	10.87805
GST Fígado	Média	0.767577	0.616925	0.693036	0.685593	0.771512	0.677863	0.665754	0.791204
	Desvio	0.294401	0.216768	0.115456	0.260828	0.118292	0.263839	0.203302	0.227609
GST Brânquias	Média	0.167626	0.203842	0.210242	0.209486	0.207963	0.157242	0.148458	0.154479
	Desvio	0.030006	0.053216	0.027216	0.050121	0.042665	0.040006	0.037835	0.025942
SOD Fígado	Média	16.93253	15.06922	16.41534	20.21232	13.785	15.07259	13.79455	13.65137
	Desvio	4.342237	4.133101	4.545602	5.028918	5.357247	7.500189	4.284551	3.704374
SOD Brânquias	Média	15.00751	13.12956	9.208437	10.46098	10.93745	10.13968	11.54947	10.74273
	Desvio	3.309761	3.501112	0.664046	2.017163	1.036358	1.313881	2.420478	1.374625
GPx Fígado	Média	0.031285	0.027842	0.033242	0.038334	0.042319	0.032928	0.037251	0.039575
	Desvio	0.007235	0.012359	0.009066	0.010345	0.007696	0.00985	0.011605	0.006938
GPx Brânquias	Média	0.034747	0.045357	0.03904	0.033978	0.039588	0.032416	0.036777	0.029972
	Desvio	0.003767	0.01363	0.009917	0.004442	0.007604	0.007071	0.009346	0.005103
CAT Fígado	Média	52.14756	34.23464	42.15246	59.64706	46.13789	43.75111	36.35574	44.30822
	Desvio	17.95707	8.957429	9.051157	19.81754	12.33897	19.75283	9.55726	20.29126
CAT Brânquias	Média	11.94222	13.13994	13.5015	13.92013	13.06978	11.33598	12.44268	13.61204
	Desvio	1.269631	4.315284	2.225802	2.254691	1.490532	1.448233	1.452282	2.278759
MDA Fígado	Média	0.753051	0.661852	0.643516	0.521501	0.54751	0.477543	0.656751	0.505646
	Desvio	0.188758	0.148644	0.170578	0.1681	0.168977	0.0872	0.209822	0.112019
MDA Brânquias	Média	0.964062	0.947977	0.718626	1.136798	1.571738	1.211182	1.705473	1.071285
	Desvio	0.2576	0.168156	0.150748	0.420647	1.109683	0.298653	0.943852	0.455102
Micronúcleo	Média	0	0	0	0	5.28E-05	0	0	0
	Desvio	0	0	0	0	0.000129	0	0	0
Anormalidades	Média	0.004736	0.005788	0.003364	0.005841	0.009249	0.002685	0.002353	0.003019
	Desvio	0.002581	0.005255	0.003136	0.001189	0.008385	0.001321	0.001227	0.000477
Cometa	Média	1.576526	1.315562	1.690088	1.393918	1.330784	2.227864	1.872704	2.076576
	Desvio	0.213084	0.489375	0.309788	0.385072	0.532636	0.182815	0.115231	0.168743

5. Discussão

Os praguicidas tendem a ser compostos muito reativos que podem formar ligações covalentes com vários centros nucleofílicos de biomoléculas celulares, incluindo DNA. Além disso, foi também mostrado que vários praguicidas induzem a formação de ERO (BAGCHI et al., 1995). O Combine * 500SC e o Velpar K®WG são herbicidas seletivos para algumas espécies de plantas, uma vez que seu mecanismo de ação é via inibição do fotossistema II da fotossíntese, porém, encontra-se na literatura vários relatos de praguicidas seletivos que causam prejuízos a organismos não-alvo, como os peixes. Entretanto, para os herbicidas analisados nesse estudo, não existem trabalhos na literatura com relação a seus efeitos em enzimas de biotransformação, no estresse oxidativo e no material genético de animais aquáticos de uma forma geral.

Os resultados do presente trabalho demonstraram o efeito desses herbicidas em *Oreochromis niloticus*. A EROD, biomarcador da fase I da biotransformação teve maior atividade em alguns grupos de organismos expostos em comparação aos seus respectivos controles, tanto no experimento com o Combine * 500SC quanto no experimento com o Velpar K®WG.

A indução do citocromo P4501A1 em fígado de peixes, evidenciada por meio do aumento da atividade da EROD, é geralmente reconhecida como um biomarcador útil em relação à exposição a diferentes tipos de poluentes, não sendo, portanto composto-específico. A indução do CYP450 pode ser decorrente do aumento da síntese (aumento da transcrição, aumento da estabilidade do mRNA) ou da inibição da degradação, pelo do aumento da estabilidade da proteína. Sabe-se que alguns piretróides e praguicidas organoclorados são potenciais indutores da atividade de EROD em peixes (JANSEN et al., 1991)

Rudzok et al (2009), em um trabalho com diurom em linhagens de hepatócitos humanos derivadas da HepG2, mostraram forte indução da transcrição de mRNA de CYP1A1, assim como uma pronunciada atividade da EROD. Como demonstrado no presente trabalho, herbicidas inibidores da fotossíntese também são capazes de induzir a EROD nas tilápias.

Em relação ao biomarcador de fase II da biotransformação, em ambos os experimentos, a atividade da GST não diferiu entre os peixes de cada porte expostos a diferentes concentrações do herbicida, nem em fígado nem em brânquias.

Alguns trabalhos já mostraram um aumento significativo na atividade da GST em peixes expostos ao sedimento coletado em locais poluídos (ALMEIDA, J. S. et al., 2005) e em peixes mantidos em locais impactados, quando comparados com animais mantidos em

locais de referência (CAMARGO; MARTINEZ, 2006). Essa atividade aumentada da GST pode estar associada a um processo adaptativo do organismo à presença de uma variedade de compostos orgânicos no ambiente (GALLAGHER et al., 2001). Entretanto, existem relatos na literatura de redução da GST em peixes de locais poluídos e peixes expostos a HPAs, pesticidas e dioxinas (VAN DER OOST et al., 2003), indicando que os resultados da GST devem ser analisados de forma cuidadosa e sempre associados com os resultados de outros biomarcadores bioquímicos.

É possível que as concentrações utilizadas não foram suficientes para induzir a enzima, já que no trabalho de Schoket e Vincze (1990), em hepatócitos de rato expostos ao diurom, um dos princípios ativos do Velpar K®WG, foi verificado um aumento na atividade da GST, evidenciando uma resposta dessa enzima ao diurom.

Quanto às enzimas antioxidantes, não houve diferença na atividade da SOD entre o controle e os grupos tratados com o Combine *500SC em nenhum dos tamanhos analisados. Já na exposição ao Velpar K®WG, a atividade da SOD nas brânquias diminuiu no grupo exposto à 0,25 mg/L do produto em relação ao grupo controle.

Vários trabalhos mostram que a atividade da SOD tende a ser maior em peixes de locais poluídos, sugerindo que sua atividade pode ser usada para medir a severidade do impacto ambiental (VAN DER OOST et al., 2003). A indução da SOD pode ocorrer durante a alta produção do radical superóxido, portanto, um aumento na atividade da SOD indica um aumento de produção desse radical. No entanto, os radicais superóxido ou o peróxido de hidrogênio podem causar uma oxidação na cisteína da enzima, que pode ter sua atividade diminuída (VAN DER OOST et al., 2003), o que pode ter ocorrido na exposição ao herbicida Velpar K®WG.

A análise da GPx não mostrou diferença na atividade da enzima entre os peixes expostos ao Combine *500SC nem ao Velpar K®WG em relação ao controle. A não alteração da GPx entre os grupos pode ser explicada devido ao fato de algumas isoformas da GST terem atividade peroxidase (ALMEIDA, E.A. et al., 2005), o que pode ter ajudado no combate as ERO e não ter disparado a atividade da GPx no fígado e nas brânquias dos peixes expostos.

Uma diminuição na atividade da CAT foi observada no fígado de peixes grandes expostos à menor concentração de Combine *500SC em relação ao controle. Alguns estudos relataram aumento na atividade da CAT em peixes expostos a praguicidas, como Clasen (2009), que observou um aumento dessa enzima no fígado de carpas expostas por 30 dias ao inseticida carbofuran. Entretanto, o autor observou que em carpas expostas ao inseticida fiopronil a atividade dessa enzima diminuiu no tecido hepático após sete, 30 ou 90 dias de

exposição. É possível que cada herbicida testado altere a atividade da enzima antioxidante CAT de uma forma diferente, inibindo ou induzindo a enzima.

Não foram encontrados relatos na literatura, da atividade de enzimas antioxidantes em resposta aos herbicidas tebutiurum, diurom e hexazinona.

A análise de MDA não evidenciou peroxidação lipídica nos peixes expostos ao Combine *500SC nem nos peixes expostos ao Velpar K®WG.

O nível de peroxidação lipídica pode diferir entre as espécies de peixes. Elasmobrânquios produzem níveis mais altos de peróxidos do que teleósteos de água salgada, que apresentam um nível mais elevado do que o de peixes de água doce (AHMAD et al., 2000), o que pode explicar a ausência de peroxidação lipídica em Tillápias do Nilo expostas aos herbicidas. Diferenças nos níveis de peroxidação lipídica também são atribuídos à variação nos mecanismos antioxidantes de espécies de peixes (AHMAD et al., 2000).

Não foram encontrados relatos de análise de peroxidação lipídica provocada por tebutiurum, diurom ou hexazinona.

Em relação aos danos no DNA, estudos como o de Ventura (2008) e Nwani et. al. (2011) demonstram que formulações comerciais do herbicida atrazine, inibidor do fotossistema II da fotossíntese, produzem, entre outros, efeitos genotóxicos e mutagênicos em *O. niloticus*, com o aumento do número de células micronucleadas.

No presente estudo esses efeitos não foram observados, uma vez que a frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares dos indivíduos expostos tanto ao Combine * 500SC quanto ao Velpar K®WG não diferiram do controle, evidenciando que os herbicidas não provocam esses danos no material genético no modelo estudado.

O ensaio do cometa, porém, diferiu nos peixes expostos aos herbicidas em relação aos respectivos controles, evidenciando que os produtos analisados provocaram danos ao DNA, que foram reparados durante o ciclo celular, não sendo capazes de gerar micronúcleos e anormalidades nucleares nos indivíduos expostos. Pode-se dizer, portanto, que os herbicidas causam genotoxicidade, mas não mutagenicidade evidenciada pelo teste do micronúcleo no modelo estudado.

Bücker et al. (2006) avaliaram o potencial genotóxico e mutagênico do benzeno em peixes elétricos (*Eingenmannia virescens*), expostos a 50 ppm deste composto, em diferentes tempos de exposição. Os autores concluíram que o ensaio do cometa é mais sensível que o teste do micronúcleo, pois com o teste do micronúcleo não foi possível detectar efeitos mutagênicos nos eritrócitos analisados (MASCHIO, 2009).

Além dos parâmetros bioquímicos e genéticos, análise morfológica de tecidos é um parâmetro muito importante para a verificação de mudanças celulares que podem ocorrer em órgãos-alvo, como o fígado, essencial tanto para o metabolismo quanto para excreção de substâncias tóxicas do corpo.

No presente trabalho, a análise histológica evidenciou presença de vacúolos celulares, aparentemente preenchidos por água. Porém, a análise não permitiu atribuir esses danos à exposição aos herbicidas, uma vez que esses vacúolos foram também encontrados no grupo controle. Esse tipo de vacúolo é encontrado em peixes em condições fisiológicas normais. No entanto, vacúolos de gordura, que indicam degeneração hidrópica, são em decorrência de anormalidades no metabolismo dos lipídeos. Apenas um indivíduo analisado no presente estudo apresentou vacúolos de gordura, o que não é suficiente para atribuir alterações morfológicas à exposição aos herbicidas.

Uma análise geral do efeito dos herbicidas nos indivíduos expostos mostra que os peixes expostos apresentam maior atividade da EROD (enzima de fase I da biotransformação), que é conhecida por produzir ERO, o que pode ter sido a causa da maior frequência de cometas nos indivíduos expostos. Esses danos, porém, provavelmente foram reparados, o que é indicado pelo teste do micronúcleo, que não evidencia maior frequência de danos em peixes expostos.

É possível observar, também, que o intervalo entre as concentrações utilizadas não foi suficiente para evidenciar um aumento do efeito em relação ao aumento das concentrações. Intervalos maiores são necessários para se observar variações desses efeitos.

Além da comparação do controle com os tratamentos, foi feita uma comparação par a par entre os diferentes tamanhos de peixes destinados ao controle, com o intuito de se avaliar as respostas dos biomarcadores em diferentes portes de animais.

Nesse caso, as análises da EROD, GST em fígado e GPx em fígado, apontaram que as tilápias em torno de 20 cm tiveram maior atividade do que as tilápias em torno de 10 cm. Da mesma forma, a formação de MDA e a frequência de danos genotóxicos (evidenciados pelo ensaio cometa) foram maiores nos peixes de 20cm.

As análises da EROD e GST sugerem que peixes de maior porte têm uma melhor capacidade de biotransformação, o que pode trazer como consequência maior formação de ERO, originadas na fase I. Dessa forma, a maior atividade da enzima GPx pode ser devido seu papel antioxidante, para combater as ERO formadas. A maior formação de MDA pode também ser devido à maior formação de ERO, que tem como característica afetar as

biomembranas. As ERO também podem interagir com o DNA, o que pode ter causado maior frequência de danos genotóxicos em peixes de 20cm.

O resultado da SOD nas brânquias, no primeiro experimento, mostrou maior atividade da enzima em peixes de 20cm, porém, no segundo experimento, mostrou maior atividade nos peixes de 10cm. Tal diferença pode ser devido a diferença na época do ano em que os experimentos realizados, uma vez que a exposição ao Combine *500SC ocorreu em novembro de 2010 e a exposição ao Velpar K®WG ocorreu em julho de 2011.

No teste de mutagenicidade, os peixes de 20cm apresentaram menor frequência de micronúcleos, o que pode indicar que houve reparo nos danos genotóxicos evidenciados pelo ensaio cometa.

Para verificar se o herbicida provocou respostas diferentes dependendo do porte do animal, fez-se uma análise qualitativa, comparando-se o número de alterações estatisticamente significantes que ocorreram nos peixes de 10cm em relação ao controle com o número de alterações que ocorreram nos peixes de 20cm em relação ao controle. Essa análise mostrou que não há diferença relevante na ação dos herbicidas testados em diferentes tamanhos de *O. niloticus* expostos por 72 horas à esses herbicidas.

Um estudo de Peixoto et al (2009) que avalia a diferença entre tamanho de tilápias, mostrou que os peixes adultos de menor dimensão tratados com o herbicida oxifluorfena apresentaram mortalidade de, aproximadamente, 15%, enquanto no ensaio com tilápias de maior dimensão, não se registrou mortalidade durante o período em que decorreu o ensaio (21 dias), o maior sensibilidade dos peixes menores ao herbicida. Porém o oxifluorfena é do grupo químico difeniléter e atua inibindo a enzima protoporfirinogênio oxidase, diferentemente dos dois herbicidas analisados no presente trabalho.

O presente estudo, além de tornar possível a análise dos efeitos dos herbicidas e da influência do tamanho dos peixes na resposta de biomarcadores, possibilitou a análise de vários biomarcadores em diferentes órgãos. Em uma análise qualitativa, não foi observada diferença relevante na resposta desses biomarcadores dependendo do órgão analisado.

Apesar de os experimentos com o Combine *500SC e com o Velpar K®WG terem sido realizados com concentrações diferentes (10 e 1000X menor que a utilizada na agricultura, respectivamente), a maioria das respostas que esses herbicidas provocaram nos biomarcadores estudados foi semelhante, mostrando que esses herbicidas com mecanismo de ação na fotossíntese de algumas plantas provocam efeitos semelhantes em Tilápias do Nilo, organismos não-alvo.

Os benefícios do uso de herbicidas na agricultura são relativamente bem conhecidos. No entanto, sérias preocupações continuam a ser mencionadas sobre os efeitos potenciais da exposição repetitiva a baixos níveis de herbicidas, e da sensibilidade diferenciada de animais em relação à idade, sexo ou tamanho (FREEMARK and BOUTIN, 1995).

6. Conclusões

Com base nos objetivos do trabalho, e nos resultados obtidos, o presente trabalho permitiu concluir que:

- Houve alteração na enzima de biotransformação de fase I EROD, porém, não houve diferença na enzima de fase II GST em *O. niloticus* expostas aos herbicidas Combine *500SC e Velpar K®WG.
- O estresse oxidativo dos peixes expostos ao Combine *500SC não foi evidenciado pelo MDA. A formação de ERO foi pouco evidenciada pela CAT. No experimento com Velpar K®WG, o MDA também não evidenciou peroxidação lipídica, e mostrou formação de ERO apenas pela SOD.
- Efeitos genotóxicos em peixes expostos a ambos os herbicidas foram evidenciados pelo ensaio cometa, porém, o teste do micronúcleo não apontou efeitos mutagênicos dos herbicidas.
- A análise histológica não permitiu atribuir a presença de danos nos hepatócitos aos herbicidas testados.
- Não foi verificada diferença relevante nos efeitos causados pelos herbicidas de acordo com as concentrações utilizadas nos experimentos.
- Não foi observada diferença nos efeitos causados pelos dois herbicidas em *O. niloticus* dependendo do porte dos indivíduos.
- Os efeitos provocados por cada herbicida nos organismos-teste são semelhantes.

7. Referências bibliográficas

AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H.S.; JAIN, S.K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1523, p. 37-48, 2000.

ALLOWAY, B.J.; AYRES, D.C. **Chemical Principles of Environmental Pollution** 2.ed. London: Chapman and Hall, p. 17-62, 1997.

ALMEIDA, E.A.; MYIAMOTO, S.; BAINY, A.C.D.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO P. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 386-392, 2004.

ALMEIDA, E. A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel *Perna perna* exposed to air and re-submersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 318, p. 21–30, 2005.

ALMEIDA, J.S.; MELETTI, P.C.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 140C: 356-363. 2005.

ALMEIDA, V. M. F., VAL, W. P. DUNCAN, A. L. Crude oil effects on fish of the Amazon: Current Status. In: Tropical Fish: News and Reviews. **Internation Congress on The Biology of Fish**, p. 49 – 60, 2002.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.

AVAS, T. C.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay, **Mutagenesis** 22 263–268. 2007.

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; HASSOUN, E.A.; STOHS, S.J. *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides, **Toxicology** 140 129–140. 1995.

BAYNE, B.L., BROWN, D.A., BURNS, K., DIXON, D.R., IVANOVICI, A., LIVINGSTONE, D.A., LOWE, D.M., MOORE, M.N., STEBBING, A.R.D., WIDDINGS, J., The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals. Praeger, New York, USA. 1985.

BEDOR, C. N. G. **Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na fruticultura e sua implicação para a vigilância da saúde**. Tese (Doutorado em Ciências). Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães. Fundação Oswaldo Cruz.2008.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415 (3), p. 167-184, 1998.

BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Disease**, v. 22, p. 25–34, 1999.

BERTI, A. P.; DÜSMAN, E.; SOARES, L. C.; GRASSI, L. E. A. Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**. Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 45-51, jan./jun. 2009.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. New York: Grune e Stratton, ISBN 0808908618. 1975.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D.M. & SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, 78 Suppl 1: S93-98. 2006.

BOSCOLO, W.R., HAYASHI, C., SOARES, C.M., FURUYA, W.M., MEURER, F. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 30 (5): 1391-1396. 2001.

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

BRASIL. Lei nº 802, 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 de julho de 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm. Acesso em: 02 mai. 20011.

BRENDLER-SCHWAAB, S., HARTMAN, A., PFUHLER, S., SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis** 20, 245–254. 2005.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J. P.; SAGLIO, P. Effects of Carbofuran, Diuran, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 117-124, 2000.

BRUSLE, J.; ANADON, G.G. The Structure and Function of Fish Liver. In: **Fish Morphology**. DATTA-MUNSHI, J.S.; DUTTA, H.M. (Eds.) Science Publishers, 1996.

BUCHELI, T.D., FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. 25, 201_ 268. 1995.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 357-364, 2006.

CAMARGO, M.M.P. e MARTINEZ, C.B.R.. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 21: 61-69. 2006

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MAYERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research** 655. p. 41–46. 2008.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian. **Organs Physiological reviews**. 59 (3): 527-589. 1979.

CLASEN, B. E. **Biomarcadores de estresse oxidativo em carpas (cyprinus carpio) expostas aos inseticidas carbofuran e fipronil em condições de lavoura de arroz**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica). Universidade Federal de Santa Maria. 2009.

COMMANDEUR, J.N.M., STIJNTJES, G.J., VERMEULEN, N.P.E., Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. **Pharmacological Reviews** 47, 271_330. 1995.

COMBINE* 500 SC. São Paulo-SP. Dow AgroSciences Industrial Ltda. Bula de agrotóxico.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental, 167-178. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

DAVID, J. A. O. **Estudo de *Mytella falcata* (mollusca, bivalvia) como indicadora de efeitos genotóxicos e citotóxicos no estuário de Santos, SP**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências do campus de Rio Claro. 2007.

EL-SAYED, A.F.M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**. 1999; 179: 149–168.

FARAH, M.A.; ATEEQ, B.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**; 54: 25–29. 2003.

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

FREEMARK, K., BOUTIN C., Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: a review with special reference to North America, **Agriculture, Ecosystems and Environment**. 5267–91. 1995.

GALLAGHER, E.P.; GROSS, T.S.; SHEEHY, K.M. Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in lake Apopka brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*). **Aquatic Toxicology**, 55: 223-237. 2001.

GEORGE, S.G., Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), **Aquatic Toxicology**; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives. Lewis Publishers, CRC press, pp. 37_ 85. 1994.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos, mutações, câncer & reprodução**. 1 ed. Brasília, Ed. UnB. 2005.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, **Oxford University Press**, 936 p. 2005.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189-98, 1968.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; JRKHART, B.; MACGREGOR, J. T.; SALAMONE, M. F. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Research** 123, p. 61-118, 1983.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, PH.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**, v. 18, p. 277 – 291, 1991.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals**. In: STOREY, K.B. (ed.) Functional metabolism: regulation and adaptation. New York, John Wiley & Sons, Inc., p. 319-368. 2004.

HESS, F. D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**. v. 48, n. 2, p. 160-170, 2000.

HODGSON, E. e GOLDSTEIN, J.A. Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics. In: HODGSON, E. & SMART, R.C. Introduction to biochemical toxicology. **Wiley-Interscience**, 3º ed, p. 67-113, 2001.

JANSEN, E.G., SKAARE, J.U., EGAAS, E. GOKSOYR, A., Response of xenobiotic metabolizing enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to endosulfan, detect by enzyme activities and immunochemical methods. **Aquatic Toxicology**, 21:81-92. 1991.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research** 498, p. 61-77, 2001.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J Biol Chem*, v. 251, n. 20, p. 6183–8. ISSN 0021-9258. 1976.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis. *MMS Comm.* 3.103-115. 1995.

KRUSE, N.D.; VIDAL, R.A.; BAUMAN, T.T.; TREZZI, M.M. Sinergismo potencial entre herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. *Ciência Rural*, Santa Maria. v.31. nº4. p.569-575. 2001.

LACKNER, R. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (eds.) **Fish ecotoxicology**. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, p. 203-224. 1998.

LANDIS, W.G. & YU, M.H. Introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems. Boca Raton, **Lewis Publishers**, 328 p. 1995.

LECH, J.J., VODICNIK, M.J., **Biotransformation**. In: RAND, G.M., PETROCELLI, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA, pp. 526_ 557. 1985.

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

LEVENGOOD, J. M. e BEASLEY, V. R. Capitulo 57: Principles of ecotoxicology. In: GUPTA, R. C. **Veterinary Toxicology: Basic and clinical principles** . p. 689- 708. 2007.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 656-666, 2001.

LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research**, v. 399, n. 1, p. 3-15, 1998.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-55, ISSN 0021-9258. 1969.

MASCHIO, L. R. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do rio preto na área de influência da região de são josé do rio preto/SP**. Tese (Doutorado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE). 2009.

MATSUMOTO, S. T. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP**. 2004. 216 f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.

McCARTHY, J.F., Halbrook, R.S., Shugart, L.R., Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarkerbased biomonitoring capability. Publication no.

3072, ORNL/TM- 11783. **Environmental Sciences Division**, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA. 1991.

MONTEITH, D. K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel eletrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of the DNA damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 345, n. 3-4, p. 97-103, 1995.

MORAES, B.S.; Loro, V.L.; GLUSZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; MACHADO, S.O. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*) **Chemosphere**. 1597–1601. 2007.

MORELAND, D.E.; HILTON, J.L. Actions on photosynthetic systems. In: AUDUS, L.J. **Herbicides physiology, biochemistry, ecology**. London: Academic Press, p.493-523. 1976.

MUNOZ-DE-TORO, M.; BELDOMENICO, H.R.; GARCIA, S.R. et al. Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. **Environmental Research**., v.102, p.107-112, 2006.

MURTY, A. Toxicity of pesticides to fish. 2v. CRC-Press, 1986.

NEGRISOLI, E.; VELINI, E.D.; TOFOLI, G.R.; CAVENAGHI, A.L.; MARTINS, D.; MORELLI, J.L. ; COSTA, A.G.F. Seletividade de herbicidas aplicados em pré-emergência na cultura de cana-de-açúcar tratada com nematicidas. *Planta Daninha*, v.22, p.567-575, 2004.

NELSON, D R., KAMATAKI, T., WAXMAN, D.J., GUENGERICH, P.F., ESTABROOK, R.W. FEYREISEN, R., GONZALEZ, F.J. COON, M.J, GUNSALUS, I.C., GOTOH, O., OKUDA, K., NEBERT, D.W. The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names if enzymes and Nomenclature. *DNA and Cell biology*. 12 (1): 1-51. 1993.

NORDBERG, J.; ARNER, E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

NWANI, C.D., NAGPURE, N.S., KUMAR, R., KUSHWAHA, B., KUMAR, P., LKRA, W.S. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Environmental toxicology and pharmacology** 3 1. p.314–322 2011.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86 – 94, 1990.

OLIVEIRA JR., R. S. Mecanismo de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA Jr, R.S.; CONSTANTIN, J. (Coord.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária, p. 209-260. 2001.

OLIVEIRA JUNIOR, R.S. Seletividade de herbicidas para culturas e plantas daninhas. In: OLIVEIRA JUNIOR, R.S.;CONSTATIN, J. (Coord.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária. p.291-314. 2001b.

ORUÇ, E. Ö.; USTA, D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 48-55, 2007.

ORUÇ, E. Ö.; ÜNER, N. Effects of 2,4 – Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. **Environmental Pollution**, v. 105, p. 267-272, 1999.

PEIXOTO, F.; ALVES-FERNANDES, D.; SANTOS, D.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.85, p. 91-96, 2006.

PEIXOTO, F.P., SANTOS, D.L., VILELA, S., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Caracterização da mitocôndria isolada de fígado de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e alterações da bioenergética mitocondrial causadas pela exposição ao herbicida oxifluorfena. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.2, p.386-392, 2009.

POOVALA, V. S. et al. Role of reactive oxygen metabolites in organophosphate-Bidrin-induced renal tubular cytotoxicity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, p. 1746-1752, 1999.

PRETTI, E. L. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e neurotóxicos da fração solúvel da gasolina para *Prochilodus lineatus***. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Londrina. 2007.

POWERS, D.A. Fish as model systems. **Science**, 246: 352-358. 1989.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: **Revista Brasileira de Genética**, 1991.

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de *astyanax* (*astyanax* sp b e a. *altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda cangüiri – ufpr)**. Dissertação (Mestrado em Genética). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2007

RIBEIRO, L.R., MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. (Orgs.). **Mutagênese ambiental**, Canoas: Ulbra, p. 21-28, 2003.

RIEDER, A. et al. Classes de potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) dos pesticidas receitados em Municípios do Pantanal Norte, Mato Grosso (MT), Brasil, no biênio 1999-2000. IV simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. Corumbá.2004. Disponível em: http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos/asperctos/pdf/bioticos/608RB_Rieder_2_OKVisto.pdf>. Acesso em: 10 junho. 2011.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de Herbicidas**, 5ª ed. Londrina: IAPAR, p.592. 2005.

RUDZOK, S.; SCHMÜCKING, E.; GRAEBSCHE, C.; HERBARTH, O.; BAUER, M. The inducibility of human cytochrome P450 1A by environmental-relevant xenobiotics in the human hepatoma derived cell line HepG2. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 28 370–378. 2009.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas *in vitro*. . In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 201-220. 2003.

SARASQUETE, C.; SEGNER, H. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. **Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 313–32, 2000.

SCHLEGEL, R.; MacGREGOR, J.T. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes : detection of chronic chromosome breakage in mice. **Mutation Research**. 104: 367-369, 1982.

SCHOKET, B.; VINCZE, I. Dose-related induction of rat hepatic drugmetabolizing enzymes by diuron and chlorotoluron, two substituted phenylurea herbicides. **Toxicology Letters**, 50 1-7. 1990.

SHI, L.L.; SHAN, Z.J.; KONG, D.Y. et al. The health and ecological impacts of organochlorine pesticide pollution in China: Bioaccumulation of organochlorine pesticides in human and fish fats. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, v.12, p.402-407, 2006.

SIES, H. et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v. 103, n. 2, p. 287–90, ISSN 0014-5793. 1979.

SIJM, D.T.H.M., OPPERHUIZEN, A. Biotransformation of organic chemicals by fish: enzyme activities and reactions. In: Hutzinger, O. (Ed.), *Handbook of Environmental Chemistry Reactions and Processes*, vol. 2E. Springer, Berlin, pp. 163_ 235. 1989.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGET, R.J. 1992.

STEGEMAN, J.J.; HAHN, M.E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), **Aquatic toxicology**; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. Lewis Publishers, CRC press, Boca Raton, pp. 87_206. 1994.

SUNILA, I. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). **Annales Zoologici Fennici**, Helsinki, v. 24, p. 55-69, 1987.

SUTER, G.W. Use of biomarkers in ecological risk assessment. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), **Biomarkers of Environmental Contamination**. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 419_/428. 1990.

TICE, R. The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: Phillips, D. H.; Vennit, S. (Eds.). **Environmental Mutagenesis**. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK. p. 315-339. 1995

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, p. 327-344. 2003.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 13, p. 57-149, 2003.

VELPAR K[®] WG.Barueri-SP. Du Pont Brasil S.A. Bula de agrotóxico.

VENTURA, B. C.; de ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALRES, M.P. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 90 p. 42-51. 2008.

VERMEULEN, N.P.E. Role of metabolism in chemical toxicity. In: Ioannides, C. (Ed.), *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 29_ 53. 1996.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E. e KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology**, 146(3): 281-300. 2007

YENDLE, J. E.; TINWELL, H.; ELLIOT, B. M.; ASHBY, J. The genetic toxicity of time: Importance of DNA – unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 375, p.125-136, 1997.

YI, X.; DING, H.; LU, Y.; LIU, H.; ZHANG, M.; JIANG, W. Effects of long-term alachlor exposure on hepatic antioxidant defense and detoxifying enzyme activities in crucian carp (*Carassius auratus*). **Chemosphere**, v. 68, p. 1576-1581, 2007.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa

São José do Rio Preto, 01/03/2012

Assinatura