



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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Ana Leticia Madeira Sanches

Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax sp.*): testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidativo, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação

São José do Rio Preto, SP
2014

Ana Leticia Madeira Sanches

Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax* sp.): testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidativo, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração – Química Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

Sanches, Ana Leticia Madeira.

Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax* sp.) : testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidativo, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação / Ana Leticia Madeira Sanches. -- São José do Rio Preto, 2014
80 f. : il., tabs.

Orientador: Eduardo Alves de Almeida

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química ambiental. 2. Diuron. 3. Biotransformação (Metabolismo) 4. Metabólitos. 5. *Astyanax* (Peixe) I. Almeida, Eduardo Alves de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 54:577.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto



Ana Leticia Madeira Sanches

Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax* sp.): testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidativo, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração – Química Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira

Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez

*Dedico este trabalho à minha
família, em especial meus pais
pela luta incansável para sem-
pre me proporcionar o melhor.*

Agradecimentos

À minha família pelo apoio, amor e carinho incondicional.

Ao Prof. Eduardo pelo conhecimento, paciência e oportunidade que dedicou a mim durante esses cinco anos.

Aos colegas e grandes amigos do laboratório Dani, Mari, Déia, Alexandre, Aline, Bel, Isa, Lú, Denise, Jú, Danilo, Alessandro Pedro e principalmente a Cintya pela ajuda, companheirismo e boas risadas.

Às minhas amigas e irmãs de coração desta e de todas as gerações da Rep. Whiskas pela convivência e momentos inesquecíveis.

À turma 08 pelos momentos maravilhosos e que apesar da distância nunca deixamos de ser uma turma unida e divertida.

Ao meu namorado Caetano por tudo, principalmente pela paciência e carinho nos momentos mais difíceis.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com meu crescimento acadêmico.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

Resumo

A utilização do praguicida Diuron na agricultura e a sua metabolização no ambiente em compostos potencialmente tóxicos pode comprometer a saúde dos ecossistemas aquáticos e de organismos não alvo ali presentes. O objetivo principal deste estudo avaliou se os metabólitos 3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia (DCPMU), o 3,4-diclorofenilureia (DCPU) e o 3,4-dicloroanilina (DCA) gerados a partir da biotransformação do diuron, geram mais ou menos efeitos que o próprio diuron em parâmetros genotóxicos e bioquímicos em peixes *Astyanax sp.* Foram realizados testes de toxicidade com o diuron e os metabólitos a fim de obter a CL_{50} de cada composto. Foi visto que o diuron e o DCA possuem semelhante toxicidade a lambaris, uma vez que seus valores de CL_{50} foram muito próximos (0,75 e 0,89 mg/L, respectivamente). O valor de CL_{50} para o DCPMU foi duas vezes maior (1,42 mg/L) e para o DCPU foi de três vezes maior que a do diuron ($>3,0$ mg/L), o que indica ser o metabólito de menor potencial tóxico. A partir do valor de CL_{50} , realizou-se a exposição dos lambaris a concentrações subletais ($CL_1=0,015$ mg/L e $CL_{10}=0,15$ mg/L do diuron) por dois e sete dias para avaliar os parâmetros bioquímicos e genotóxicos desses compostos. A genotoxicidade foi avaliada pelo método do cometa e foi visto que a metabolização do diuron não minimiza os efeitos genotóxicos em lambaris uma vez que os metabólitos DCA, DCPMU e DCPU são capazes de causar lesões no DNA dos peixes. Parâmetros bioquímicos foram avaliados pela medida da atividade de enzimas de biotransformação (EROD e GST), de defesa antioxidante (SOD, GPx e CAT) e ocorrência de peroxidação lipídica (MDA). A atividade da EROD aumentou pela exposição dos lambaris aos três metabólitos em brânquias e fígados. A GST foi inibida pela exposição ao DCA, nas brânquias e pela exposição ao DCPMU e DCPU em brânquias e fígado. A atividade da GST aumentou no fígado de lambaris expostos ao DCA. A SOD foi induzida em todos os tratamentos com os metabólitos e a GPx nas exposições com o DCPMU e DCPU. A atividade da CAT aumentou na exposição DCA, diminuiu na exposição ao DCPMU e DCPU nos dois tecidos e também ao diuron no fígado. Este estudo mostra que a exposição ao diuron e aos três metabólitos alteram parâmetros bioquímicos indicadores de estresse oxidativo em lambaris nas condições experimentais testadas. De maneira geral, a exposição aos metabólitos provocou mais alterações nos peixes quando comparada com a exposição ao diuron.

Palavras chave: Diuron, metabólitos, *Astyanax sp.*

Abstract

Diuron is a pesticide used in the agriculture and its transformation in potential toxic compounds can be harmful to aquatic ecosystem and animals. This work had as main objective discover if the metabolites 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-methylurea (DCPMU), 3,4-dichlorofhenylurea (DCPU) and 3,4-dichloroaniline (DCA) produced in the diuron degradation may cause more or less effects than the pesticide in genotoxic and biochemistry parameters in fish. Toxicity tests were performed with the diuron and its metabolites to obtain the LC₅₀. We observed that the diuron and the DCA have similar toxicity to fish observed by the low values of LC₅₀. The DCPMU LC₅₀ is twice higher and DCPU is three times higher than diuron and DCA. It indicating that these metabolites can be less toxic than the others compounds. From LC₅₀ values, fish exposures were performed at LC₁ (0.015 mg/L) and LC₁₀ (0.15 mg/L) of diuron concentration by two and seven days. The genotoxicity was measured by comet assay and we observed that the degradation of diuron increase the genotoxic effects, whereas the DCA, DCPMU and DCPU are able to promote DNA damage. Biochemistry parameters were measured by analysis of biotransformation enzymes (EROD and GST), antioxidant defenses (SOD, GPx and CAT) and lipid peroxidation (MDA). EROD activity is increased after all metabolites exposure in both tissues. GST activity is inhibited after DCA gill exposure and DCPMU and DCPU gill and liver exposures. GST activity also is increased after DCA exposure in liver. SOD is induced in all metabolites treatment and GPx to DCPMU and DCPU exposure. CAT activity is increased after DCA exposure and it is inhibited after DCPMU and DCPU exposures in both tissues. CAT is also inhibited after diuron exposure in the liver. The exposure of diuron and its three main metabolites can change biochemistry parameters indicators of oxidative stress in *Astyanax sp.* in the conditions tested in this study. In general, the exposures of metabolites promote more changes in the metabolism of detoxification of fish than the diuron.

Keywords: Diuron, metabolites, *Astyanax sp.*

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura molecular do N-(3,4-diclorofenil)-N, N-dimetilureia (diuron).....	12
Figura 2: Estrutura molecular do 3,4- dicloroanilina (DCA), 3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia (DCPMU) e 3,4-diclorofenilureia (DCPU).....	146
Figura 3: Curva de relação dose-resposta típica de testes de toxicidade.....	19
Figura 4: Geração de ERO pela atividade de biotransformação e produção de energia na mitocôndria.....	2231
Figura 5: Ciclo catalítico da P450. Metabolização de xenobiótico e geração de ERO.....	243
Figura 6: Ação da EROD sobre o substrato 7-etóxi-resorufina.....	304
Figura 7: Ação da GST sobre o substrato CDNB.....	25
Figura 8: Esquema de produção de ERO e ocorrência de peroxidação lipídica.....	26
Figura 9: Classificação de eritrócitos submetidos aos ensaio do Cometa.....	29
Figura 10: Espécime de peixe lambari (<i>Astyanax sp.</i>).....	32
Figura 11: Coleta de sangue, fígado e brânquias após exposição ao diuron, DCA, DCPMU e DCPU.....	36
Figura 12: Scores gerados com o ensaio do cometa após exposição por dois e sete dias ao diuron, DCA, DCPMU e DCPU.....	46
Figura 13: Gráfico da atividade enzimática da EROD em fígado e brânquias de lambaris expostos a diferentes concentrações do diuron e seus metabólitos.....	50
Figura 14: Gráfico da atividade enzimática da GST em fígado e brânquias de lambaris expostos a diferentes concentrações do diuron e seus metabólitos.....	53

Figura 15: Gráfico da atividade enzimática da SOD em fígado e brânquias de lambaris expostos a diferentes concentrações do diuron e seus metabólitos.....	56
Figura 16: Gráfico da atividade enzimática da GPx em fígado e brânquias de lambaris expostos a diferentes concentrações do diuron e seus metabólitos.....	58
Figura 17: Gráfico da atividade enzimática da Catalase em fígado e brânquias de lambaris expostos a diferentes concentrações do diuron e seus metabólitos.....	61
Figura 18 Gráficos dos níveis de peroxidação lipídica (MDA) em fígado e brânquias de lambaris expostos à diferentes concentrações do diuron e seus metabólitos.....	64

Abreviações

CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CENO	Concentração de efeito não observada
CEO	Concentração de efeito observada
CE ₅₀	Concentração de um composto de efeito a 50% da população
citP450	Citocromo P450
CL ₅₀	Concentração de um composto letal a 50% da população
CL ₁	Concentração de um composto letal a 1% da população
CL ₁₀	Concentração de um composto letal a 10% da população
CYP1A	Isoforma 1A do citocromo P450
DCA	3,4- dicloroanilina
DCPMU	3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia
DCPU	3,4-diclorofenilureia
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EROD	7-etóxi-resorufina- <i>O</i> -deetilase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSSG	Glutathione dissulfeto oxidada
GSH	Glutathione
GST	Glutathione-S-transferase
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PCB	Bifenilas policloradas
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico

Sumário

1. Introdução.....	12
1.1 Diuron e metabólitos.....	14
1.2 Toxicidade.....	17
1.3 Biomarcadores de contaminação aquática e estresse oxidativo.....	19
1.4 Enzimas de biotransformação e defesa antioxidante.....	22
1.5 Marcadores genotóxicos.....	28
1.6 Peixes como organismos sentinelas em estudos de contaminação aquática.....	29
2. Objetivos.....	31
3. Material e métodos.....	32
3.1 Organismo teste.....	32
3.2 Diuron e metabólitos.....	33
3.3 Teste de toxicidade.....	33
3.4 Exposição dos peixes ao diuron e seus metabólitos para ensaio do cometa e análises de biomarcadores bioquímicos.....	34
3.4.1 Descarte de resíduos tóxicos e água contaminada.....	36
3.4.2 Ensaio cometa.....	37
3.4.2.1 Preparação das lâminas.....	37
3.4.2.2 Análise das lâminas.....	37
3.4.3 Análises bioquímicas.....	38
3.4.3.1 Preparo das amostras para a análise das enzimas EROD, GST, CAT, SOD, GPx.....	38
3.4.3.2 Análise da Análise da 7-etóxioresorufina- <i>O</i> -deetilase (EROD).....	38
3.4.3.3 Análise da Glutathione-S-Transferase (GST).....	39

3.4.3.4	Análise da Catalase (CAT).....	39
3.4.2.5	Análise da Glutathiona Peroxidase (GPx).....	40
3.4.3.6	Análise da Superóxido Dismutase.....	40
3.4.3.7	Quantificação de proteínas.....	41
3.4.4	Níveis de peroxidação lipídica.....	41
3.5	Análises estatísticas.....	42
4.	Resultados e discussão.....	43
4.1	Teste de Toxicidade.....	43
4.2	Ensaio do cometa.....	45
4.3	Enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante.....	49
4.3.1	Análise da EROD e GST.....	49
4.3.2	Análise da GPx e CAT.....	55
4.3.3	Peroxidação lipídica.....	63
5.	Conclusão.....	69
	Referências Bibliográficas.....	70
	Anexo.....	79

1 Introdução

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no período colonial e hoje é uma das principais culturas da economia brasileira. Desde a década de 70, com o lançamento do Proálcool, o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é o combustível renovável mais comercializado no país (PETROBRÁS, 2013; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013).

Responsável por produzir mais da metade do açúcar vendido no mundo, o Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar e etanol. Atualmente, o país possui mais de nove milhões e meio de hectares de área plantada com cana e a previsão é que essa área dobre até 2020. A estimativa de colheita para os anos de 2018/19 é de mais de 47 milhões de toneladas de cana e uma produção de mais de 58 bilhões de litros de etanol para consumo interno e externo, o que corresponde a um aumento significativo em relação a produção do ano de 2008 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013).

A cana-de-açúcar é produzida em quase todo o território nacional sendo que 60% dessa produção estão concentradas no estado de São Paulo. Com mais de cinco milhões de hectares de área planta, São Paulo destaca-se por ser o principal estado produtor e consumidor de cana-de-açúcar seguido de Minas Gerais e Paraná, com mais de 800 mil e 600 mil hectares, respectivamente (UNICA, 2011).

O crescimento contínuo desse tipo de produção exige uma grande expansão da área plantada. Aliado a esse crescimento, problemas ambientais podem ser intensificados com essa atividade agrícola. A monocultura pode causar, além da redução da biodiversidade gerada pelo desmatamento, a contaminação de águas superficiais e subterrâneas devido ao excesso de químicos aplicados no solo que são utilizados como adubos, corretivos minerais, herbicidas e defensivos agrícolas (EMBRAPA, 2014).

O uso de praguicidas para o controle de pragas e de plantas daninhas é prática comum na lavoura e importante para obter de altos rendimentos na produção agrícola. É um método químico muito utilizado, pois tem a vantagem de ser economicamente viável em função da mão-de-obra barata e rapidez na aplicação (IEA, 2007). Porém, a contaminação do solo e da água por esses compostos pode prejudicar esses sistemas, principalmente a saúde dos organismos não-alvo que ali vivem (VEIGA et al., 2006).

A princípio, esses compostos eram estáticos, ou seja, possuíam baixa solubilidade em água e adsorviam fortemente ao solo. Com a manipulação dessas substâncias ao longo do tempo, os praguicidas foram se tornando mais tóxicos e cada vez mais solúveis em água, o que facilita o transporte a compartimentos aquáticos. A elevada persistência dos agrotóxicos requerida para uma melhor eficácia biocida provoca também, maiores riscos ao ambiente (VEIGA et al., 2006).

O nível de contaminação gerado por praguicidas depende não só de fatores como a persistência no ambiente, mas também da toxicidade dos metabólitos que podem ser gerados durante sua degradação. Estudos mostram que, uma vez no ambiente, alguns compostos podem ser transformados em metabólitos potencialmente tóxicos, como no caso dos praguicidas conhecidos pelos nomes comerciais diuron, irgarol 1051, imidacloprid e Fipronil (GIACOMAZZI et al., 2004; GATIDOU e THOMAIDIS, 2007; SUCHAIL et al., 2009; HAINZL et al., 1998; SCHENK et al., 2001).

Para uma avaliação do potencial de contaminação de um composto mais realista, é fundamental estudar os efeitos causados por esses praguicidas, e também por seus principais metabólitos em organismos aquáticos não-alvo. A toxicidade destes metabólitos mostra uma potencial intensificação da contaminação e define o real impacto ambiental gerado por um composto (GIACOMAZZI et al., 2004).

1.1 Diuron e metabólitos

Diuron é um herbicida usado em áreas agrícolas e não agrícolas, como por exemplo, em instalações industriais. Pode ser usado em diferentes culturas como a da cana-de-açúcar, algodão, café, uva e frutas cítricas. Em 2011, no Brasil, quase dez mil toneladas desse composto foram utilizados na agricultura. Este composto destaca-se entre os herbicidas mais utilizados principalmente na cultura da cana-de-açúcar (Da ROCHA et al., 2013).

O diuron, N-(3,4-diclorofenil)-N, N-dimetiluréia (Figura 1), é um composto que pertence ao grupo químico das feniluréias (MUSUMECI et al., 1995). O agrupamento uréia do diuron age bloqueando a transferência de elétrons no fotossistema II da fotossíntese impedindo assim, a produção do oxigênio e o crescimento de plantas e micro-organismos (GIACOMAZZI et al., 2004).

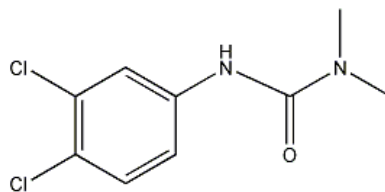


Figura 1: Estrutura molecular do N-(3,4-diclorofenil)-N, N-dimetiluréia, o praguicida diuron. Figura feita no software ChemDraw.

O diuron possui moderada solubilidade em água, alta capacidade de adsorção (GIACOMAZZI et al., 2004). Compostos químicos são classificados de acordo com sua periculosidade variando de produto altamente perigoso ao meio ambiente (classe I) a produto pouco perigoso (classe IV) (IBAMA, 2014). O diuron é classificado como muito perigoso ao meio ambiente (classe II) (NORTOX, 2004).

Segundo dados do *Extension Toxicology Network* – EXTTOXNET, o diuron é moderadamente tóxico a peixes e possui média persistência no ambiente, tendo uma meia-vida variando de um mês a um ano no solo.

Muitos agricultores justificam o uso “seguro” sob o ponto de vista ambiental do diuron na lavoura em função dessa moderada toxicidade e relativa persistência média. Entretanto, a meia-vida do composto justamente indica o tempo para que sua concentração diminua pela metade, o que não quer dizer que o composto desaparece do ambiente. A formação de diferentes metabólitos a partir desse praguicida é um fator relevante a se observar.

A metabolização do diuron pode ocorrer por processos bióticos e abióticos (Da ROCHA et al., 2013). O 3,4-dicloroanilina (DCA) é o principal produto gerado na metabolização do diuron. Possui elevada persistência no solo, águas superficiais e subterrâneas. É considerado mais tóxico que o próprio diuron e existem alguns estudos que verificaram a toxicidade desse metabólito a diferentes espécies, como mamíferos, aves e peixes (GIACOMAZZI et al., 2004; GATIDOU e THOMAIDIS, 2007).

Sabe-se também que, além do DCA, outros dois principais metabólitos são produzidos durante a metabolização do diuron. Os derivados do diuron são gerados pela N-demetilação do praguicida original formando metabólitos metiluréia e feniluréias (Figura 2) (GATIDOU e THOMAIDIS, 2007).

A via microbiana é considerada a principal forma de transformação do diuron no solo e o 3-(3,4-diclorofenil)-3-metiluréia (DCPMU), 3,4-diclorofeniluréia (DCPU) e 3,4-dicloroanilina (DCA) são os principais produtos desta degradação (Figura 2) (GIACOMAZZI et al., 2004).

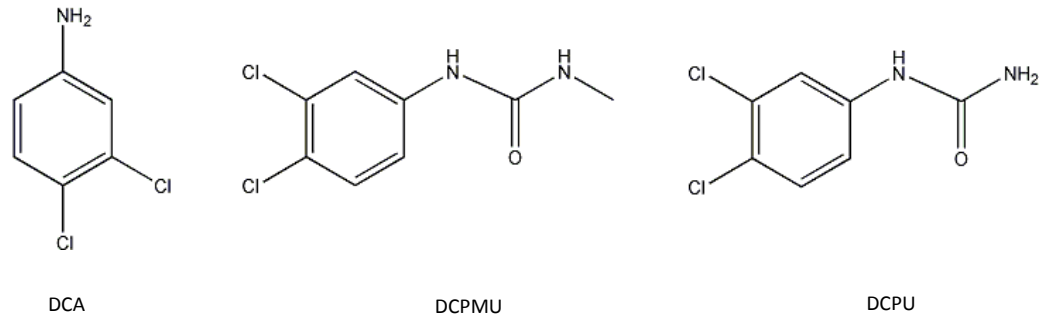


Figura 2: Estrutura molecular do 3,4- dicloroanilina (DCA), 3-(3,4-diclorofenil)-3-metilurée (DCPMU) e 3,4-diclorofenilurée (DCPU), principais metabólitos do praguicida diuron. Figura feita no software ChemDraw.

O diuron e seus metabólitos são encontrados no solo, sedimentos e em águas superficiais e subterrâneas (GIACOMAZZI et al., 2004). Devido a sua elevada toxicidade a organismos aquáticos, o diuron é considerado um composto de grande preocupação ambiental (OTURAN et al, 2008). Mais que isso, devido a sua alta taxa de metabolização a compostos potencialmente tóxicos, como já foi observado em estudos com o DCA, a preocupação quanto ao impacto causado por esse composto e seus metabólitos é crescente.

Existem estudos que relatam a ocorrência desses metabólitos no ambiente e suas potenciais toxicidades a organismos não-alvo como, por exemplo, em ratos (GATIDOU e THOMAIDIS, 2007), mas pouco se sabe ainda sobre seus efeitos tóxicos em animais aquáticos (SALVESTRINE et al., 2002; GIACOMAZZI et al., 2004; Da ROCHA, et al., 2013).

Tendo em vista a utilização do Diuron em larga escala na agricultura, seu transporte a águas superficiais e sua metabolização a compostos potencialmente tóxicos pode-se afirmar que é fundamental a realização de estudos em organismos aquáticos a fim de identificar os efeitos e os danos gerados por esses metabólitos em organismos que ali vivem.

1.2 Toxicidade

A toxicologia tem como objetivo identificar os potenciais riscos ao ambiente que uma substância pode causar, e também as condições em que esses riscos podem ser potencializados. A capacidade de um composto causar efeitos deletérios em organismos é definida como toxicidade. Ela depende da concentração massa/massa, tempo de exposição e propriedades químicas do composto (COSTA et al., 2008).

A toxicidade pode ser medida pelos chamados testes de toxicidade. Nesses testes são gerados dados que são utilizados como ferramenta para comparar o potencial tóxico de diferentes compostos químicos, além de permitir comparar a sensibilidade de diferentes organismos. São também realizados para avaliar os efeitos tóxicos de determinadas substâncias e de águas contaminadas (COSTA et al., 2008).

O desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade é fundamental para a ecotoxicologia. Com esses protocolos podem ser definidos concentrações de limites permissíveis de compostos no ambiente com níveis de certeza confiáveis para servir de guia a entidades reguladoras (RONCO et al., 2004).

A agência americana de proteção ambiental (Environmental Protection Agency - EPA) é um órgão que desenvolve protocolos para a realização de testes de toxicidade. A padronização desses testes é essencial para a uniformização, utilidade e reprodutibilidade em diferentes laboratórios, a fim de facilitar a comparação entre os resultados publicados (COSTA et al., 2008).

Os testes de toxicidade podem ser dos tipos crônicos ou agudos. Em testes crônicos são realizados ensaios para medir o efeito de substâncias em organismos a concentrações sub-letais por um longo período que pode compreender parte ou todo o ciclo de vida do indivíduo. Os resultados de testes crônicos são geralmente expressos como CENO (Concentração de Efeito não Observado) ou CEO (Concentração de Efeito Observado) (COSTA et al., 2008).

Já em testes agudos são realizadas exposições para medir efeitos de compostos em organismos durante um curto período de exposição em relação ao ciclo de vida do organismo, geralmente de 24 a 96 horas. A letalidade ou qualquer manifestação antecedente a ela são os efeitos avaliados nos organismos em estudos deste tipo (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990). Os resultados de testes agudos são geralmente expressos como CL_{50} (concentração letal causada em 50% dos organismos expostos) ou CE_{50} (concentração de efeito causada em 50% dos organismos expostos) (COSTA et al., 2008).

A relação dose-resposta, ou seja, a relação entre a concentração de um composto químico e o efeito deletério causado ao organismo exposto é fundamental para avaliar o risco gerado pela substância ao ambiente. Curvas representativas de relação dose-resposta são do tipo sigmoide (Figura 3), e nos mostram a concentração (CL_{50}) e o coeficiente angular da parte linear da curva que revela o efeito gerado no organismo (HODGSON, 2004).

Métodos estatísticos foram desenvolvidos a fim de facilitar o planejamento e execução dos testes de toxicidade. Existem diferentes tipos de métodos. Para dados paramétricos são comumente usados o Probit e Logit. Porém, esses métodos não conseguem “entender” eventuais anomalias nos dados e não são válidos para curvas assimétricas. Para resultados não paramétricos, os métodos Spearman-Kärber e *timmed* Spearman-Kärber são os mais utilizados. São fáceis de usar, precisos e são válidos para curvas simétricas e assimétricas (COSTA et al., 2008).

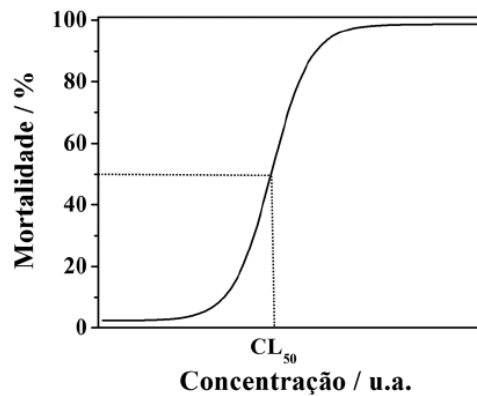


Figura 3: Figura representando uma típica curva sigmoide de relação dose-resposta em testes de toxicidade. A curva revela a concentração de uma substância capaz de matar 50% de uma população. Adaptado de Costa et al. (2008).

Além do efeito na mortalidade, é possível avaliar também alterações nas condições fisiológicas e/ou metabólicas dos indivíduos, que indiquem o efeito deletério do composto testado. Em uma exposição, organismos aquáticos podem absorver compostos químicos por diferentes rotas. Essa absorção pode provocar efeitos deletérios subletais, tais como alterações nos sistemas enzimáticos de biotransformação, permeabilidade de membranas e danos ao DNA (COSTA et al., 2008).

1.3 Biomarcadores de contaminação aquática e estresse oxidativo

A qualidade da água pode ser determinada por parâmetros físicos, químicos e biológicos. Os parâmetros físicos e químicos são muito utilizados para avaliar a origem e concentrações de contaminantes. Porém, esses métodos sozinhos possuem a desvantagem de não detectar alterações nos organismos que vivem nesse sistema, gerando uma informação parcial sobre a qualidade da água (ALMEIDA e RIBEIRO, 2014).

Os biomarcadores são uma ferramenta para avaliar o efeito tóxico de substâncias poluentes em corpos aquáticos e a relação dose-efeito no organismo (RODRIGUES, 2009).

O termo biomarcador foi definido em 1987 pelo *Committee on Biological Markers of the National Research Council* (NRC) como “indicador que sinaliza eventos em sistemas biológicos ou amostras, submetidos à exposição química” (SCHLENK, 1999). Em outras palavras, biomarcadores são respostas biológicas que atuam como sistemas de aviso precoce indicando a contaminação do ambiente antes que ocorram danos mais graves aos organismos e ao ecossistema (MCCARTHY; SHUGART, 1990).

O uso de biomarcadores, por serem respostas biológicas, oferecem informações adicionais necessárias para a avaliação da qualidade de um ambiente aquático. Mais que isso, o uso de biomarcadores em estudos de monitoramento possibilita a determinação de efeitos adversos causados em organismos aquáticos por concentrações subletais de diferentes tipos de contaminantes (ALMEIDA e RIBEIRO, 2014).

Existem diferentes tipos de biomarcadores. Dentre eles, os biomarcadores genotóxicos são ferramentas utilizadas para avaliar lesões no DNA de diferentes organismos causadas por contaminação. Biomarcadores bioquímicos são ferramentas nas quais são medidas alterações nos sistemas enzimáticos do metabolismo de detoxificação dos organismos.

Em uma situação de contaminação, organismos aquáticos podem absorver e acumular compostos químicos em seus tecidos e órgãos. O metabolismo de detoxificação desses organismos age de forma a eliminar esses compostos, excretando-os. Para isso, ocorrem diversas reações catalisadas por enzimas que transformam esses contaminantes em compostos solúveis para serem mais facilmente excretados. Porém, essa atividade de biotransformação, aliada ao aumento do consumo de oxigênio para produção de energia na mitocôndria e ao aumento de reações redox promovidas por diversos tipos de compostos tóxicos nas células, gera espécies reativas de oxigênio (ERO) (VAN DER OOST et al., 2003).

Essas ERO são, na maioria das vezes, radicais livres que podem reagir rapidamente com as biomoléculas causando sua desestruturação, muitas vezes com decorrente perda de sua função. Os radicais superóxido e hidroxil, e outras moléculas pró-oxidantes, como o peróxido de hidrogênio são exemplos de ERO (Figura 4) (CONSTANTINI, 2010).

Estas ERO podem causar danos ao DNA, às proteínas e aos lipídeos, podendo afetar diretamente a permeabilidade das membranas celulares pelo processo de peroxidação lipídica (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996). A peroxidação lipídica é a oxidação dos lipídeos da membrana celular causada pelo ataque de ERO. A degradação dos produtos da lipoperoxidação resulta em compostos como cetonas e aldeídos, tal como o malondialdeído (MDA). O MDA é considerado bom biomarcador de contaminação aquática e pode ser quantificado e usado como indicativo de estresse oxidativo (VAN DER OOST et al., 2003).

Enzimas do sistema de defesa antioxidante atuam para combater as ERO e minimizar os danos oxidativos causado por elas. Um desbalanço entre a produção de ERO e a atuação de enzimas antioxidantes gera o estresse oxidativo (LÓPEZ-BAREA; PUEYO, 1998). Tanto as enzimas de biotransformação, como as de defesa antioxidante são muito utilizadas como biomarcadores de contaminação.

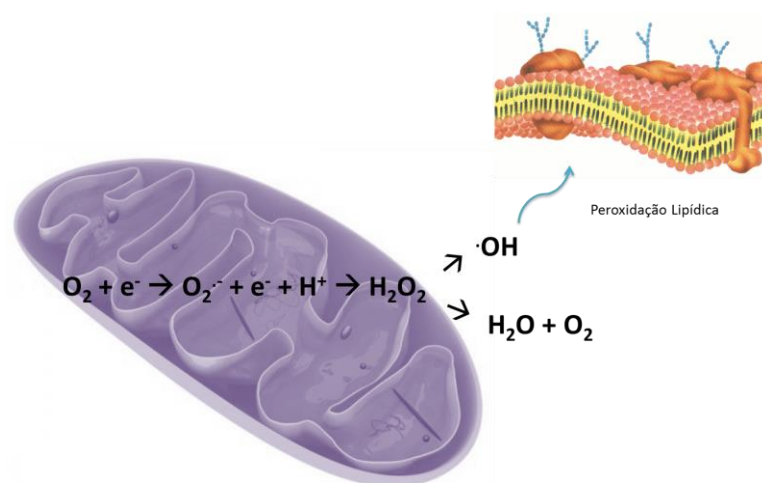


Figura 4: Geração de ERO (radicais superóxido e hidroxil e peróxido de hidrogênio) pela atividade de biotransformação, aliada a produção de energia na mitocôndria. ERO atacam as membranas celulares pelo processo de peroxidação lipídica e podem causar danos ao DNA, às proteínas e aos lipídeos.

1.4 Enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante

Em geral, compostos presentes no ambiente aquático são absorvidos por peixes por serem predominantemente lipofílicos. O metabolismo de detoxificação de xenobióticos é realizado pela ação de diferentes enzimas. Essas enzimas tem a função tornar o composto absorvido mais solúvel para ser eliminado para fora do corpo (HODGSON e SMART, 2001).

O metabolismo de biotransformação de compostos químicos pode ser dividido em três fases. Na fase I ocorrem reações de oxidação, redução e hidrólise. Durante a fase II, acontecem reações de conjugação, e na fase III ocorre a excreção.

Na fase I, grupos reativos polares são introduzidos na molécula do composto gerando substratos que participarão das reações de fase II. Na fase I, o sistema enzimático predominantemente responsável pela oxidação das moléculas é o complexo multienzimático de monooxigenases citocromo P450 (citP450). São uma superfamília de heme-proteínas ligadas à membrana do retículo endoplasmático e localizam-se no microsoma principalmente de células hepáticas. (GIULIO e HINTON, 2008; VAN DER OOST et al., 2003).

A monooxigenação ocorre pela redução de um átomo da molécula de oxigênio em água, enquanto o outro átomo é incorporado à molécula do substrato utilizando elétron do NADPH (Reação 1) (GIULIO e HINTON, 2008).



A ação dessas enzimas envolve uma série de reações até que o substrato seja oxidado. O ciclo das monooxigenases se inicia quando o substrato liga-se com o complexo oxidado (Fe^{3+}) facilitando a transferência de elétrons do NADPH ao complexo (Figura 5).

A molécula de oxigênio liga-se ao complexo agora reduzido (Fe^{2+}) e ocorre a transferência do segundo elétron pela ação da enzima mediadora citocromo b5 redutase. Posteriormente, ocorre a clivagem da ligação dos átomos da molécula de oxigênio, a inserção de dois prótons e a formação de uma molécula de água. Por fim, o oxigênio é inserido no substrato para posterior dissociação do substrato mais solúvel e do complexo restaurado para começar um novo ciclo (Figura 5) (GIULIO e HINTON, 2008).

As enzimas do complexo multienzimático P450 possuem diferentes isoformas. A isoforma 1A (CYP1A) age aumentando a solubilidade do composto em água, pois catalisa a reação de ligação de um pequeno grupo polar com o composto para ser mais facilmente eliminado do organismo (GIULIO e HINTON, 2008).

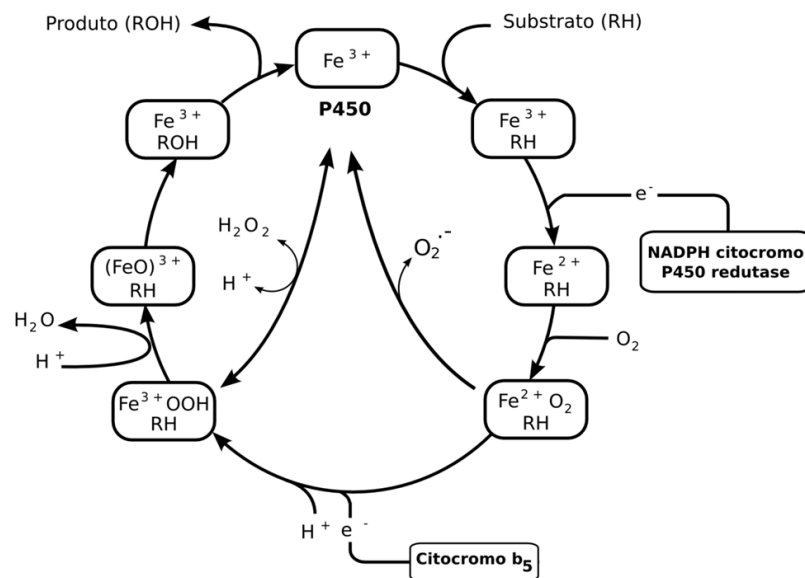


Figura 5: Ciclo catalítico do P450 para metabolizar o xenobiótico em um substrato solúvel. O ciclo envolve reações de oxirredução com a participação de elétrons do NADPH e da enzima mediadora citocromo b5 redutase formando uma molécula de água. Adaptado de Nogueira (2008).

A 7-etoxioresorufina-*O*-deetilase (EROD) é o nome dado a isoforma 1A do citocromo P450 (CYP1A) quando age sobre o substrato 7-etóxi-resorufina (Figura 6). Em peixes, a CYP1A é responsável pela biotransformação de uma variedade de compostos como os HPA, PCB e dioxinas. Há também estudos que mostram a indução da CYP1A após exposições *in vitro* e *in vivo* ao diuron e outros herbicidas da família uréia, como o propanil e o linuron (TAKEUCHI et al. 2008). A EROD é muito avaliada em estudos de contaminação aquática e é considerado bom biomarcador em peixes (WHYTE et al., 2000).

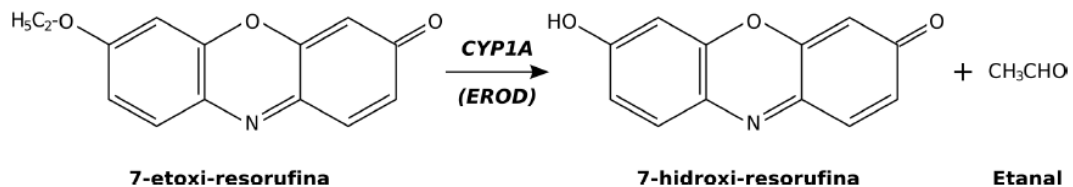


Figura 6: Reação mostrando a ação da EROD sobre o substrato 7-etóxi-resorufina. Adaptado de Whyte et al. (2000).

A fase II do metabolismo de detoxificação envolve as reações de conjugação em que ocorre a ligação do composto a um grupo ligante endógeno como, por exemplo, o ácido glucurônico e glutatona. Essa ligação forma conjugado altamente solúvel em água para ser mais facilmente excretado (HODGSON e SMART, 2001).

As glutatona S-transferases (GST) são uma família de enzimas de fase II do metabolismo de detoxificação que protegem as células contra os efeitos tóxicos de uma variedade de compostos químicos e endógenos. São encontradas no citosol das células e catalisam a reação de conjugação de glutatona reduzida (GSH) com substratos de caráter eletrofílicos (HODGSON e SMART, 2001).

Existem diferentes isoformas da GST como, por exemplo, a alpha, mu, pi, sigma, theta e a zeta. As isoformas alpha, mu e pi são as mais encontradas em órgãos de detoxificação como o fígado. O substrato artificial utilizado na avaliação da atividade da GST total é o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Este substrato é muito utilizado, pois apresenta ampla gama de detecção das diferentes isoformas da GST (Figura 7) (VAN DER OOST et al., 2003).

O aumento da polaridade do substrato conjugado reduz a capacidade desse composto de difundir pela dupla membrana lipídica da célula. O substrato mais solúvel em água formado durante a fase I e II será excretado na fase III (GIULIO e HINTON, 2008). A GST é uma importante enzima de fase II do metabolismo de biotransformação, bastante estudada em peixes e é considerado um bom biomarcador de contaminação.

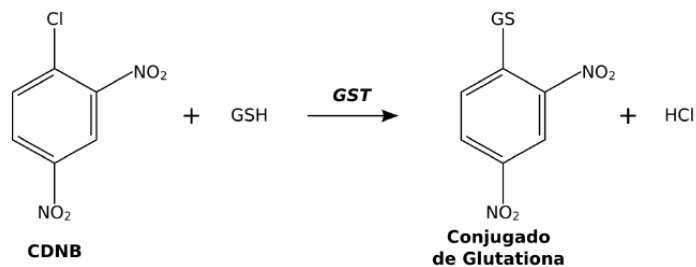
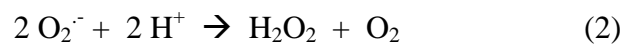


Figura 7: Reação da GSH com o substrato CDNB catalisada pela GST. Adaptado de Nogueira (2008).

As ERO geradas no organismo tanto como consequência da respiração, como as geradas no metabolismo de biotransformação são removidas pelas defesas antioxidantes. O sistema de defesa antioxidante é formado por enzimas específicas que catalisam reações que transformam os radicais reativos e as moléculas pró-oxidantes em moléculas não reativas (Figura 8) (VAN DER OOST et al., 2003; GIULIO e HINTON, 2008).

McCord e Fridovich isolaram a superóxido dismutase (SOD) pela primeira vez de sangue bovino em 1969. As SOD são metaloenzimas localizadas no citosol e catalisam a transformação de radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Essa reação ocorre pela transferência de um elétron de um radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a outro, na presença de prótons formando peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Reação 2) (VAN DER OOST et al., 2003; GIULIO e HINTON, 2008).



A SOD é uma importante enzima de defesa antioxidante e é responsiva a uma variedade de contaminantes. Embora a reação catalisada pela SOD faça com que diminua a concentração de radicais superóxidos, ela gera como um de seus produtos o peróxido de hidrogênio, que na presença de alguns metais como, por exemplo, o cobre gera o radical hidroxil (Figura 8) (GIULIO e HINTON, 2008).

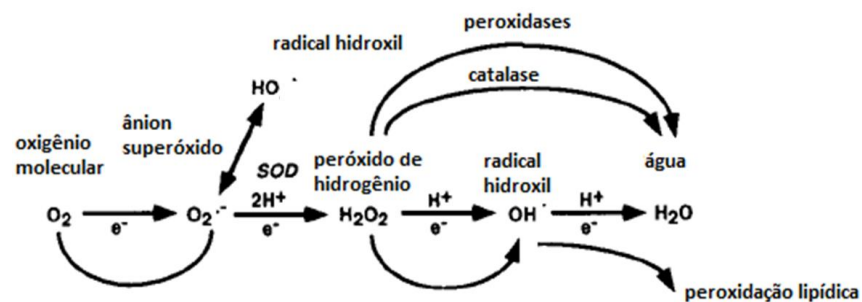
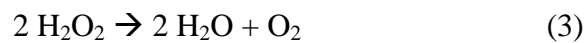
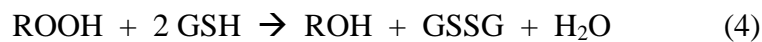


Figura 8: Esquema de produção de ERO no metabolismo de detoxificação em situação de estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Adaptado de Hammond-Kosack e Jones (1996).

Existem dois sistemas enzimáticos que metabolizam o peróxido de hidrogênio; as catalases (CAT) e as peroxidases. As peroxidases agem sobre uma variedade de peróxidos orgânicos, mas a catalase é restrita. A CAT é uma enzima antioxidante localizada nos peroxissomos das células e promove a redução do peróxido de hidrogênio produzido pela atividade da SOD e, fisiologicamente, produzido pelo metabolismo de ácidos graxos (Reação 3) (GIULIO e HINTON, 2008).



As glutathionas peroxidases (GPx) são enzimas antioxidantes capazes de reduzir o peróxido de hidrogênio e também peróxidos lipídicos. A redução do peróxido de hidrogênio envolve a transferência de elétrons promovida pela oxidação da glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSG). Os produtos dessa reação são álcool e água (Reação 4) (ZHANG et al., 2004).



Algumas GST além de possuírem a função de biotransformação possuem atividade peroxidase específicas a peróxidos lipídicos. Existem também, algumas GST que atuam como antioxidantes por conjugar produtos da lipoperoxidação, como o hidroxinonal (GIULIO e HINTON, 2008).

Esse sistema de defesa é fundamental para a vida celular. As enzimas antioxidantes previnem as membranas celulares do ataque das ERO. Porém, quando a produção de ERO é maior que a ativação dessas enzimas de defesa ocorre o estresse oxidativo. O malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação lipídica, é um indicativo da ocorrência de estresse oxidativo (Figura 8).

1.5 Marcadores genotóxicos

Outra ferramenta muito utilizada para se avaliar o nível de contaminação de organismos em um ambiente aquático é pela da análise de lesões no material genético de organismos expostos a algum tipo de contaminação, a genotoxicidade (LEE et al., 2003). Uma das técnicas muito utilizadas para avaliação da genotoxicidade é o ensaio do cometa devido sua capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001).

O ensaio do cometa vem sendo muito utilizado em eritrócitos de peixes, a fim de avaliar a contaminação de corpos hídricos (SOUZA e FONTANETTI, 2007; VENTURA et al.,2008; SIMONIELLO, 2009;). Esse ensaio permite a detecção de diferentes respostas celulares de dano e de reparo do DNA em células eucarióticas de qualquer população. Esse método é capaz de detectar pequenas mudanças, como por exemplo, reparos e a integridade do DNA (MASCHIO, 2009).

A técnica de eletroforese em gel com células únicas (Single Cell Gell Electrophoresis - SCGE), ou ensaio do cometa, foi desenvolvida por Ostling e Johanson em 1984. Neste ensaio, as células são englobadas em gel de agarose, espalhadas sobre uma lâmina de microscopia, lisadas por detergentes e por fim submetidas a uma corrente elétrica, em pH neutro. Esta corrente age como uma força proporcionando o deslocamento dos segmentos de DNA livres, resultantes das lesões, para fora do núcleo em direção ao ânodo.

Atualmente, para realizar a eletroforese usa-se a mesma técnica elaborada por Ostling e Johanson, porém em pH alcalino (Singh et al.,1988) . O pH neutro limita a aplicabilidade do teste, pois somente as duplas quebras de DNA são visualizadas. Em condições mais alcalinas é possível evidenciar também quebras em cadeias simples do DNA, aumentando assim a eficiência do teste (Singh et al.,1988).

Para a quantificação dos cometas, as lâminas são coradas com brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência. Células com núcleos redondos são consideradas normais, porém células que apresentem “cauda” similar a de um cometa formada por fragmentos de DNA são consideradas células lesadas (Figura 9).

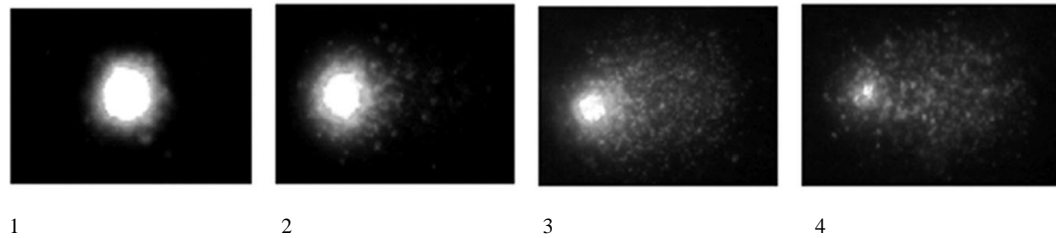


Figura 9: Eritrócitos submetidos ao ensaio do cometa. Em 1, nucleóide saudável sem quebras em fragmentos de DNA. Em 2, 3, e 4 percebe-se o um aumento na quebra e no deslocamento dos fragmentos de DNA gerados em uma situação de contaminação. Adaptado de Matsumoto (2006).

Nas últimas décadas, o ensaio cometa tem sido constantemente realizado como ferramenta básica em diferentes áreas de pesquisa, inclusive em biomonitoramentos ambientais (GONTIJO; TICE, 2003).

1.6 Peixes como organismos sentinelas em estudos de contaminação aquática

Como consequência da atividade antrópica foi observado ao longo dos anos uma modificação das comunidades ecológicas. Essas atividades foram capazes de alterar parâmetros físicos, químicos e/ou biológicos de recursos hídricos, influenciando também na vida dos organismos que ali vivem (CHOVANEC et al., 2003).

Organismos sentinelas, ou bioindicadores são organismos que são usados em ensaios para reproduzir e descrever o ambiente natural, detectando os impactos causados pela atividade antrópica a fim de promover a restauração ou remediação de um ambiente contaminado. Segundo Markert (1994), esses organismos contêm a informação da qualidade de um ambiente.

Peixes são organismos sentinelas intensivamente utilizados em estudos de monitoramento. São muitas as razões que comprovam que peixes são bons bioindicadores. O tamanho do indivíduo e de seus órgãos que viabilizam diferentes procedimentos analíticos, o fato de serem consumidores primários e secundários refletindo as condições tróficas do sistema e o número relativamente pequeno de espécies existentes e já conhecidas são algumas dessas razões (Di GIULIO e HINTON, 2008).

Praguicidas presentes na água podem aderir ao material em suspensão, ser depositados no sedimento ou ser absorvidos pelos organismos. Quando contaminam ambientes aquáticos, organismos que vivem ali, como peixes, podem acumular estes agentes químicos em altas concentrações. Quanto menor a afinidade pela água, maior será a taxa de absorção do praguicida pelos organismos e, maior será o efeito a ele causado (RAND; PETROCELLI, 1985). Assim, por meio de parâmetros biológicos discutidos anteriormente, é possível avaliar o impacto gerado por poluentes como os praguicidas e seus metabólitos em ambientes aquáticos.

Para este estudo o organismo teste escolhido foi o lambari *Astyanax sp.* da família Characidae. Esta espécie é comum em rios e lagoas do Brasil, possui grande adaptabilidade a diferentes habitats e é sensível a mudanças em seu ambiente natural mostrando ser um bom organismo para o uso em estudos de biomonitoramento, apesar de serem praticamente inexistentes estudos ecotoxicológicos nessa espécie.

2 Objetivos

Este estudo teve como principal objetivo avaliar se os metabólitos 3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia (DCPMU), o 3,4-diclorofenilureia (DCPU) e o 3,4-dicloroanilina (DCA) gerados a partir da biotransformação do diuron, geram mais ou menos efeitos que o próprio diuron em parâmetros genotóxicos e bioquímicos em peixes utilizando lambaris (*Astyanax sp.*), a fim de se saber se a degradação do diuron no ambiente diminui o impacto negativo do mesmo para os peixes.

Os objetivos específicos foram:

- Realizar testes de toxicidade em *Astyanax sp.* expostos ao diuron e aos seus três principais metabólitos por um período de 96h para determinar a CL_{50} de cada um deles;
- Avaliar os efeitos do diuron, DCA, DCPMU e DCPU nas enzimas de biotransformação EROD e GST após exposição do lambari por 2 e 7 dias nas concentrações obtidas de CL_1 e CL_{10} do diuron;
- Avaliar o nível de estresse oxidativo por meio da análise das enzimas SOD, CAT e GPx e dos níveis de MDA após exposição dos lambaris ao diuron e aos seus três principais metabólitos por 2 e 7 dias nas concentrações obtidas de CL_1 e CL_{10} do diuron.
- Avaliar os danos genotóxicos causados pelos quatro contaminantes propostos nos eritrócitos dos lambaris após 2 e 7 dias de exposição nas concentrações obtidas de CL_1 e CL_{10} do diuron, por meio na análise do teste do cometa.

3 Material e métodos

3.1 Organismo Teste

Os organismos utilizados neste estudo foram peixes da espécie *Astyanax sp.*, popularmente conhecidos como lambaris (Figura 10).



Figura 10: Espécime de peixe *Astyanax sp.*, conhecido como lambari.

Os peixes foram adquiridos na Piscicultura Stradiotto localizada na cidade de Nova Cardoso, SP. Após o período de aproximadamente um mês de adaptação às condições do laboratório, os lambaris foram aclimatados nos aquários experimentais por sete dias antes de começarem os testes. O peso e tamanho médio dos organismos utilizados nos experimentos de letalidade e de exposição subletal encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Medidas dos lambaris utilizados nos experimentos.

Experimentos	Peso (g)	Tamanho (cm)
toxicidade	6,5±0,4	7,2±0,9
2 dias	6,5±0,2	7,5±0,9
7 dias	6,5±0,3	6,8±1,2

Os lambaris foram alimentados diariamente durante o período de aclimação e foram mantidos a temperatura (22°C) e aeração constantes. Durante os períodos de exposição os peixes não foram alimentados.

3.2 Diuron e metabólitos

Para a realização dos experimentos foram utilizados o Diuron, 3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia (DCPMU), 3,4-diclorofenilureia (DCPU) e o 3,4-dicloroanilina (DCA), comercializados pela Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA.

3.3 Teste de Toxicidade

Após adaptação dos animais as condições do laboratório, os peixes passaram por um período de aclimação nos aquários experimentais durante uma semana. Para cada contaminante foram separados 50 peixes em cinco grupos de 10, sendo que cada um dos grupos foi exposto a uma concentração diferente do composto, seguindo algumas recomendações do protocolo da EPA-821-R-02-012 (Métodos para Medir Toxicidade Aguda de Efluentes e Águas Receptores de Água doce e Organismos Marinhos) (EPA, 2012). Devido à baixa solubilidade em água, os compostos foram diluídos em um solvente orgânico. O diuron e seus metabólitos foram solubilizados em acetona sendo que cada aquário continha 10L de água e recebeu 0,6 mL de acetona. A mesma quantidade de acetona utilizada nos tratamentos foi adicionada aos controles para evitar possíveis diferenças no metabolismo do peixe causadas pela presença da acetona. Inicialmente foi considerado como o maior valor de concentração no teste, a concentração de 1,5 mg/L e as demais concentrações utilizadas foram 75, 50, 25 e 12,5% da maior concentração (respectivamente 1,125, 0,75, 0,375, 0,188 mg/L).

Porém, estas concentrações não causaram mortalidade em nenhum dos grupos. Com isso, o mesmo teste foi repetido dobrando-se a maior concentração, e calculando as demais nas mesmas porcentagens indicadas acima (3,00, 2,25, 1,50, 0,75, 0,38 mg/L). Após quatro dias exatos (96h), foi anotada a mortalidade dos lambaris observada em cada grupo experimental e com base nos dados obtidos e com auxílio do programa *trimmed Spearman Karber* (Phar Lab 386 software, versão 4.1), foram calculados os valores de CL_{50} (concentração necessária para causar mortalidade em 50% da população) de cada composto (COSTA et. al., 2008). No teste com o DCPU os peixes morreram somente após 120 horas.

3.4 Exposição dos peixes ao diuron e seus metabólitos para ensaio do cometa e análises de biomarcadores bioquímicos

A exposição foi feita em aquários de 40 x 24 x 19 cm (~18 litros), mantidos em aeração constante. Devido ao pouco volume de amostra de tecido (fígado e brânquias) possível de se extrair de cada peixe, cada aquário recebeu dois peixes, ou seja, uma amostra nesse projeto é representada pelo pool de dois animais. Assim, cada um dos grupos experimentais foi constituído de cinco aquários (N=5), contendo dois peixes em cada. Após um período de aclimação de duas semanas em tanques do laboratório, os peixes foram colocados nos aquários e receberam os devidos tratamentos com o diuron e seus metabólitos, sem adição de solvente, em duas concentrações ($CL_1= 0,015$ mg/L e $CL_{10}= 0,15$ mg/L). Essas concentrações foram calculadas a partir dos dados dos testes de toxicidade, baseados no valor de CL_{50} do diuron, possibilitando assim, comparações dos efeitos entre os diferentes compostos. Essas baixas concentrações foram utilizadas a fim de se aproximar das concentrações desses compostos encontrados no ambiente. No total, o experimento contou com 18 grupos experimentais (90 peixes), conforme segue:

- Grupo I - controle: sem adição de contaminante, coletado após 2 dias de exposição;
- Grupo II - controle: sem adição de contaminante, coletado após 7 dias de exposição;
- Grupo III: recebeu o tratamento com diuron na concentração 1 e foi coletado após 2 dias de exposição;
- Grupo IV: recebeu o tratamento com diuron na concentração 1 e foi coletado após 7 dias de exposição;
- Grupo V: recebeu o tratamento com diuron na concentração 2 e foi coletado após 2 dias de exposição;
- Grupo VI: recebeu o tratamento com diuron na concentração 2 e foi coletado após 7 dias de exposição;
- Os grupos VII ao X receberam o mesmo tratamento que os grupos III, IV, V e VI, porém com o DCA.
- Os grupos XI ao XIV receberam o mesmo tratamento que os grupos III, IV, V e VI, porém com o DCPMU.
- Os grupos XV ao XVIII receberam o mesmo tratamento que os grupos III, IV, V e VI, porém com o DCPU.

Após esses períodos de exposição, os animais foram coletados, anestesiados por imersão dos peixes em água contendo 2 mL/L de fenoxietanol, pesados e foi retirado o sangue para o ensaio do cometa. Em seguida, foi feito um corte ventral nos animais para a retirada do fígado e das brânquias que foram imediatamente congelados a -80°C para posterior análise (Figura 11).

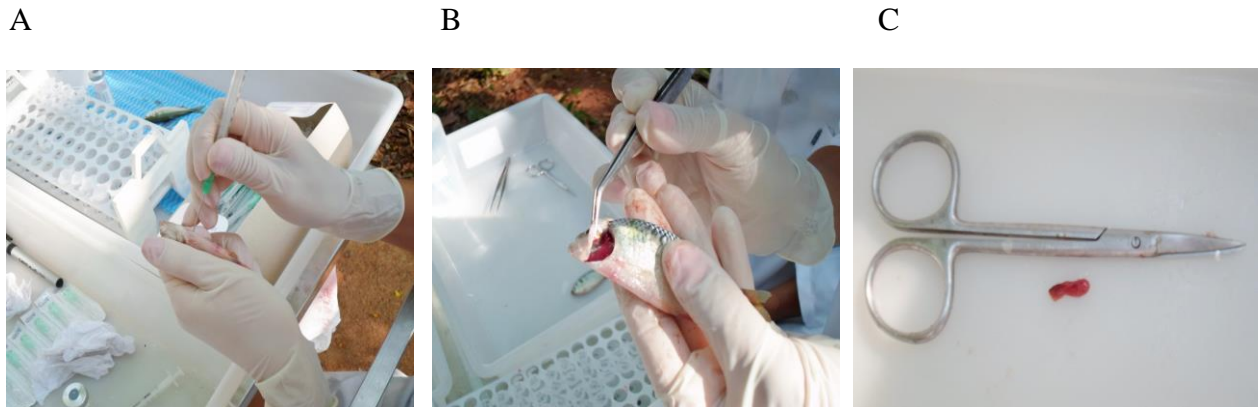


Figura 11: Coleta de sangue e de tecidos dos lambaris após a exposição aos contaminantes diuron, DCA, DCPMU e DCPU. Em **A**, foi retirado sangue dos lambaris por punção cardíaca para posterior ensaio do cometa. Em **B** foram retiradas as brânquias e em **C** fígado para as análises das enzimas de biotransformação e parâmetros de estresse oxidativo.

3.4.1 Descarte de resíduos tóxicos e água contaminada

Após terminados os experimentos, a água contaminada dos aquários passou por um tratamento de filtros de carvão ativado retendo os resíduos tóxicos para assim poder ser adequadamente descartada no ambiente. Todos os resíduos químicos produzidos durante as análises foram devidamente armazenados em recipientes apropriados e encaminhados ao entreposto de resíduos químicos do instituto, para posterior remoção e destinação final adequada.

3.4.2 Ensaio do Cometa

3.4.2.1 Preparação das lâminas

Retirou-se o sangue de um peixe de cada aquário por punção cardíaca com seringas de insulina. Uma amostra de 10 μ L de sangue foi diluída em 1000 μ L de solução fisiológica. Em lâminas previamente gelatinizadas com agarose comum adicionou-se 10 μ L da suspensão celular e 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C. As lâminas permaneceram em 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) na geladeira por uma hora. Após o processo de lise celular, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese. Para as corridas, acrescentou-se solução alcalina (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM – pH 13), por 20 minutos, na ausência de luz. Após o período de relaxamento, as lâminas foram submetidas à eletroforese, por 20 minutos à 25 V e 300 mA. Após a corrida, as lâminas foram neutralizadas com solução Tris 0,4M, por 15 minutos e fixadas em etanol por mais 10 minutos. Após a secagem, as lâminas foram armazenadas na geladeira para posterior análise.

3.4.2.2 Análise das lâminas

Para a análise das lâminas, a coloração foi realizada com brometo de etídio (0,02 mg/mL). Para cada peixe foram feitas duas lâminas e foram analisados 100 nucleóides (50 em cada), com a utilização de microscopia 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 de seus fragmentos, sendo classificados em: classe 0 (sem danos); classe 1 (poucos danos); classe 2 (danos médios) e classe 3 (grandes danos), de acordo com a classificação sugerida por Kobayashi (1995) (Figura 9). Os scores de cada tratamento foram calculados multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3).

3.4.3 Análises bioquímicas

3.4.3.1 Preparo das amostras para a análise das enzimas EROD, GST, CAT, SOD, GPx

Os tecidos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,5 (TRIS-HCl 0,2M; EDTA 1mM; DTT (DL-Ditiotreitol) 1mM; Sacarose 0,5M e KCl 0,15M) a uma proporção 1:4, massa:vol e contendo 0,00523g de inibidor de protease (PMSF) 1M. Posteriormente foram centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos. A porção sobrenadante foi coletada e centrifugada a 50.000 x g por uma hora obtendo assim a fração citosólica e microsomal. O microsoma foi ressuspenso em tampão de Tris-HCl 0,1M; pH 7,5 (TRIS HCl 0,1M; EDTA 1mM; DTT 1mM e KCl 0,1M. As atividades das enzimas GST, SOD, CAT e GPx foram medidas na fração citosólica e na microsomal foi medida a atividade da EROD.

3.4.3.2 Análise da atividade da 7-etoxiresorufina-0-deetilase (EROD)

A atividade da EROD foi medida em leitor de microplacas por método fluorimétrico na fração microsomal dos extratos proteicos. O método consiste na formação de resorufina, que é fluorescente (excitação = 537 nm, emissão = 583 nm), catalisada pela EROD.

Foram adicionados aos poços tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,4, além de solução de 7-etoxiresorufina 335 μ M, NADPH 10 mM e extrato microsomal. A reação foi observada por 5 min, a 30°C. Os resultados estão expressos em pmol/min/mg de proteína.

3.4.3.3 Análise da atividade da Glutathione-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada pelo método de Keen, Habig e Jakoby (1976), adaptado para leitor de microplacas. A amostra foi adicionada a um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5, 100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 100 mM de GSH. O aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

3.4.3.4 Análise da atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida pelo método de Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, por meio do decréscimo de absorbância em 240 nm a 30°C. O meio de reação continha H₂O₂ 10 mM, Tris 1 M e EDTA 5 mM, pH 8,0. Os valores de atividade da CAT foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de CAT corresponde à quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de H₂O₂ por minuto, a 30°C em pH 8,0.

3.4.3.5 Análise da atividade da Glutathione peroxidase (GPx)

A análise da GPx foi feita pela técnica de Sies et al. (1979), adaptado para o leitor de microplacas. Baseia-se na medida do decréscimo de absorvância a 340 nm, promovido durante a redução da glutathione oxidada (GSSG). A redução foi catalisada por glutathione redutase (GR) em presença de NADPH a 30°C. O meio de reação continha tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 7,0, NADPH 20 mM, GR 0,1 U/ml e glutathione reduzida 0,1 M. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

3.4.3.6 Análise da Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida pelo método de McCord e Fridovich (1969). Baseia-se em um sistema de geração de superóxido (xantina/xantina oxidase) acoplado à redução do citocromo c pelo radical ânion superóxido, provocando aumento de absorvância em 550 nm a 25°C. A adição da amostra contendo a SOD promove uma inibição na velocidade de redução do citocromo c, uma vez que a SOD compete com o citocromo pelo superóxido gerando peróxido de hidrogênio. O meio de reação continha citocromo c 10 µM, xantina 50 µM, EDTA 0,1 mM, KCN 20 µM e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8. Os resultados foram expressos em unidades de SOD por mg de proteína. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade da enzima que promove 50% de inibição na redução do citocromo c, por minuto, a 25°C em pH 7,8.

3.4.3.7 Análise de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976) em leitor de microplacas.

3.4.4 Níveis de Peroxidação lipídica

Para avaliar os níveis de peroxidação lipídica nos tecidos, foi detectada a presença do produto formado entre o MDA (produto da lipoperoxidação) e o ácido 2-tiobarbitúrico, via HPLC-UV/VIS em 532 nm (ALMEIDA et al., 2003, 2004). Foram homogeneizados 100 mg de tecido em 300 μ L de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Em seguida, 300 μ L de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,4% diluído em HCl 0,2M foram adicionados. As amostras foram incubadas por 40 minutos a 90°C. Depois deste período, as amostras de MDA-TBA foram extraídas com 1,0 mL de n-butanol após centrifugação a 3500 x g por 3 minutos. No HPLC, as amostras de MDA-TBA foram injetadas diretamente (20 μ L) e monitoradas a 532 nm a 40°C. A fase móvel consistiu de solução fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,0 com 40% metanol, bombeada isocriticamente (1 mL/min). A coluna utilizada foi uma C-18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m de diâmetro de poro). A quantificação do MDA foi feita com base em uma curva padrão, injetando-se previamente no HPLC concentrações conhecidas de MDA-TBA. Os dados são expressos em pmol de MDA/mg de tecido.

3.5 Análises estatísticas

Os scores do ensaio do cometa, as atividades enzimáticas e níveis de MDA foram expressos em média, mais ou menos o erro padrão e os grupos foram comparados estatisticamente utilizando o programa Statistica 7.0 e BioEstat .

Foram realizados testes para se verificar a distribuição normal (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Levene) dos dados. No caso de dados paramétricos, os parâmetros entre os diferentes tratamentos e concentrações foram comparados por análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Fisher LSD. No caso de dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas entre os grupos foram aceitas com $p < 0,05$.

4 Resultados e Discussão

4.1 Testes de toxicidade

Com os resultados das mortalidades obtidas nos testes de toxicidade e o tratamento dos dados utilizando o método estatístico *trimmed* Spearman Karber (COSTA et. al., 2008), os valores de CL_{50} de cada composto foram calculados, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Dados de CL_{50} em mg/L obtidos na exposição de lambaris a diferentes concentrações do praguicida diuron e seus principais metabolitos por 96 horas.

Composto	CL_{50} (mg/L)	Intervalo de confiança (min – máx)
Diuron	0,75	0,20 – 2,84
DCA	0,89	0,68 – 1,16
DCPMU	1,42	0,88 – 2,29
DCPU	2.60*	1,90 – 3,56

*Na exposição com o DCPU os peixes morreram somente após 120 horas, e o valor calculado refere-se a esse período de exposição.

Como mostra a Tabela 2, dos quatro compostos testados, o diuron foi o que apresentou o menor valor de CL_{50} (0,75mg/L), ou seja, causou maior toxicidade aos organismos expostos quando comparado com a exposição dos lambaris aos metabólitos. De fato em estudos anteriores realizados com algas (*Dunaliella tertiolecta*) e diatomáceas (*Navicula forcipata*) foram apresentados valores do diuron de CE_{50} menores que a dos metabólitos mostrando também, uma maior toxicidade do praguicida em relação aos metabólitos em exposição aguda (96h) (GATIDOU e THOMAIDIS, 2007).

Entretanto, a exposição ao metabólito DCA apresentou CL_{50} muito próxima a do diuron (0,89mg/L), corroborando a toxicidade já observada em outros estudos com peixes, como o zebrafish e também com microalgas (ENSENBACH et al., 1996; GIRLING et al., 2000; GIACOMAZZI et. al., 2004). O DCA é facilmente bioacumulado nos tecidos de peixes e é considerado um composto altamente tóxico (GIACOMAZZI et. al., 2004). Entretanto, sua capacidade de adsorver no solo e sedimentos reduz sua biodisponibilidade no ambiente e, conseqüentemente, seu impacto ambiental (ENSENBACH et al., 1996;).

Já o DCMPU apresentou menor toxicidade aos lambaris que o diuron e o DCA, visto que o valor de CL_{50} para esse composto (1,42 mg/L) foi o dobro do valor obtido para o diuron (0,75 mg/L). Apesar de ser menos tóxico quando comparado aos outros dois compostos, o DCMPU apresenta relevante toxicidade já que foi capaz de matar 50% dos organismos com a metade da concentração máxima proposta. Em um estudo com misturas, foi observado que a exposição ao diuron e DCA, na presença de DCMPU, apresenta um efeito sinérgico na toxicidade desses compostos a alguns tipos de algas (GATIDOU e THOMAIDIS, 2007).

A exposição dos lambaris ao DCPU por 96h não causou mortandade significativa para calcular a CL_{50} . Porém, após 120h a CL_{50} calculada foi de 2,6 mg/L. Desta forma, o metabólito DCPU é o composto de menor toxicidade a lambaris, pois apresentou valor de CL_{50} três vezes maior que a do diuron e DCA, considerando ainda que esse valor foi obtido apenas depois de 120 h de exposição.

Entretanto, segundo Da Rocha et al. (2013), em estudos com ratos, o DCPU foi encontrado em altas concentrações na urina e gerou maiores alterações na expressão de genes quando comparado a exposição a outros metabólitos, como o DCMPU e DCA.

Mesmo assim, vale ressaltar que, valores de CL_{50} são calculados com base em dados de mortalidade, ou seja, um efeito drástico dos compostos, e até mesmo o DCPU com uma maior CL_{50} apresentou elevada toxicidade aos lambaris. Para fins comparativos, o tebuthiuron, outro

herbicida bastante utilizado no cultivo de cana e considerado perigoso ao ambiente devido sua alta persistência, apresenta valor de CL_{50} em torno de 160 mg/L para goldfish (EXTOXNET, 2014). Sendo assim, pode ser que concentrações menores causem efeitos tóxicos deletérios aos organismos que não são observados a nível macroscópico, porém em longo prazo possam comprometer o status saudável do animal.

Com testes realizados por meio de marcadores genotóxicos celulares e biomarcadores bioquímicos é possível observar esses efeitos tóxicos. O uso dos biomarcadores em ecotoxicologia é de extrema importância para melhor entendermos os efeitos deletérios subletais de cada um dos compostos para os peixes. Neste estudo, os experimentos realizados para averiguar efeitos subletais dos compostos em biomarcadores foram feitos usando concentrações calculadas de acordo com valores de LC_1 e LC_{10} do diuron (0,015 mg/L e 0,15 mg/L, respectivamente), para fins comparativos.

4.2 Ensaio do cometa

Com a análise dos nucleóides pôde-se observar que houve diferença significativa nos scores de todos os tratamentos em relação aos controles, nos dois períodos de exposição (Figura 12).

Estes resultados mostram que o diuron e seus três principais metabólitos foram capazes de provocar aumento no número de lesões ao DNA dos lambaris quando comparados aos organismos não expostos a nenhum dos contaminantes, mostrando serem efetivamente genotóxicos nas condições experimentais testadas.

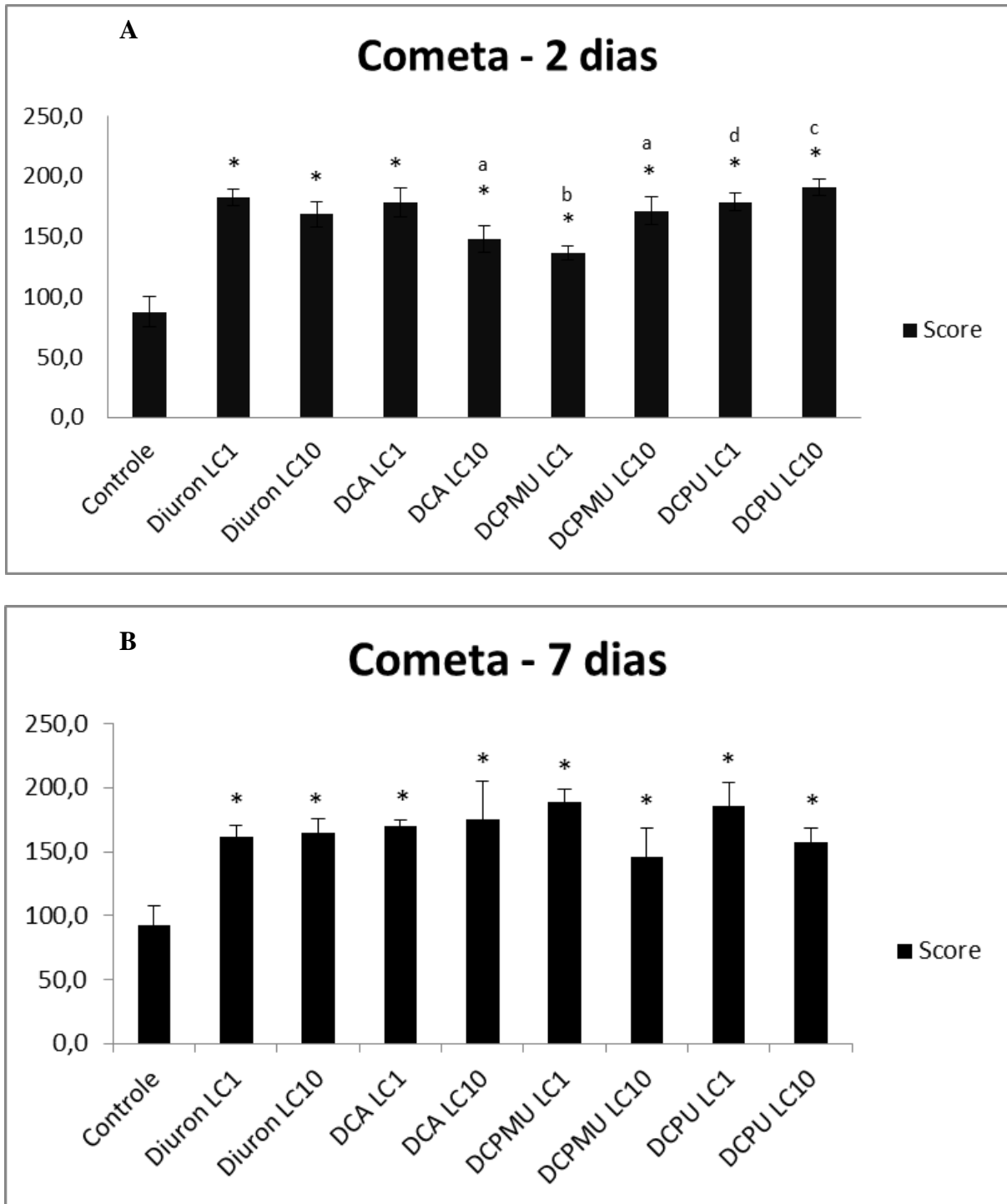


Figura 12: Scores obtidos com o ensaio do cometa em eritrócitos de lambaris após a exposição dos organismos ao diuron e a três dos seus principais metabólitos (DCA, DCPMU e DCPU) em tempos de exposição de dois dias (A) e de sete dias (B). Diferença significativa em A ($p=0,00000014$) e B ($p=0,005269$), onde * mostra diferença significativa dos tratamentos em relação aos respectivos controles; a - diferença significativa entre as diferentes concentrações de um mesmo contaminante; b - diferença significativa em relação ao diuron na mesma concentração; c - Diferença significativa em relação ao DCA na mesma concentração e d - diferença significativa em relação ao DCPMU na mesma concentração.

Em um estudo com *Phoxinus phoxinus* foi realizado uma exposição crônica a uma mistura dos herbicidas diuron e azoxystrobin. A mistura continha 0,5 µg/L de azoxystrobin e 2,0 µg/L de diuron, e com o ensaio do cometa foi observado um aumento significativo nos danos ao DNA em relação ao controle (BONY et al., 2008).

Quando comparados os scores gerados pela exposição aos metabólitos em relação ao diuron por dois dias observou-se que, na exposição dos lambaris ao diuron na menor concentração, houve ocorrência significativamente maior de lesões no DNA dos organismos somente quando comparado ao DCPMU. Pode-se observar também que os scores do metabólito DCPMU, na menor concentração, foram estatisticamente menores quando comparados aos scores do DCPU (Figura 12A). Isto sugere que dos diferentes tratamentos testados o DCPMU é o metabólito de menor efeito genotóxico a lambaris. Porém, a constatação do aumento dos níveis de lesões em todos os tratamentos indica que a degradação do diuron não gera metabólitos sem potencial genotóxico.

Quando comparadas as diferenças significativas entre os scores dos três metabólitos, no período de exposição de dois dias, constatou-se que o tratamento com o DCPU provocou maiores danos no DNA dos organismos em relação à exposição ao DCA, na maior concentração (Figura 12A). Este fato surpreende, pois o metabólito DCPU, de efeitos ainda pouco conhecidos e que se mostrou o menos tóxico nos testes de toxicidade, foi potencialmente mais genotóxico a lambaris que o DCA, metabólito do diuron até então o mais estudado pela sua potencial toxicidade e que foi o mais tóxico dos metabólitos nos testes de toxicidade com os lambaris.

Outra importante diferença nos scores a ser observada são os diferentes efeitos genotóxicos causados aos lambaris pela exposição às diferentes concentrações de um mesmo composto.

Os efeitos causados pela exposição às diferentes concentrações do DCA e do DCPMU foram significativamente diferentes entre elas, sendo que na exposição com o DCA, a menor concentração do metabólito provocou maior ocorrência de cometa (Figura 12A). Este fato mostra que, mesmo em pequenas concentrações, o DCA é potencialmente genotóxico. O menor nível de cometas na maior concentração pode sugerir a ativação mais eficaz de sistemas de reparo de lesões. O contrário aconteceu com o DCPMU, em que os maiores danos ao DNA foram observados na exposição à maior concentração.

Após sete dias, não foi observado diferenças significativas entre os tratamentos com o diuron e seus metabólitos (Figura 12B). Este fato indica um nivelamento nos níveis de lesões possivelmente em função da ativação de enzimas de reparo, ainda que os scores de cometa se mantivessem mais elevados em comparação com o grupo controle. De fato, BONY et al. (2008) observaram que após um mês de exposição à mistura diuron e azoxystrobin, os organismos foram capazes de recuperar a intensidade de cometa a níveis basais indicando que mecanismos de reparo podem ter sido ativados (BONY et al., 2008).

São quase inexistentes estudos envolvendo e comparando a genotoxicidade do diuron e de seus metabólitos em peixes. Em estudos realizados com diferentes organismos como bactérias e dípteros, foi verificado um aumento dos efeitos genotóxicos durante a metabolização do diuron (OSANO et al., 2002), porém sem identificar que metabólitos poderiam estar relacionados a esses efeitos.

Os potenciais efeitos genotóxicos dos três principais metabólitos do diuron em lambaris verificados neste estudo confirmam as constantes especulações acerca da degradação do diuron. A metabolização desse composto gera metabólitos potencialmente tóxicos e genotóxicos capazes de alterar o status saudável de animais aquáticos, fato que os torna compostos relevantes em monitoramentos na ecotoxicologia.

4.3 Enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante

4.3.1 Análise da EROD e GST

A atividade enzimática da EROD em brânquias de lambaris aumentou significativamente em relação ao controle em animais expostos por dois dias ao metabólito DCPMU e por sete dias ao DCPU, maior concentração (Figura 13A). A exposição à maior concentração do metabólito DCA e à maior e menor do DCPU, após sete dias, também aumentou significativamente a atividade da EROD, porém em relação à exposição ao diuron, na mesma concentração (Figura 13A).

Em fígado, após dois dias, a exposição ao diuron e DCPMU, na maior concentração, e ao DCA e DCPU na menor, provocaram um aumento na atividade da EROD quando comparados com o controle (Figura 13B). A atividade da EROD também aumentou significativamente após exposição ao diuron e DCPMU, na maior concentração, em relação ao DCPU. Após sete dias, foi observada uma diminuição na atividade da enzima em relação às exposições por dois dias para todos os contaminantes sugerindo que após sete dias esses compostos são metabolizados em fígado de lambaris.

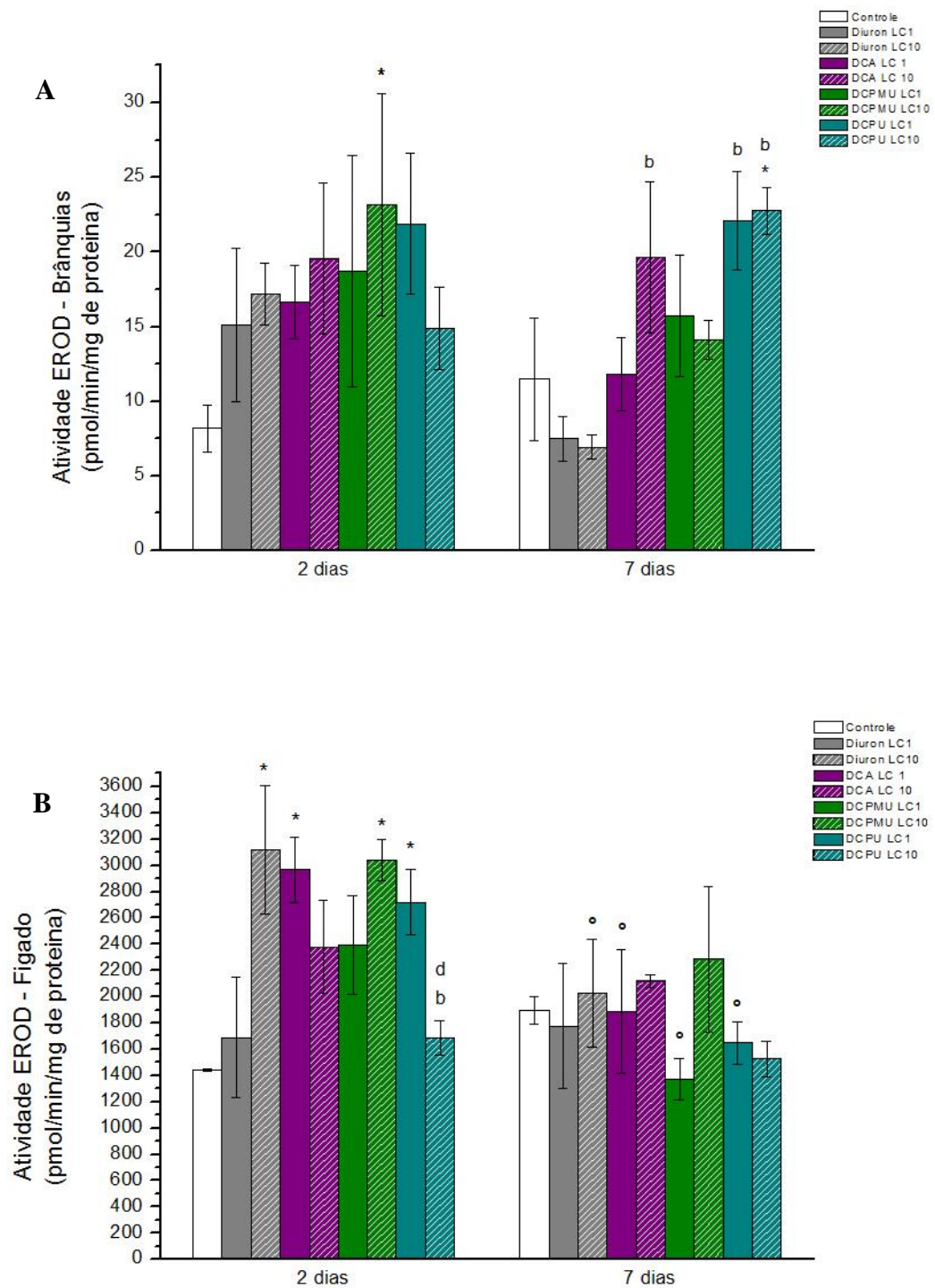


Figura 13: Gráficos da atividade enzimática, em média mais ou menos erro padrão, da 7-etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) em brânquias (**A**) e fígados (**B**) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) ao diuron e três de seus principais metabólitos, DCA, DCPMU e DCPU, a dois períodos de exposição. * Diferença estatística significativa em relação aos respectivos controles. **b** Diferença significativa em relação ao diuron na mesma concentração. **d**. Diferença significativa em relação ao DCPMU na mesma concentração. ^o Diferença significativa entre os diferentes tempos de exposição de um mesmo tratamento.

O mesmo não acontece em brânquias, uma vez que houve um aumento na atividade da EROD pela exposição ao DCA e DCPU após sete dias. Essa diminuição na atividade em fígado após sete dias deve-se ao fato de o fígado ser o principal órgão de biotransformação no metabolismo de detoxificação, e por isso possui maior atividade da EROD em dois dias de exposição (GIULIO e HINTON, 2008).

Há muitos estudos que relatam o aumento da atividade da EROD em resposta a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em peixes (WHYTE et al., 2000; PACHECO; SANTOS, 2001; VAN DER OOST et al., 2003).

Segundo Whyte et al. (2000), a indução da CYP1A ocorre quando os organismos são expostos a HPAs, visto que estes compostos se ligam aos receptores aril-hidrocarbonetos sinalizando para que mais CYP1A seja transcrita. Entretanto, há também estudos que mostram a indução da CYP1A em fígado de ratos após exposições *in vitro* e *in vivo* ao diuron e também outros herbicidas da família uréia, como o propanil e o linuron (TAKEUCHI et al. 2008).

Neste estudo, tanto em brânquias quanto em fígado, em geral, a atividade da EROD aumentou em resposta aos tratamentos, principalmente pelas exposições aos metabólitos. De fato, a exposição ao diuron só provocou um aumento na atividade da enzima em fígado, após dois dias de exposição e na maior concentração enquanto que na exposição aos metabólitos foram observadas respostas em ambos os tecidos, concentrações e tempos de exposição.

Outro estudo com *Anguilla japonica* mostra que a isoforma 1A do citocromo P450 é capaz de metabolizar o diuron e outros tipos de herbicidas (UNO et al., 2011). Os dados do presente trabalho mostram que o diuron foi capaz de aumentar a atividade da proteína em fígado de lambaris e mais que isso, pode-se ainda especular que na medida em que o diuron vai sendo metabolizado são gerados produtos mais capazes de induzir a EROD, tais como o DCA, DCPMU e o DCPU.

Os dados apresentados na Figura 13 confirmam o interesse em avaliar os efeitos gerados por esses metabólitos, até então pouco conhecidos, mas que influenciaram na atividade dessa importante enzima do metabolismo de biotransformação em lambaris nas condições experimentais testadas.

A GST, outra enzima do metabolismo de biotransformação, foi analisada e observou-se que a atividade da enzima, em brânquias e após dois dias de exposição, diminuiu em relação ao controle quando os peixes foram expostos ao DCA e DCPU nas duas concentrações testadas (Figura 14A).

Após sete dias de exposição não foi observada diferença significativa na atividade da enzima nas brânquias (Figura 14A).

Em fígado, após dois dias de exposição a atividade da GST aumentou nos animais expostos à maior concentração do metabólito DCA quando comparados ao grupo controle. Porém, nos tratamentos com o DCPMU por dois dias, e com o DCPU por sete dias, na maior concentração, houve uma significativa diminuição na atividade da enzima em relação ao controle (Figura 14B).

Dados de testes de inibição *in vitro*, realizados em nosso grupo paralelamente a esse estudo, com fígado de tilápias e os três metabólitos do diuron mostram que a diminuição da atividade da GST pela exposição ao DCPMU trata-se de fato de uma inibição da enzima, em relação ao controle, pela exposição a esse composto. Porém, nas incubações com o DCA e DCPU, apesar de existirem, não foram inibições significativas (ANEXO).

Diferenças também foram observadas pela exposição às diferentes concentrações do mesmo composto, como no caso do DCPMU após dois dias de exposição, e DCPU após sete dias, uma vez que a exposição a maior concentração desses metabólitos levou a uma maior diminuição da atividade da GST em fígado (Figura 14B).

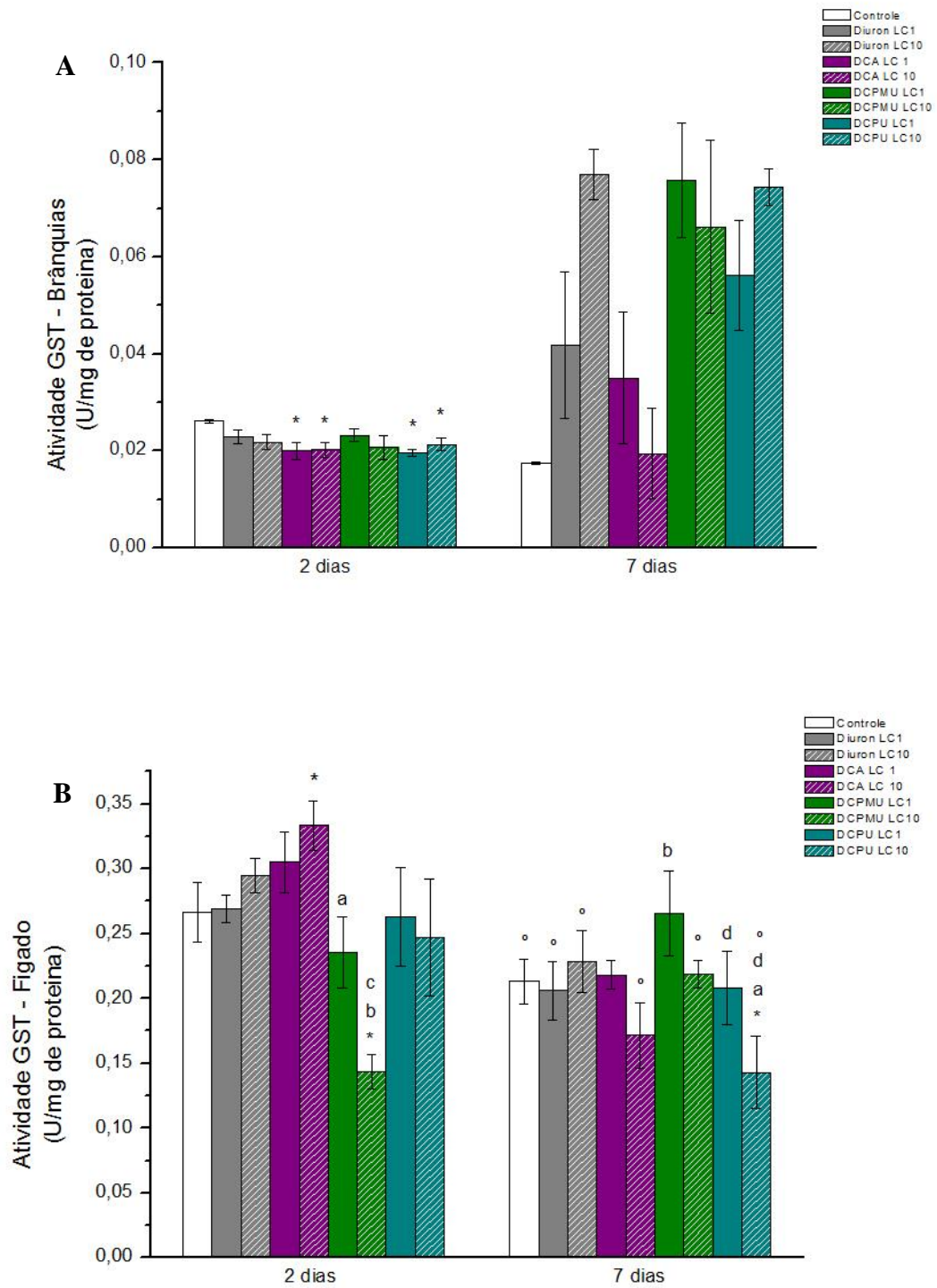


Figura 14: Gráficos da atividade enzimática, em média mais ou menos erro padrão, da glutiona-S-transferase (GST) em brânquias (**A**) e fígados (**B**) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) ao diuron e três de seus principais metabólitos, DCA, DCPMU e DCPU, a dois períodos de exposição. * Diferença estatística significativa em relação aos respectivos controles. **a** Diferença significativa entre as diferentes concentrações de um mesmo contaminante. **b** Diferença significativa em relação ao diuron na mesma concentração. **c** Diferença significativa em relação ao DCA na mesma concentração. **d** Diferença significativa em relação ao DCPMU na mesma concentração. ° Diferença significativa entre os diferentes tempos de exposição de um mesmo tratamento.

Após dois dias, o tratamento com o DCPMU promoveu uma menor atividade enzimática, além do controle, também em relação ao diuron e DCA, na maior concentração. Na exposição com o DCPU, sete dias, ocorreu a diminuição da atividade da GST em relação ao DCPMU, na maior e menor concentração. Essa diferença deve-se a ao aumento significativo da enzima na exposição à menor concentração do DCPMU em relação ao diuron (Figura 14B).

Quando comparados os resultados entre os diferentes tempos de exposição, pode-se observar que, após sete dias, em fígado, houve uma diminuição nos níveis basais da GST para todos os compostos em relação ao período de dois dias (Figura 14B).

A GST, enzima de fase II da biotransformação, catalisa reações de conjugação de compostos tóxicos a ligantes endógenos a fim de facilitar a excreção (VAN DER OOST et al., 2003). Estudos mostram também que algumas isoformas da GST possuem atividade peroxidase e um aumento na atividade dessa enzima pode estar relacionado a uma defesa antioxidante do organismo (ALMEIDA et al., 2005). Desta forma, o aumento na atividade da GST observado na exposição à maior concentração do DCA em fígado pode também indicar uma resposta dos peixes as ERO que foram geradas como consequência da intoxicação pelos compostos.

Tendo em vista que a exposição à menor concentração do DCPMU por sete dias aumentou a atividade da GST, podemos afirmar que esse metabólito foi capaz de ativar o metabolismo de detoxificação no fígado dos lambaris. O fato de que, somente a menor concentração do DCPMU, em relação a maior, provocou um aumento na atividade da enzima, pode ser explicado de forma que, concentrações maiores deste composto possam ter debilitado o metabolismo do organismo afetando a capacidade de induzir a GST.

Por outro lado, a diminuição da atividade da GST após as exposições às duas concentrações do DCA e DCPU, em brânquias por dois dias e ao e DCPU na maior concentração em fígado por sete dias, pode ter ocorrido pela ativação de outras vias de detoxificação dos metabólitos.

Em um estudo com algas *Scenedesmus obliquus* foi observado um aumento na atividade da GST após a exposição ao diuron (GEOFFROY et al., 2002). Porém, em outro estudo foi observado a inibição da GST em brânquias de goldfish expostos a herbicidas organofosforados e carbamatos (WANG et al., 2012). Exposições do *Gambusia yucatana* ao chlorpyrifos, carbofuran e glyphosato também mostraram uma inibição de até 40% na atividade da GST em relação ao controle (RENDÓN-VON OSTENA, et al., 2005).

4.3.2 Análise da SOD, GPx e CAT

A exposição dos lambaris ao DCA, DCPMU e DCPU nas duas concentrações, por dois dias e em brânquias, causou aumento na atividade da SOD em relação ao grupo controle e em relação às respectivas concentrações do diuron (Figura 15A). Após sete dias de exposição, houve um aumento na atividade enzimática do controle e dos tratamentos com o diuron e DCA em relação à exposição de dois dias. Por ter ocorrido esse aumento significativo da atividade da enzima nesses grupos, observamos uma menor atividade da SOD nos grupos expostos ao DCPMU e DCPU após sete dias em relação ao diuron e DCA (Figura 15A).

Em fígado, após dois dias de exposição foi observado um aumento na atividade da enzima nos grupos expostos ao DCPMU e DCPU quando comparados aos tratados com DCA, na maior concentração. Na menor concentração, a exposição ao DCPU causou também um aumento na atividade da SOD em relação ao controle, ao diuron e DCPMU (Figura 15B).

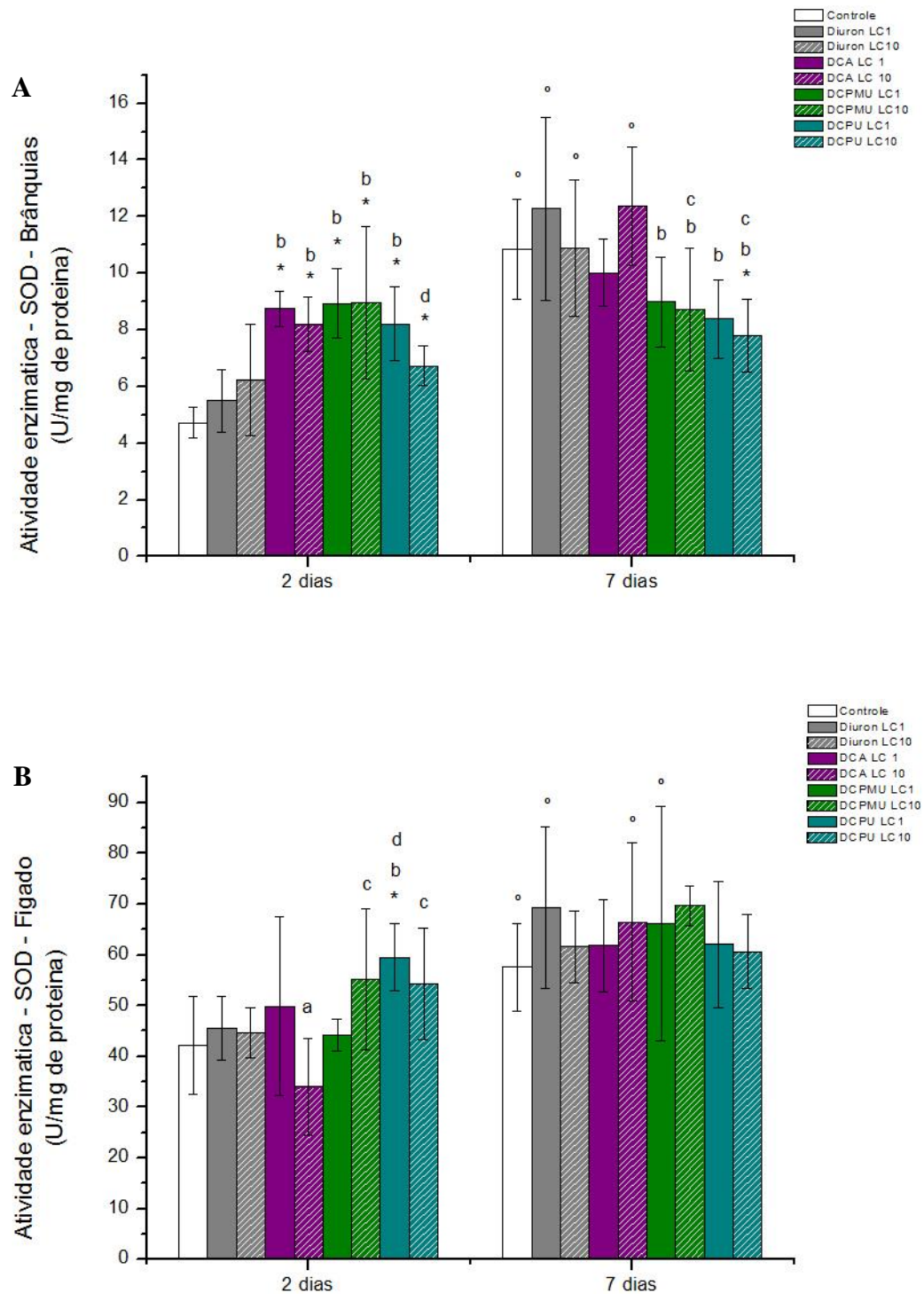


Figura 15: Gráficos da atividade enzimática, em média mais ou menos erro padrão, da glutiona-S-transferase (SOD) em brânquias (**A**) e fígados (**B**) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) ao diuron e três de seus principais metabólitos, DCA, DCPMU e DCPU, a dois períodos de exposição. * Diferença estatística significativa em relação aos respectivos controles. **a** Diferença significativa entre as diferentes concentrações de um mesmo contaminante. **b** Diferença significativa em relação ao diuron na mesma concentração. **c** Diferença significativa em relação ao DCA na mesma concentração. **d** Diferença significativa em relação ao DCPMU na mesma concentração. ° Diferença significativa entre os diferentes tempos de exposição de um mesmo tratamento.

Em fígado, como aconteceu em brânquias, também foi observado um aumento nos níveis basais da SOD após sete dias, em relação a dois dias, nos grupos controle, diuron, DCA e DCPMU (Figura 15B).

Um aumento na atividade enzimática da SOD revela que, radicais superóxidos foram possivelmente gerados no metabolismo de detoxificação de fase I, e combatidos por essa enzima como um mecanismo de defesa do organismo, prevenindo danos nas membranas.

Estudos mostram que a exposição a praguicidas a base de glifosato, como o Roundup, o endosulfan e o etoxasole promovem uma diminuição na atividade das enzimas de defesa oxidante gerando estresse oxidativo em diferentes tecidos de peixes pelo acúmulo de ERO gerada no metabolismo de detoxificação desses compostos (MODESTO e MARTINEZ, 2010; LUSHCHAKA et al., 2009; SLANINOVA et al., 2009).

No presente estudo, as exposições aos três principais metabólitos do diuron foram capazes de aumentar a atividade da SOD. Aliado ao consumo de oxigênio para produção de energia na mitocôndria, radicais superóxido podem ter sido gerados durante o ciclo catalítico da CYP1A promovendo o aumento da enzima antioxidante.

A atividade da GPx foi significativamente maior em brânquias de peixes expostos por dois dias às duas concentrações do DCA e à maior concentração do DCPU em relação ao grupo controle. Tanto a exposição ao DCA quanto ao DCPU, ambos na maior concentração, provocaram um aumento da atividade da GPx quando comparado à exposição ao diuron, após dois dias. Pode-se observar também que, a exposição ao DCPU na maior concentração, provocou um aumento na atividade da GPx em relação ao DCPMU (Figura 16A). A exposição ao DCA aumentou também a atividade da enzima em relação à exposição ao DCPMU, na maior concentração.

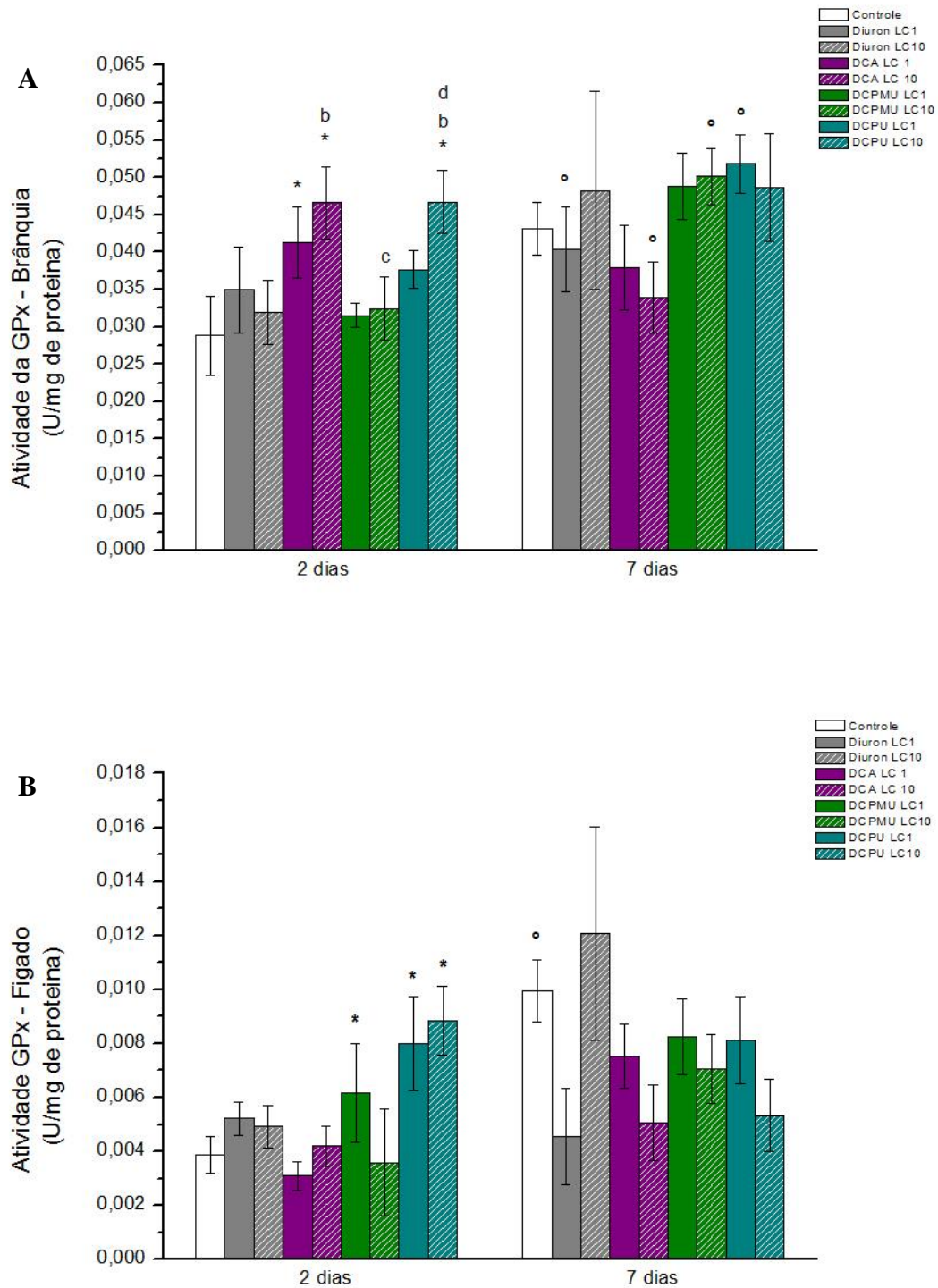


Figura 16: Gráficos da atividade enzimática, em média mais ou menos erro padrão, da glutatona peroxidase (GPx) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) ao diuron e três de seus principais metabólitos, DCA, DCPMU e DCPU, a dois períodos de exposição. * Diferença estatística significativa em relação aos respectivos controles. **b** Diferença significativa em relação ao diuron na mesma concentração. **c** Diferença significativa em relação ao DCA na mesma concentração. **d** Diferença significativa em relação ao DCPMU na mesma concentração. ° Diferença significativa entre os diferentes tempos de exposição de um mesmo tratamento.

Após sete dias, em brânquias foi observado um aumento da atividade da GPx em relação aos tratamentos com o diuron e DCPU, menor concentração, e DCA e DCPMU, maior concentração, pela exposição por dois dias inclusive no grupo controle (Figura 16A). Muito provavelmente, por esse motivo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na exposição por sete dias (Figura 16A).

Em fígado ocorreu um aumento na atividade da GPx, em dois dias de exposição, nos lambaris tratados com DCPMU, menor concentração, e DCPU, na menor e maior concentração (Figura 16B), quando comparados ao grupo controle. Após sete dias, foi observado um aumento na atividade da enzima no grupo controle quando comparado ao mesmo grupo na exposição de dois dias (Figura 16B). Com esse aumento da atividade enzimática no grupo controle, não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos em relação ao controle.

Ao observar o aumento na atividade da GPx em brânquias de lambaris após a exposição ao DCA e DCPU podemos afirmar que espécies pró-oxidantes foram geradas no metabolismo de detoxificação desses compostos ativando assim o sistema de defesa antioxidante do peixe, evidenciado pelo aumento da atividade enzimática da GPx (Figura 16A). O mesmo raciocínio pode ser feito às exposições ao DCPMU e DCPU em fígado, uma vez que a exposição a estes compostos foram capazes de aumentar a atividade da GPx (Figura 16B).

Em estudos com diferentes praguicidas, como atrazina e simazina, foram observados aumento na atividade da GPx em fígado de ratos e *Cyprinus carpio* (SINGH et al, 2011; STARA et al, 2012). Porém, em estudos com roundup foi observado uma diminuição na atividade da GPx, bem como na da SOD (MODESTO e MARTINEZ, 2010).

Em brânquias a exposição ao DCPMU, maior concentração e DCPU, menor concentração, causou uma diminuição na atividade da catalase quando comparados com o grupo controle. Além disso, a exposição ao DCPU na menor concentração causou uma diminuição da atividade da enzima também em relação aos tratamentos com o diuron, DCA e DCPMU e na maior concentração em relação ao diuron (Figura 17A).

Após sete dias de exposição foi observado um aumento da atividade da CAT nos grupos tratados com o diuron, na menor concentração e DCA, na maior concentração, ambos em relação aos mesmos tratamentos na exposição de dois dias. A exposição a maior concentração do DCPMU e menor do DCPU também promoveu um aumento na atividade da enzima em relação à exposição de dois dias (Figura 17A).

Em fígado, após dois dias e na maior concentração, a atividade da CAT diminuiu após a exposição ao diuron em relação a todos os outros tratamentos, inclusive à exposição a menor concentração do diuron. Por sua vez, a exposição ao DCPU, na maior concentração por dois dias, provocou um aumento na atividade da CAT em relação ao grupo controle e a exposição ao DCPMU, na mesma concentração. A exposição à menor concentração do DCPMU e DCPU teve um aumento significativo na atividade da CAT em relação aos grupos tratados com o DCA (Figura 17B).

Após sete dias, com a exposição ao diuron na maior concentração em fígado de lambaris, observamos uma maior atividade da CAT em relação ao mesmo tratamento por dois dias. O mesmo ocorreu com a exposição à menor concentração do DCA. Porém, nas exposições às duas concentrações do DCPU em fígado de lambaris uma menor atividade da enzima foi observada (Figura 17B).

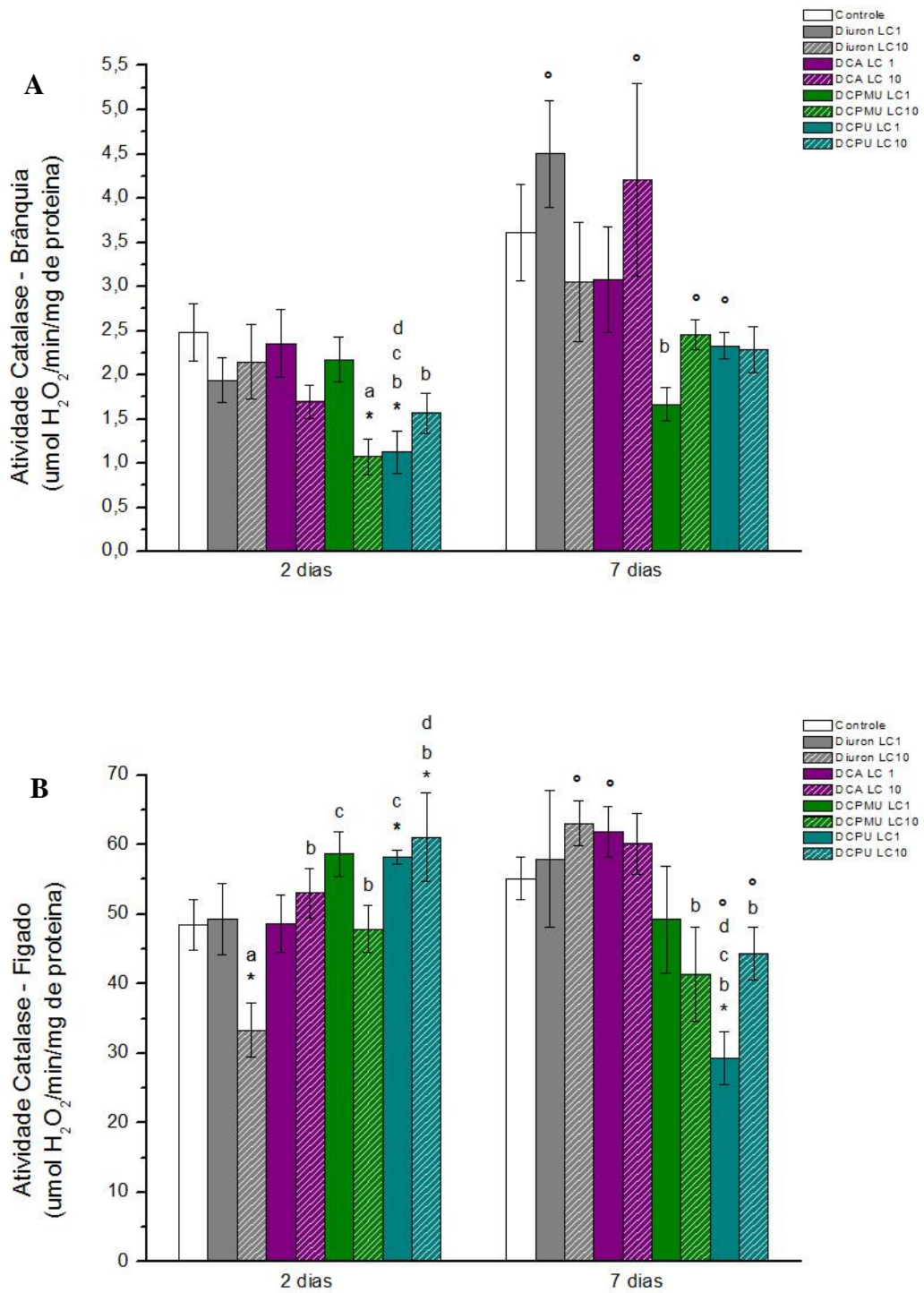


Figura 17: Gráficos da atividade enzimática, em média mais ou menos erro padrão, da catalase (CAT) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) ao diuron e três de seus principais metabólitos, DCA, DCPMU e DCPU, a dois períodos de exposição. * Diferença estatística significativa em relação aos respectivos controles. a Diferença significativa entre as diferentes concentrações de um mesmo contaminante. b Diferença significativa em relação ao diuron na mesma concentração. c Diferença significativa em relação ao DCA na mesma concentração. d Diferença significativa em relação ao DCPMU na mesma concentração. ° Diferença significativa entre os diferentes tempos de exposição de um mesmo tratamento.

Tanto na exposição ao DCPMU e ao DCPU ambos na maior concentração houve uma diminuição da atividade da CAT em relação ao tratamento com o diuron. A atividade da CAT também diminuiu na exposição à menor concentração do DCPU em relação ao grupo controle, ao diuron e aos outros dois metabólitos (Figura 17B). Em testes de inibição *in vitro* foi observado que o diuron é capaz de inibir em mais de 40% a atividade da CAT em fígado de tilápias. O DCPMU também promove cerca de 6% de inibição da atividade da enzima (ANEXO).

Em brânquias, a diminuição na atividade da CAT após a exposição ao DCPU pode estar relacionada com o aumento da GPx. O peróxido de hidrogênio gerado no metabolismo do organismo pode ter sido consumido pela atividade da GPx fazendo com que a atividade da CAT diminuísse significativamente. Já o fato de a atividade da CAT ter diminuído após a exposição ao DCPMU, em brânquias, e ao diuron, em fígado, está relacionada a inibição da enzima por esses compostos, comprovada por dados de inibição *in vitro* (ANEXO).

O aumento da atividade da CAT pela exposição ao DCA, tanto em fígado como em brânquias após sete dias provavelmente ocorreu pelo aumento de peróxido gerado no metabolismo desse composto e, no caso das brânquias, pelo aumento de peróxido de hidrogênio que pode ter sido gerado pelo aumento da SOD ou pela ploriferação de peroxissomos causada pela exposição ao contaminante (CAJARAVILLE et al., 2003).

4.3.3 Peroxidação lipídica

Em brânquias de lambaris foi observada uma diminuição nos níveis de MDA após a exposição por dois dias da maior concentração do DCA em relação ao controle e aos dois outros metabólitos. A exposição ao diuron, na maior concentração, também provocou uma diminuição nos níveis de MDA em relação ao DCPMU e DCPU (Figura 18A).

Após sete dias, em brânquias, ocorreu um aumento de MDA pela exposição ao diuron em relação à exposição de dois dias. O contrário aconteceu com a exposição ao DCPU, uma vez que foi observado a diminuição dos níveis de MDA, nas duas concentrações do composto (Figura 18A).

Já em fígado, a dois dias de exposição à menor concentração do DCA, ocorreu uma diminuição nos níveis de MDA em relação ao controle (Figura 18B). Após sete dias houve uma diminuição do MDA nos grupos controle, todos os tratamentos na maior concentração e o DCPMU e DCPU na menor, em relação à exposição por dois dias dos respectivos tratamentos. A diminuição foi significativa também nos grupos tratados com o DCA, DCPMU e DCPU em relação a exposição com diuron (Figura 18B).

A diminuição dos níveis de MDA após sete dias de exposição pode ter ocorrido pela indução de alguma enzima com potencial de degradação do MDA, mas isso permanece por ser investigado.

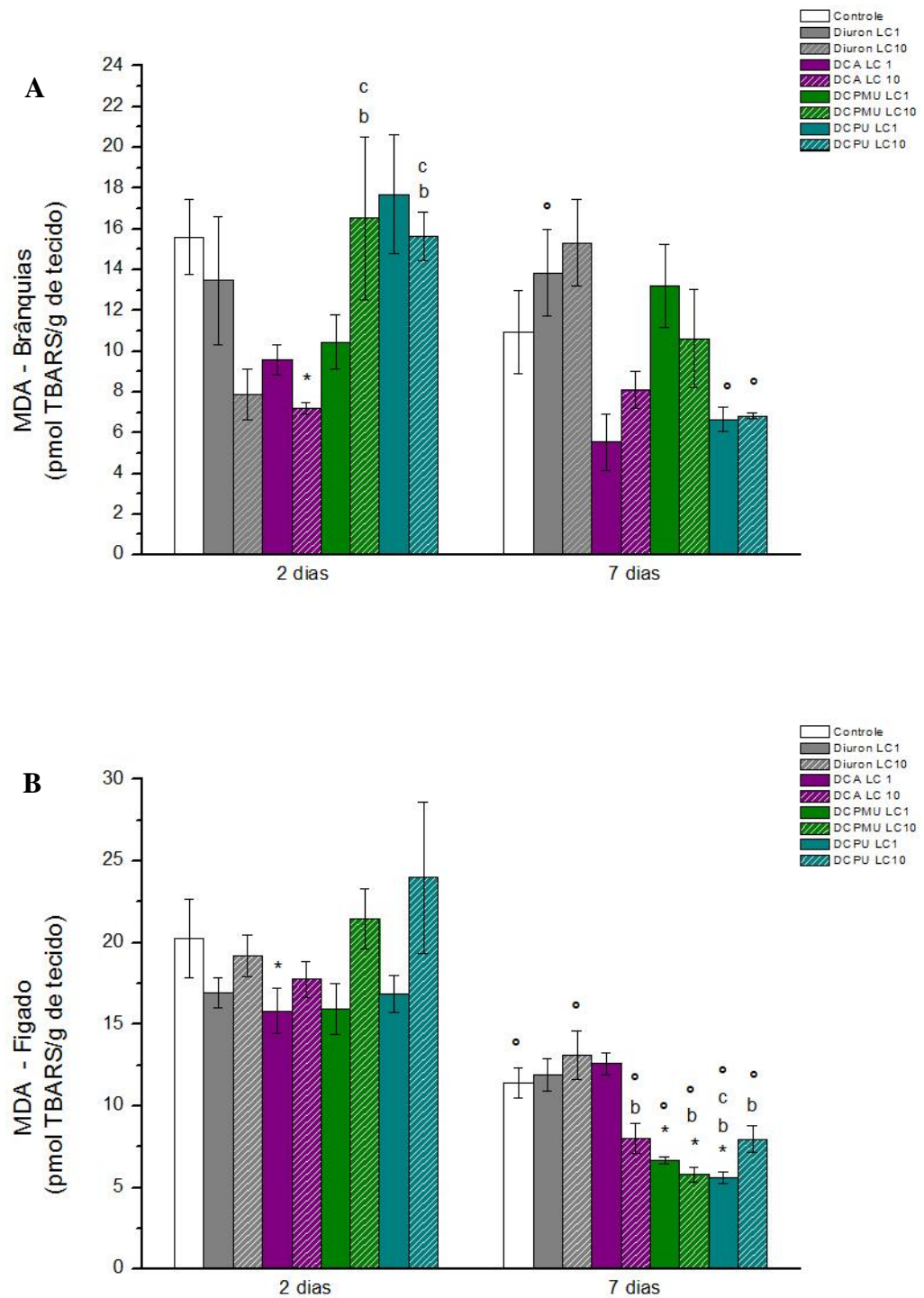


Figura 18: Gráficos dos níveis de peroxidação lipídica (MDA), em média mais ou menos erro padrão, em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) ao diuron e três de seus principais metabólitos, DCA, DCPMU e DCPU, a dois períodos de exposição. * Diferença estatística significativa em relação aos respectivos controles. **a** Diferença significativa entre as diferentes concentrações de um mesmo contaminante. **b** Diferença significativa em relação ao diuron na mesma concentração. **c** Diferença significativa em relação ao DCA na mesma concentração. ° Diferença significativa entre os diferentes tempos de exposição de um mesmo tratamento.

Em brânquias foi observado que a exposição ao DCPU aumentou a atividade da EROD o que pode ter ocasionado um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, fato que pode ser evidenciado também pelo aumento da atividade da SOD e da GPx. Essas espécies reativas, combatidas pelo sistema de defesa antioxidante, não foram capazes de causar a lipoperoxidação das membranas. Um fato curioso a ressaltar foi a diminuição na atividade enzimática da GST e CAT em brânquias de lambaris também expostos ao DCPU. Esse fato nos levou a acreditar que esse composto, de alguma maneira, causasse a inibição dessa enzima. Porém, essa hipótese foi descartada a partir dos resultados com testes de inibição *in vitro* (ANEXO).

Na exposição dos organismos ao DCA também observamos uma diminuição na atividade da GST em brânquias. Porém, espécies reativas foram geradas no metabolismo de biotransformação de fase I, uma vez que houve um aumento na atividade da SOD, da CAT e da GPx. O sistema de defesa antioxidante desses organismos expostos ao DCA foi capaz de combater eficientemente as ERO, o que pode explicar a diminuição significativa da ocorrência da MDA, evitando assim que ocorresse o estresse oxidativo.

A exposição ao DCPMU aumentou a atividade da EROD e, provavelmente, espécies reativas foram geradas no ciclo catalítico da CYP1A que foram eficientemente combatidas pelo sistema de defesa antioxidante. É interessante notar que, o DCPMU é capaz de inibir a atividade da CAT. Desta forma, o peróxido de hidrogênio produzido pelo aumento da atividade da SOD foi combatido pela atividade da GPx.

A exposição ao diuron em brânquias não gerou respostas nas enzimas avaliadas. Porém, em fígado observamos um aumento na atividade da EROD. Embora esse aumento tenha sido significativo, e capaz de causar lesões ao DNA evidenciados no ensaio do cometa, as ERO não causaram peroxidação lipídica nos lambaris evidenciados pela diminuição nos níveis de MDA.

Em fígado, a exposição dos lambaris ao DCA ativou o metabolismo de biotransformação de fase I e II, evidenciado pelo aumento da EROD e da GST. Não foi observada ocorrência de peroxidação lipídica, uma vez que foi observado a diminuição nos níveis de MDA, o que possivelmente foi consequência da ação da enzima antioxidante SOD e catalase.

Na exposição ao DCPMU em fígado foi observado inibição das enzimas GST. Porém, com o aumento da atividade da EROD, possivelmente foram produzidas espécies reativas causando lesões no DNA. Porém, essas ERO, foram combatidas eficientemente pelo aumento da atividade da SOD e GPx evitando assim que ocorresse peroxidação lipídica.

Na exposição ao DCPU em fígado foram observados aumentos significativos na atividade da EROD, SOD, GPx e CAT (2 dias), porém as inibições da GST e CAT (7 dias) pela exposição ao DCPU não foram comprovadas pelos testes *in vitro*, demonstrando que a inibição *in vivo* da enzima se deve, provavelmente, a um declínio metabólico do organismo, e não à interação do composto diretamente com a enzima. De qualquer forma, não foi observado ocorrência de peroxidação lipídica evidenciado pelos baixos níveis de MDA encontrados.

Embora em nenhum dos tratamentos não tenha sido observada ocorrência de peroxidação lipídica, pudemos observar com os dados do ensaio do cometa que danos oxidativos foram gerados ao DNA em todas as exposições ao diuron e metabólitos. As espécies reativas geradas evidenciadas pelo aumento das enzimas de biotransformação causaram lesões no DNA, porém a ativação das defesas antioxidantes minimizaram os danos oxidativos nas membranas.

Efeitos deletérios causados pela exposição ao diuron e DCA já foram relatados em estudos anteriores com diferentes organismos (OSANO, et al., 2002; OKAMURA et al., 2003). Porém não há estudos comparativos publicados relatando os efeitos causados pelo diuron e seus três principais metabólitos DCA, DCPU e DCPMU.

Com nosso estudo pudemos observar que, de maneira geral, os metabólitos do diuron, em concentrações subletais, causam mais respostas nas atividades das enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante que o próprio praguicida. O DCA foi o metabólito potencialmente tóxico que despertou o interesse em investigar essa moderada toxicidade do diuron (GIACOMAZZI et al., 2004). Porém, neste estudo, em termos de estresse oxidativo, os metabólitos DCPMU e DCPU geraram maiores alterações no metabolismo dos peixes.

Ao observar os resultados dos testes de toxicidade, pode-se concluir que o diuron é o composto de maior potencial tóxico aos lambaris e o DCPMU o de menor. Porém, em exposições por sete dias a concentrações subletais, os compostos que causaram maiores alterações nos biomarcadores avaliados em fígado e brânquias de lambaris foram os metabólitos DCPMU e DCPU. Esses resultados com os biomarcadores bioquímicos sugere que esses metabólitos sejam os compostos que promovem maiores respostas biológicas dentre os compostos testados.

De forma geral, pudemos observar também que, em brânquias correram mais respostas das enzimas que em fígado. Apesar de o fígado ser o principal órgão de metabolização de xenobiótico, a brânquia é o primeiro órgão de contato com a água contaminada, absorvendo mais os compostos tóxicos.

Os lambaris mostraram ser bons organismos teste em ensaios como estes, pois foram responsivos a todos os tratamentos e biomarcadores testados. A utilização de lambaris em estudos deste tipo tem a vantagem também de esses peixes serem pequenos, fáceis de manusear, além de ser facilmente adquiridos em pisciculturas e lojas de pesca, além de poderem ser encontrados com grande frequência em ambientes naturais no Brasil.

Tendo em vista todos esses resultados gerados neste trabalho podemos afirmar que, na avaliação da toxicidade de compostos como o diuron não se deve considerar somente sua toxicidade individual, taxa de metabolização ou mineralização no ambiente. A transformação desses compostos em produtos intermediários e os efeitos causados por eles é o que determina o real impacto ambiental de um contaminante (GIACOMAZZI, et al., 2004; GATIDOU e THOMADIS, 2007).

5 Conclusões

Os dados obtidos no presente estudo nos levam a concluir que:

- Os valores de CL_{50} obtidos para o diuron (0,75 mg/L) e o DCA (0,89 mg/L) indicam que a metabolização do diuron na natureza gerando DCA, não faz diminuir de forma significativa a toxicidade do composto, visto que o metabólito gerado apresenta mesma toxicidade. Por outro lado, a metabolização do diuron ao DCPMU e DCPU de fato diminui a toxicidade do composto, considerando que os valores de CL_{50} desses metabólitos foram de duas a três vezes maiores comparando-se aos outros dois compostos.
- A metabolização do diuron não minimiza os efeitos genotóxicos em lambaris uma vez que os metabólitos DCA, DCPMU e DCPU, nas mesmas concentrações e condições testadas, são capazes de causar lesões no DNA dos lambaris.
- A exposição ao diuron e aos metabólitos DCA, DCPMU e DCPU alteram parâmetros bioquímicos indicadores de estresse oxidativo em lambaris nas condições experimentais testadas, porém sem evidenciar peroxidação lipídica, uma vez que não houve aumento do MDA.
- Ainda que o Diuron e DCA sejam mais tóxicos ao lambari em comparação com o DCPU e DCPMU, a exposição aos metabólitos gerou mais alterações nos biomarcadores testados nos peixes quando comparada a exposição ao diuron. Assim, é importante monitorar a presença desses metabólitos no ambiente e as respostas biológicas geradas por essa exposição em ambientes aquáticos próximos aos locais em que o diuron foi aplicado.

Referências Bibliográficas

ABD-ALLAH G. A. et al. A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the comet assay, *Mutat. Res*, v. 446, p. 181–188, 1999.

ALMEIDA, E. A.; RIBEIRO, C. A. O. *Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems*. Taylor & Francis group, 2014. Cap. 5.

ALMEIDA, E. A. et al. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 135C, n. 3, p. 295–303, 2003.

ALMEIDA, E. A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 318, 21–30, 2005.

ALMEIDA, E. A. et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Mar Pollut Bull*, v. 49, n. 5-6, p. 386–92, 2004.

BEUTLER, E. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. New York: Grune & Stratton, 1975.

BONY, S. et al. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. *Aquatic Toxicology*, v. 89, p. 197–203, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248–54, 1976.

CAJARAVILLE, M. et al. Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microscopy Research and Technique*, v. 61, p. 191–202, 2003.

CALL, D. J. et al. Bromacil and Diuron Herbicides: Toxicity, Uptake, and Elimination in Freshwater Fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, v. 16, p. 607-613, 1987.

CHOVANEC, A. et al. Chapter 18 Fish as bioindicators. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, v. 6, p. 639–676, 2003.

CLEMENTS, C. et al. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay, *Environ. Mol. Mutagen*, v. 29 p. 277–288, 1997.

CONSTANTINI, D. Redox physiology in animal function: The struggle of living in an oxidant environment. *Current Zoology*, v56, p. 687-702, 2010.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quimica Nova*, v. 5, n. 7, p1820-1830, 2008.

Da ROCHA, M. S. et al. Diuron metabolites and urothelial cytotoxicity: in vivo, in vitro and molecular approaches. *Toxicol*, 314(2-3), p. 238-246, 2013.

DEVENTER, K. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis, *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, v. 56, p. 911–918, 1996.

Di GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. *The Toxicology of fish*. Taylor & Francis Group, 2008. cap 4.

EMBRAPA. Cana-de-açúcar: Impactos ecológicos. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT1.html>> Acesso em: 10/01/2014.

ENSENBACH, U. et al. Kinetics of 3,4-dichloroaniline in several fish species exposed to different types of water. *Chemosphere*, v. 32, p. 1643–1654. 1996.

EPA. Environmental Protection Agency. Disponível em: <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/disk2_index.cfm> Acesso em 20/03/2012.

EXTOXNET. Extension Toxicology Network. Diuron. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/diuron.htm>> Acesso em 23/10/2012.

EXTOXNET. Extension Toxicology Network. Tebuthiuron. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/tebuthiu.htm>> Acesso em 12/01/2014.

GATIDOU, G., THOMAIDIS, N. S. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquatic Toxicology*, v. 85, p. 184–191, 2007.

GEOFFROY, L. et al. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 72, p. 178–185, 2002.

GESTEL, C. A. M.; BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicol.*, v. 5, n. 4, p. 217–225, 1996.

GIACOMAZZI, N.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere*, v. 56, p. 1021-1032, 2004.

GIRLING, A. E. et al. Derivation of predicted no-effect concentrations for lindane, 3,4-dichloroaniline, atrazine, and copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 46, p. 148–162, 2000.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. et al. Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB. São Paulo, 1990.

GUIMARÃES, G. L.. Impactos Ecológicos do Uso de Herbicidas ao Meio Ambiente. 1987. Série Técnica IPEF, Piracicaba, v.4, n.12, p.159 Instituto de Economia agrícola (IEA), 2007. Defensivos agrícolas: expectativa de aumento da demanda em 2007. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br/upload/IEAexpectativaaumentodemandadoc.doc>>. Acesso em: 07/08/2011.

HAINZL, D.; COLE L. M.; CASIDA, J. E. Mechanisms for Selective Toxicity of Fipronil Insecticide and Its Sulfone Metabolite and Desulfinyl Photoproduct. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 11, p. 1529–1535, 1998.

HAMMOND-KOSACK, K.E; JONES, J.D. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The plant cell*, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

HODGSON, E. Em *A Textbook of Modern Toxicology.*, 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. cap. 1.

IBAMA. Agrotóxicos: Avaliação ambiental. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/avaliacao-do-potencial-de-periculosidade-ambiental-ppa/tudo>> Acesso em 04/02/14.

HODGSON, E.; SMART, R. C. *Introductions to Biochemical Toxicology.* 3rd ed., New York: John Wiley & Sons, 2001. cap. 1.

KAMMAN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 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, 1976.

KOBAYASHI, H. et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.*, v. 3, p.103-115, 1995.

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

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

LUSHCHAKA, O. V. et al. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, v. 76, p. 932-37, 2009.

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. 2008. 194f. Dissertação de Pós Graduação para a obtenção do título de doutor em Genética - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto.

MARKERT, B. Biomonitoring - Quo vadis. *UWSF-Z. Umweltchem. Okotox*, v. 6 (3), p. 145-149, 1994.

MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. Biological markers of environmental. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 3-16, 1990.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, v. 244, n. 22, p. 6049–55, 1969.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>> Acesso em 02/12/2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Agronegócio Brasileiro: Uma Oportunidade de Investimentos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/anuario_cana.pdf> Acesso em: 18/06/2013.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, v. 78, p. 294–299, 2010.

MUSUMECI, M.P. et al. Degradação do diuron-14C em solo e em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.30, p.775-778, 1995.

NITSCHKE, L.; SCHÜSSLER, W. Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants. *Chemosphere*, v.36, p.35-41, 1998.

NOGUEIRA, L. Estudo comparativo do estresse oxidativo entre tilápias (*Oreochromis niloticus*) e cascudos (*Pterygoplichthys anisitsi*) expostos a óleo diesel. 2008. 52f. Trabalho de conclusão de curso para o grau de Bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto.

NOGUEIRA, L.; SANCHES, A. L. M.; GRÜNIG, D.; FERRIZI, V. C.; MOREIRA, A. B. ALMEIDA, E. A. Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere*, v. 85, p. 97-105, 2011.

NORTOX - FISPQ. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. Disponível em: <http://www.nortox.com.br/imagens/produtos/diuron_fispq.pdf> Acesso em 15/05/2013.

OKAMURA, H.; AOYAMA, I.; ONO, Y.; NISHIDA, T. Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Mar. Poll. Bull*, v. 47, p. 59-67, 2003.

OSANO, O. et al. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut*, 119, 195-202, 2002.

OTURAN, N. et al. Study of the toxicity of diuron and its metabolites formed in aqueous medium during application of the electrochemical advanced oxidation process “electro-Fenton”. *Chemosphere*, v. 73, p. 1550–1556, 2008.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf.*, v. 49, n. 1, p. 64–75, 2001.

PANDRANGI, R. et al. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp, *Environ. Mol. Mutagen*, v. 26, p. 345–356, 1996.

PETROBRÁS. Energia e Tecnologia. Biocombustível. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/pt/energia-e-tecnologia/fontes-de-energia/biocombustiveis/>> Acesso em 02/01/2014.

RAND E PETROCELLI, S. R. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and applications*. Washington USA, Hemisph. Publ., 666p, 1985.

Da ROCHA, M. S. et al. Diuron metabolites and urothelial cytotoxicity: In vivo, in vitro and molecular approaches. *Toxicology*, v. 314, p. 238– 246, 2013.

RENDÓN-VON OSTENA, J. et al. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere*, v. 58, p. 627–636, 2005.

RODRIGUES, A. C. F. Estudo de variações bioquímicas e morfológicas induzidas por pesticidas organofosforado e carbamato em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e cascudo (*Pterygoplichthys anisitsi*), como biomarcadores de contaminação ambiental. 2009. 109f. Dissertação de Pós-Graduação para a obtenção de título de mestre em Biologia Animal, área de concentração em Biologia Estrutural – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto.

RONCO, A. et al. Em *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*; Morales, G. C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, cap. 1, 2004

TAKEUCHI, S. et al. In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. *Chemosphere*, v. 74, p. 155–16, 2008.

SALVESTRINI, S.; DI CERBO, P.; CAPASSO, S. Kinetics of the chemical degradation of diuron. *Chemosphere*, v. 48, p69-73, 2002.

SCHLENK D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments, *Mar Pollut Bull*, v. 39, p. 48-53, 1996.

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*, 1999.

SCHLENK, D. et al. Toxicity of Fipronil and Its Degradation Products to *Procambarus sp.*: Field and Laboratory Studies. *Environ Contam and Toxicol*, v. 41, p. 325–332, 2001.

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

SIMONIELLO, M. F. Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bull Environ Contam Toxicol*, v. 83, p. 155–158, 2009.

SINGH, M. et al. Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 63, p. 269–276, 2011.

SLANINOVA, A. et al. A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuro endocrinology letter*, v. 30, p 2-12, 2009.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. 4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás-PDPETRO, Campinas, p. 1-10, 2007.

STARA, A. et al. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 33, p 334–343, 2012.

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology*, v.20, n. 11, p. 2482–2486, 2001.

UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Etanol de cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-area-ibge.php>> Acesso em: 01/03/2013.

UNO T. et al. Metabolism of the herbicides chlorotoluron, diuron, linuron, simazine, and atrazine by CYP1A9 and CYP1C1 from Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101, 93-102, 2011.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VEIGA, M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2006.

ZHANG, J. F. et al. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 58, n. 1, p. 110–6, 2004.

WANG, C. et al. Responses of AChE and GST activities to insecticide coexposure in *Carassius auratus*. *Environ Toxicol*, v. 27(1), p. 50-7, 2012.

WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol*, v. 30, n. 4, p. 347–570, 2000.

Anexo

Foram realizados testes *in vitro* para avaliar se o diuron e seus metabólitos DCA, DCPMU e DCPU são capazes de inibir as enzimas glutationa-S-transferase e a catalase. Para isso, homogenato de fígado foi incubado na presença do praguicida e de seus metabólitos separadamente, em cinco concentrações diferentes. A maior concentração utilizada foi de 1mM de cada composto e os dados estão apresentados na tabela abaixo. Os resultados estão expressos em porcentagem de inibição em relação aos controles e para a análise estatística dos dados foi aplicado o teste t. Foram consideradas diferenças significativas entre os grupos com um $p \leq 0,05$. São dados ainda não publicados gerados por testes realizados por uma aluna de iniciação científica do grupo.

Tratamento (1mM)	Inibição enzimática (%)	
	GST	CAT
Controle	-	100±17,65
Diuron		58,72± 21,01*(p=0,003)
Controle	100±14,05	-
DCA	99,14±16,54	
Controle	100±12,70	100±4,42
DCPMU	80,26±16,62*(p=0,051)	94,20±0,92*(p=0,011)
Controle	100±14,73	-
DCPU	90,27±29,29	