Universidade Estadual Paulista
Câmpus São José do Rio Preto

Aline Cristina Ferreira Rodrigues

Estudo de variações bioquímicas e genotoxicidade induzidas por mistura de contaminantes em tilápia (*Oreochromis niloticus*), como biomarcadores de contaminação ambiental.

Tese apresentada para obtenção
do título de Doutor em Genética

Fevereiro de 2014

Universidade Estadual Paulista
Câmpus São José do Rio Preto

Aline Cristina Ferreira Rodrigues

Estudo de variações bioquímicas e genotoxicidade induzidas por mistura de contaminantes em tilápia (*Oreochromis niloticus*), como biomarcadores de contaminação ambiental.

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus São José do Rio Preto.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

Fevereiro de 2014

Rodrigues, Aline Cristina Ferreira.
Estudo de variações bioquímicas e genotoxicidade induzidas por mistura de contaminantes em tilápia (Oreochromis niloticus), como biomarcadores de contaminação ambiental / Aline Cristina Ferreira Rodrigues. -- São José do Rio Preto, 2014
124 f. : il., gráfs.

Orientador: Eduardo Alves de Almeida
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia aquática. 2. Toxicologia ambiental - Tietê, Rio (SP) 3. Toxicologia genética. 4. Tilápia (Peixe) - Efeito da poluição da água. I. Almeida, Eduardo Alves de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.4

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

Aline Cristina Ferreira Rodrigues

Estudo de variações bioquímicas e genotoxicidade induzidas por mistura de contaminantes em tilápia (*Oreochromis niloticus*), como biomarcadores de contaminação ambiental.

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

BANCA EXAMINADORA:

_____

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
Doutor em Bioquímica
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

_____

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira
Doutor em Oceanografia
UNIFESP – Baixada Santista

_____

Prof. Dr. Claudinei da Cruz
Doutor em Aquicultura
Unifeb – Barretos

_____

Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima
Doutor em Química
UNESP – São José do Rio Preto

_____

Dr. Marcelo Campos
Doutor em Biologia Molecular
UNESP – São José do Rio Preto

_____

São José do Rio Preto, 26 de fevereiro de 2014

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática (LABCA) do departamento de Química e Ciências Ambientais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP – Campus São José do Rio Preto, em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA / Meio Ambiente – Jaguariúna / SP, no laboratório de Ecotoxicologia aquática (LEA), com auxílio financeiro da FAPESP (2009/18486-1).

Dedico:

Aos meus pais Mírian e Durval, meu porto seguro.

Ao meu irmão Leandro, meu refúgio.

Ao Théo, meu companheirinho.

Ao meu querido avô Durval, a estrelinha que se acendeu.

Meus agradecimentos

Em especial ao meu orientador, o prof. Eduardo, que me ofereceu a oportunidade de fazer minha pós-graduação e assim amadurecer principalmente como pessoa. Foram muitos os ensinamentos... . Aprendi que paciência é uma virtude, que a gente pode dormir com ideias e deve acordar com atitudes, e que é possível sim ser bem sucedido profissionalmente e afetivamente, pois ele é um exemplo de professor e orientador a ser seguido e tem uma linda família. Muito obrigada!

À equipe da EMBRAPA – Jaguariúna/SP:

À Drª. Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto, onde realizei os experimentos. Ela me ajudou muito na montagem e manutenção experimental, mas principalmente, discutia a metodologia do trabalho comigo. Também muito acolhedora, esteve sempre muito preocupada se eu estava bem instalada em Jaguariúna.

Ao Dr. Alfredo José Barreto Luís, pelas nossas longas conversas durante as tardes... . Com sua paciência e gentileza, ele me ensinou a engatinhar no mundo da estatística.

À equipe do LEA, que me ajudou na coleta do material biológico e suporte técnico. Luciene, Marisa, Gino, Marcos, Fernanda e Júlio F. de Queiroz.

À Dagmar Nunes dos Santos Oliveira e Melissa Baccan do Laboratório de Ecologia Química, pelo suporte técnico e acolhimento.

À minha querida amiga Isabela Gertrudes Batalhão, pelo companheirismo e carinho e conselhos nos momentos de estresse e desabafo no laboratório. Torço pelo seu sucesso!

Ao meu amigo doutorando Danilo Grunig Humberto da Silva, o "estatístico" do laboratório, que muitas vezes que ajudou a discutir meus dados e também me socorreu com seus conhecimentos em informática.

Ao meu casal de amigos, Dr. Thiago Yukio Kikuchi Oliveira, companheiro de graduação e a Drª. Lilian Nogueira, companheira de pós-graduação, que calcularam o IBR do meu trabalho, lá de longe, em Nova York. São 10 anos de amizade...

Ao meu amigo estatístico Maurílio José Barbosa Soares, pelo auxílio e carinho, discutindo os dados comigo até altas horas por telefone. São 13 anos de amizade...

À Déia, minha querida amiga que está longe (Riverside, EUA)... , à Bel e a Lê, minhas companheiras de laboratório, que se dispuseram a ir até Araçatuba me ajudar no experimento de monitoramento.

Em especial à Cintya, nossa técnica, sempre disposta a ajudar, foi sozinha no segundo experimento até Araçatuba. Além disso, nunca "me deixou na mão" no laboratório, sempre que precisei. Torço por você!

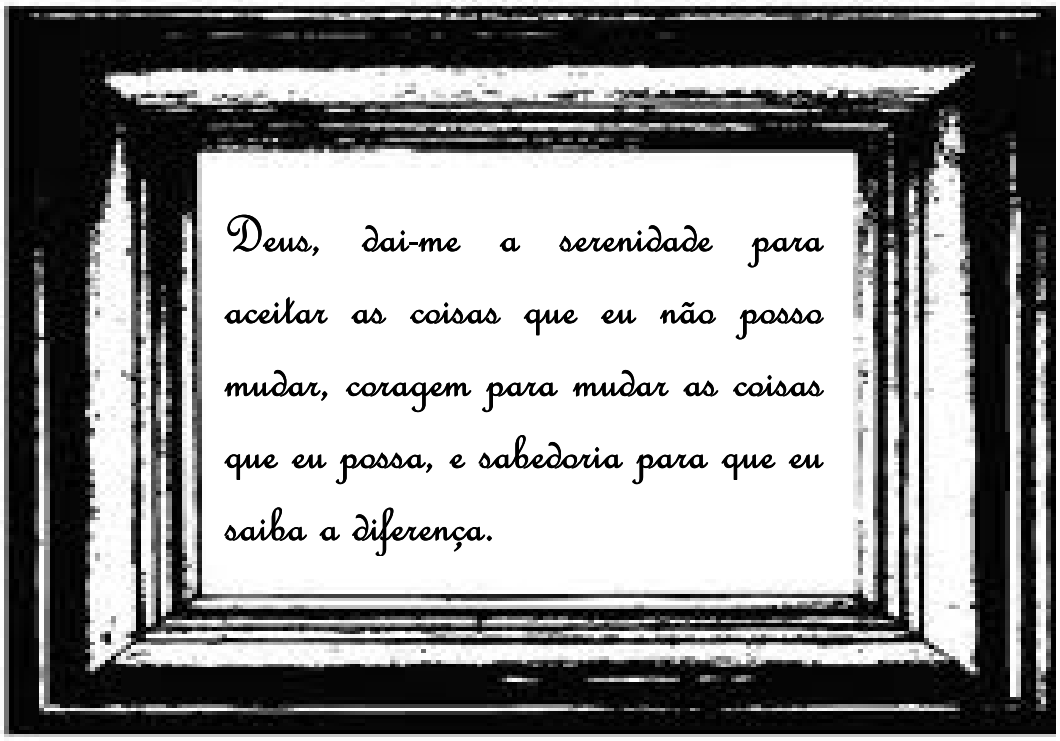
A todos os membros do LABCA, que tornam nosso ambiente de trabalho divertido, respeitoso e generoso.

Ao prof. Dr. Marcus Alexandre Mendes Luz, meu orientador na iniciação científica, que me ensinou os primeiros passos na pesquisa científica.

Às minhas queridas tias professoras, Magda Regina Thereza e madrinha, Maria Luiza Tereza Miyamoto, que acreditaram em mim, me incentivando sempre. Amo vocês!

"Cada dia a natureza produz o suficiente para nossa carência. Se cada um tomasse o que lhe fosse necessário, não havia pobreza no mundo e ninguém morreria de fome".

Mahatma Gandhi


Deus, dai-me a serenidade para aceitar as coisas que eu não posso mudar, coragem para mudar as coisas que eu possa, e sabedoria para que eu saiba a diferença.

RESUMO

A qualidade da água é de fundamental relevância no contexto ecotoxicológico, pois o os ambientes aquáticos são os principais destinos de milhares de compostos químicos de uso cotidiano, que podem atuar como potenciais deturpadores desses ecossistemas. Nesse contexto se destacam os agrotóxicos, como os organofosforados (OP) e piretróides (PI), os desreguladores endócrinos como o 17β-estradiol (E2) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) como o benzo(a)pireno (BaP). Estudos que avaliam respostas metabólicas em organismos submetidos a diferentes classes de contaminantes são de extrema valia na tentativa de elucidar os efeitos da toxicidade de misturas, conhecido por efeito *cocktail*. O objetivo central desse trabalho foi avaliar em tilápia (*Oreochromis niloticus*) os efeitos de misturas de BaP, do E2, e dos agrotóxicos diazinon (OP) e cipermetrina (PI) em biomarcadores de destoxificação, estresse oxidativo, atividade de esterases e potencial genotóxico. Outro objetivo foi monitorar a qualidade da água do rio Tietê que percorre o município de Araçatuba - SP, região de intensa atividade sulcroalcooleira e de condomínios náuticos, para fins de diagnóstico ambiental. Foram usadas as concentrações de 10 $\mu g.L^{-1}$ de BaP; 220 $\mu g.L^{-1}$ de OP; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de PI; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de E2 (mistura em baixa concentração); 100 $\mu g.L^{-1}$ BaP, 500 $mg.L^{-1}$ de OP; 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de PI; 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de E2 (mistura em alta concentração) e 100 $\mu g.L^{-1}$ de BaP; 500 $\mu g.L^{-1}$ de OP; 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de PI; 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17 E2. Foram realizadas exposições aos quatro contaminantes por 5 dias; pré-exposição ao BaP por 3 dias seguida de exposição ao E2 por 5 dias; pré-exposição ao E2 seguida de exposição ao BaP por 5 dias; e pré-exposição ao BaP e ao E2, individualmente, por 3 dias, seguido de exposição aos agrotóxicos, individualmente e misturados, por mais 5 dias. Foram analisadas a atividade da glutationa *S*-transferase e carboxilesterase e níveis de malondialdeído e glutationa reduzida no fígado e nas brânquias dos peixes, atividade da EROD, BROD e PROD no fígado e atividade da acetilcolinesterase no encéfalo. O teste do micronúcleo foi realizado no sangue. No estudo de monitoramento ambiental, na estação seca e chuvosa, foi coletada água no rio Tietê, em quatro diferentes pontos e colocadas em aquários e oxigenados, as tilápias foram mantidas por 3 dias. As concentrações 100 $\mu g.L^{-1}$ de BaP, 500 $mg.L^{-1}$ de OP; 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de PI; 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de E2 causaram mais efeitos nas tilápias isoladamente e em misturas. A pré-exposição ao BaP seguida da exposição ao E2 causou mais respostas nas tilápias do que a associação inversa ocorrendo indução da EROD e BROD e GST e variações na atividade da CbE e níveis de GSH. No experimento de pré-exposição ao BaP e ao E2 e posterior exposição aos agrotóxicos individualmente e misturados, o IBR mostrou que no fígado a pré-exposição ao E2 seguida da exposição a cipermetrina causou mais efeitos e na brânquia foi a pré-exposição ao BaP seguida da exposição a cipermetrina. No monitoramento no rio Tietê foi diagnosticada indução da BROD e PROD, estresse oxidativo e diminuição das esterases, nas áreas sob influência antrópica. A associação da cipermetrina com o BaP teve efeito mutagênico nos eritrócitos. As tilápias podem respoder diferentemente quando expostas ao contaminante isolado e a ele associado a outro(s) contaminante(s). No rio Tietê, na estação chuvosa e na área de condomínio náutico, com atividades de pesca e lazer, observaram-se mais efeitos nas tilápias.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Mistura de contaminantes. *Oreochromis niloticus*. Genotoxicidade. Rio Tietê.

ABSTRACT

Water quality is of fundamental importance in ecotoxicological context because the aquatic environments are the main destinations of thousands of chemicals for daily use that can act as potential distorters of these ecosystems. In this context we highlight the pesticides such as organophosphates (OP) and pyrethroid (PI), endocrine disrupters such as 17β-estradiol (E2) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) such as benzo(a)pyrene (BaP). Studies on metabolic responses in organisms subjected to different classes of contaminants are extremely valuable to elucidate the effects of the toxicity of mixtures, known as cocktail effect. The main objective of this study was to evaluate in tilapia (*Oreochromis niloticus*) the effects of mixtures of BaP, E2, and pesticides diazinon (OP) and cypermethrin (PI) in biomarkers of detoxication, oxidative stress, esterase activity and genotoxic potential. Another objective was to monitor the water quality of the Tietê River that runs through the Araçatuba – SP, sugarcane area of intense activity and nautical condominiums through the same biomarkers, field to apply the methodology used in the laboratory for environmental diagnosis. The concentrations used were 10 $\mu g.L^{-1}$ of BaP; 220 $\mu g.L^{-1}$ of OP; 0.5 $\mu g.L^{-1}$ de PI; 0.5 $\mu g.L^{-1}$ of E2 (mixture at low concentration); 100 $\mu g.L^{-1}$ BaP, 500 $mg.L^{-1}$ of OP; 1.5 $\mu g.L^{-1}$ of PI; 2.5 $\mu g.L^{-1}$ of E2 (mixture at high concentration); 100 $\mu g.L^{-1}$ of BaP; 500 $\mu g.L^{-1}$ of OP; 1.5 $\mu g.L^{-1}$ of PI; 2.5 $\mu g.L^{-1}$ of 17 E2. Exposures to the four contaminants mixed for 5 days were preceded, pre-exposure to BaP for 3 days followed by exposure to E2 for 5 days; pre-exposure to E2 for 3 days followed by exposure to BaP for 5 days, and pre-exposure to BaP and E2 individually for 3 days followed by exposure to the pesticide individually and mixed for 5 more days. The activities of glutathione *S*-transferase and carboxylesterase, and malondialdehyde and reduced glutathione levels in the liver and gills of the fish, and the activities of EROD, BROD and PROD in the liver and brain acetylcholinesterase activity in were analyzed. The micronucleus test was carried in the blood. In the study of environmental monitoring, in dry and rainy seasons, water was collected in the Tietê river, in four different points and placed in tanks and oxygenated and the tilapia were maintained for 3 days. The concentrations of 100 $\mu g.L^{-1}$ of BaP, 500 $mg.L^{-1}$ of OP; 1.5 $\mu g.L^{-1}$ of PI; 2.5 $\mu g.L^{-1}$ of E2 caused more effects in the tilapias alone and in mixtures. Pre-exposure to BaP followed by exposure to E2 responses caused more effects in tilapia than inverse association and occurred induction of EROD, BROD and GST and variations in CbE activity and GSH nivels. In the experiment pre-exposure to BaP and E2 and subsequent exposure to pesticides individually and mixed, IBR showed that pre-exposure to E2 followed by exposure to cypermethrin caused more effects in the liver and in the gills was pre-exposure to BaP followed by exposure to cypermethrin. Monitoring in the Tietê River was diagnosed induction of BROD and PROD, oxidative stress and decreased esterase in areas under anthropogenic influence. The association of cypermethrin with BaP had mutagenic effect in erythrocytes. Tilapia may respond differently when exposed to the contaminant isolated and he associated with other contaminants. In the Tietê, river in the rainy season and the site of nautical condo with fishing and leisure activities there were more effects in the tilapias.

Keywords: Ecotoxicology. Mixture of contaminants. *Oreochromis niloticus*. Genotoxicity. Tietê river.

SUMÁRIO

1. Introdução geral . . . . . p. 2

2. Objetivos . . . . . p. 14

Capítulo I . . . . . p. 16

Capítulo II . . . . . p. 42

Capítulo III . . . . . p. 62

Capítulo IV . . . . . p. 90

3. Conclusões . . . . . p. 113

4. Referências . . . . . p. 117

Introdução

1. Introdução

Segundo a Organização das Nações Unidas, em 2012 a população mundial atingiu 7 bilhões de pessoas, enquanto que em 1950 era de 2,5 bilhões. Com a demanda populacional, a crescente industrialização e urbanização, dezenas de milhares de compostos químicos de uso cotidiano são produzidos e liberados no ambiente, sendo muitos deles potencialmente citotóxicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os agrotóxicos, os desreguladores endócrinos (DE) e os metais pesados.

O principal destino final desses compostos são os ambientes aquáticos, sendo eles carregados por precipitação quando estão presentes no ar e no solo, além do descarte dos efluentes industriais e sanitários das redes de esgotos diretamente nos rios e mares. Esses compostos podem atuar como poluentes e potenciais modificadores dos ecossistemas aquáticos.

A água é um dos fatores essências para a manutenção das funções vitais dos seres vivos e o uso sustentável desse recurso deve ser estimulado, pois o consumo direto ou indireto de água contaminada pode causar graves danos à saúde dos organismos, inclusive do homem.

1.1 A contaminação aquática no Brasil

O IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, divulgou, em outubro de 2011, um estudo sobre saneamento básico no Brasil e constatou que os agrotóxicos são a segunda maior causa de contaminação das águas brasileiras, superados somente pelo esgoto sanitário; atrás dos agrotóxicos estão os despejos industriais e atividades mineradoras (ATLAS DE SANEAMENTO, 2011).

Segundo um dossiê da ABRASCO, Associação Brasileira de Saúde Coletiva, o Brasil já se tornou o maior consumidor mundial de agrotóxicos, ultrapassando os Estados Unidos e ainda emprega compostos proibidos pela legislação, como organoclorados (dossiê ABRASCO, 2012).

O emprego de agrotóxicos é essencial nos sistemas atuais de produção agropecuária, pois garante alimento e matéria-prima suficientes e de qualidade. Porém, em contrapartida, o uso indiscriminado deles representa sério risco aos ecossistemas,

pois além dos efeitos desejáveis de controle dos organismos fitófagos e parasitas, a toxicidade desses compostos aos organismos não-alvos afeta as funções e o número de indivíduos de diferentes populações, comprometendo assim a ecologia do ambiente.

Os organofosforados (OP) são usados como inseticida na agricultura e parasiticida na pecuária. Os piretróides (PI), de menor toxicidade, estão sendo mais empregados em ambientes domésticos e em programas de saúde pública, no combate aos insetos vetores de doenças por serem menos tóxicos aos humanos (KOUREAS *et al*., 2012).

Os OP são potentes inibidores das colinesterases, principalmente da acetilcolinesterase (AChE), altamente tóxicos para vertebrados e invertebrados. Os PI atuam mantendo abertos os canais de sódio no axônio, apresentando baixa toxicidade para mamíferos, porém são altamente tóxicos para peixes e artrópodes (ANADÓN *et al*., 2009). Acredita-se que a alta suscetibilidade dos insetos e dos organismos aquáticos (não mamíferos) seja resultante da combinação da maior suscetibilidade dos canais de sódio desses animais e da menor temperatura corpórea (piretróides apresentam um coeficiente de ação negativo em função da temperatura), e de menor biotransformação nos insetos.

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o diazinon (DZN), um (OP) e a cipermetrina (CPN), um (PI) estão entre os mais comumente usados no Brasil, e dentre os mais tóxicos de suas categorias. O diazinon é usado contra a mosca-do-chifre e como carrapaticida na pecuária, e como nematicida no solo e na agricultura, no cultivo de feijão, arroz, trigo e contra a mosca-das-frutas. A U.S.EPA estabeleceu risco à saúde humana por diazinon por 1,0 $\mu g.L^{-1}$ na água potável. A cipermetrina é usada contra piolho na avicultura e em culturas de algodão, soja e amendoim. Segundo a Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) a potabilidade da cipermetrina para humanos é tolerada a 300 $\mu g.L^{-1}$.

Segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde, baseada na CL_{50} em ratos (mg/kg peso corporal), a cipermetrina é classificada em "moderadamente tóxico" e o diazinon em "altamente tóxico".

Usualmente a mistura de OP e PI é empregada na pecuária melhorando a eficácia contra os carrapatos (PERRY *et al*., 2007; CETIN *et al.,* 2009), no entanto essa associação torna-se mais tóxica também ao animal hospedeiro.

A grande preocupação com a contaminação dos ambientes aquáticos por esgoto sanitário se deve aos desreguladores endócrinos (DE). Em geral, DE exibem baixa toxicidade aguda, mas podem provocar efeitos crônicos na reprodução, fisiologia e crescimento dos seres vivos. Nos ambientes aquáticos podem, por exemplo, alterar o comportamento e a fisiologia sexual dos peixes reduzindo a fertilidade. O interesse em micropoluentes, como fármacos, poluentes orgânicos persistentes (POP) e DE, que estão presentes na água em escala de $ng.L^{-1}$ a $\mu g.L^{-1}$, tem aumentado expressivamente nos últimos anos, pois esses poluentes exibem baixa toxicidade aguda mas podem provocar toxicidade crônica no sistema endócrino (PAL *et al.,* 2010).

Os DE podem agir pelo menos de três formas: mimetizando a ação do hormônio produzido naturalmente pelo organismo, desencadeando deste modo reações químicas semelhantes no corpo; bloqueando os receptores nas células que recebem os hormônios, impedindo assim a ação dos hormônios naturais; e/ou afetando a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios naturais no organismo (CRAIG *et al*., 2011) .

Um dos DE que merece enfoque na sociedade moderna devido ao grande consumo é o estrogênio 17β-estradiol (E2), de uso em terapias de reposição hormonal e como contraceptivo pelas mulheres. Os estrogênios apresentam altíssima atividade biológica e estão relacionados à etiologia de inúmeros tipos de cânceres (SOTO *et al*., 2009). Por ser excretado na urina, contaminam o ambiente aquático por meio dos lançamentos em esgotos sanitários. Pesquisas demonstram que o E2 está entre os maiores responsáveis pela atividade estrogênica nos efluentes de estações de tratamento de esgoto (SOLÉ *et al*., 2003) e um estudo em águas superficiais na região metropolitana de Campinas – SP revelou que o E2 está entre os cinco compostos mais frequentes (SODRÉ *et al*., 2007). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.EPA) recomenda concentração inferior a 0,0005 $\mu g.L^{-1}$ de E2 na água potável. Como os processos convencionais de tratamento de água não removem totalmente esse micropoluente (JOBLING *et al*. 1998), ele pode ser encontrado nas águas superficiais e vir a reabastecer as cidades, contaminando a população. Mulheres grávidas excretam diariamente na urina cerca de 260 µg de 17β-estradiol (JOHNSON *et al*., 2000).

Não menos importante, outra categoria de contaminante considerada prioritária em estudos de contaminação ambiental são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os HPAs são compostos aromáticos formados por dois ou mais anéis benzênicos, constituídos exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio. Alguns desses contaminantes descritos são precursores de ações mutagênicas e tumorais em sistemas biológicos (WHO, 1983). O benzo(a)pireno (BaP) é um dos HPAs mais tóxicos e reconhecidamente genotóxico e mutagênico (VERNA *et al*., 2012). O BaP é originado na queima incompleta de biomassa, de combustíveis derivados do petróleo (diesel e gasolina), de carvão e em processos industriais (HARVEY, 1985; JACOB *et al.*, 1991; FIEDLER; MUCKE, 1995). Recentemente foi reconhecido seu papel como desregulador endócrino (CORRALES *et al*., 2014). Segundo a U.S.EPA o BaP é tolerado para a água potável no limite de 0,2 $\mu g.L^{-1}$.

Estudos no Brasil mostram que, com a implantação do Próalcool a partir da década de 70, os índices de BaP no ar atmosférico aumentaram significativamente em decorrência da queima da cana-de-açúcar, especialmente em áreas de grande cultivo, como o Estado de São Paulo (MARTINELLI; FILOSO, 2008). Além disso, houve um aumento na frota de veículos. Enquanto a população no Brasil aumentou 12% de 2000 a 2012, a frota de veículo cresceu 114% (fonte: http://www2.camara.leg.br/camaranoticias - 25/11/2013).

1.2 Diagnóstico da contaminação aquática

Diferentes estratégias podem ser adotadas para se avaliar o estado de contaminação dos ambientes aquáticos, como quantificação dos compostos presentes na água, mas isso muitas vezes requer demasiado tempo e recurso financeiro e principalmente, não é suficiente para revelar os efeitos biológicos dos contaminantes sobre os organismos residentes.

Nesse contexto se destacam os "biomarcadores de contaminação", uma ferramenta que evidencia os efeitos dos contaminantes sobre o estado fisiológico dos organismos bem como nos dá pistas sobre os mecanismos de ação dos contaminantes (VAN DER OOST *et al*., 2003).

1.2.1 Os biomarcadores bioquímicos de contaminação

Dentre os biomarcadores bioquímicos de contaminação mais utilizados em estudos ambientais, destacam-se aqueles relacionados à biotransformação de compostos químicos, e ao estresse oxidativo.

A metabolização dos compostos químicos ocorre em 3 fases: as fases *I* e *II* correspondem à biotransformação e a fase *III*, à excreção extracelular dos subprodutos da biotransformação.

A fase *I* envolve reações de oxidação, redução e hidrólise que expõe ou introduz grupos funcionais (-OH, -SH, -NH_2, -COOH) à molécula do composto químico fazendo com que esta se torne polar ou permitindo as reações de conjugação da fase *II*. Na *f*ase *II*, ocorre a conjugação do composto químico não transformado ou dos metabólitos oriundos da fase *I*, com substratos endógenos como sulfatos inorgânicos, aminoácidos e glutationa, entre outros. A conjugação confere ao composto (ou metabólito da *fase I*) maior solubilidade em água para sua posterior excreção (KLAASSEN; WATKINS, 2011).

Os principais grupos de enzimas envolvidas na fase *I* são as monooxigenases flavoproteínas (FMOs) e as monooxigenases heme-proteínas (citocromo P450). Ambos os grupos são expressos em vertebrados aquáticos e invertebrados. Entretanto, os citocromos P450 dominam a literatura, em mamíferos e em espécies aquáticas (STEGEMAN; HAHN, 1994).

O complexo multienzimático P450 é formado por heme-proteínas, ligadas às membranas do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos; quando o ferro-heme é reduzido e complexado em monóxido de carbono, a reação absorve luz em comprimento de ondas próximo a 450 nm, daí o nome citocromo P450. As subfamílias CYP1, CYP2 e CYP3 estão envolvidas no metabolismo de compostos xenobióticos (compostos estranhos ao organismo) (LEWIS, 2001).

A 7-etóxiresorufina *O*-desalquilase (atividade EROD), biomarcador de fase *I* da biotransformação é comumente utilizada para verificar a indução do citocromo P450, isoforma 1A, em organismos expostos a contaminantes, como HPA, dentre eles o BaP (VAN DER OOST *et al*., 2003). O complexo enzimático P450 também atua na metabolização de agrotóxicos, estando relacionado, por exemplo, ao aumento da toxicidade de OP tiônicos, pois este complexo enzimático (isoformas 2 e 3A, em

mamíferos) converte os agrotóxicos da forma tiônica à oxônica, (WHEELOCK *et al*., 2005). A forma oxônica apresenta afinidade com a porção serina das *B*-esterases, ligando-se a elas e inativando a enzima.

Outras isoformas substrato-específicas de P450 podem servir como ferramentas no diagnóstico de contaminação aquática, porém ainda são pouco estudadas, como a 7-pentóxiresorufina *O*-desalquilase (PROD) e a 7-benzilóxiresorufina *O*-desalquilase (BROD). Em mamíferos a atividade BROD é reconhecida como indicativo de isoformas 3A, 1A e 2B (HARTL *et al*., 2007; ARUKWE *et al*., 2008; HAGEMEYER *et al*., 2010) e a PROD em mamíferos é atribuída à isoforma 2B (PORTE *et al*., 2002), porém até hoje não se sabe quais isoformas correspondem a essas atividades em peixes e outros animais aquáticos. A PROD foi estudada em gastrópodes expostos a BaP e se mostrou aumentada pelo contaminante (GAGNAIRE *et al*., 2010). A BROD se mostrou aumentada em peixes coletados em zona de refinaria de petróleo, considerada como área altamente impactada por HPA (TRISCIANI *et al*., 2011).

Os metabólitos derivados dos compostos, produzidos durante a fase *I* da biotransformação, devem ser ligados a moléculas endógenas através de reações de conjugação (fase *II*). Este mecanismo bioquímico de defesa aumenta a hidrossolubilidade dos compostos facilitando a sua excreção. Dentre as enzimas mais importantes neste processo estão as glutationas *S*-transferases (GSTs), estando entre as mais abundantes classes de enzimas do fígado (KLAASSEN; WATKINS, 2011).

A família das GSTs é composta por proteínas diméricas solúveis que atuam catalisando reações de conjugação entre uma grande variedade de compostos com a glutationa reduzida (GSH) (TAN *et al.*, 1987). Essa reação ocorre via ataque nucleofílico da GSH em produtos derivados dos metabólitos formados na fase *I* da biotransformação**,** aumentando a hidrossolubilidade dessas moléculas, facilitando a sua excreção (HAYNE; PULFORD, 1995).

O nível de atividade de glutationa *S*-transferase (GST), biomarcador de fase *II* da biotransformação, também é usualmente avaliado em casos de suspeita de contaminação uma vez que sua atividade aumentada pode indicar uma grande produção de metabólitos derivados da fase *I* da biotransformação de compostos (VAN DER OOST *et al*., 2003). Hyne e Maher (2003) sugerem o estudo da GST em casos de suspeita de contaminação

por agrotóxicos OP, por exemplo, uma vez que a enzima pode metabolizar certos compostos dessa categoria.

A glutationa reduzida (GSH), um tripeptídeo com ação antioxidante, é cofator da GST na metabolização de compostos químicos, assim sua depleção sinaliza a ação da GST metabolizando o composto e também aumento no seu nível pode refletir estímulo de síntese para suprir o gasto pela GST frente a contaminantes ambientais (HELLOU *et al*. 2012).

A biotransformação de compostos químicos é tipicamente acompanhada de uma superprodução de espécies reativas de oxigênio as ERO, tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($^{\bullet}OH$) (LÓPEZ-BAREA; PUEYO, 1998).

Quando a taxa na produção dessas ERO exceder a sua neutralização pela defesa antioxidante da célula, e para isso há a atuação de enzima como a catalase, a superóxido dismutase e a glutationa peroxidase, ocorrerá uma situação considerada como "estresse oxidativo" (EO). Agrotóxicos, derivados do petróleo, dentre outros contaminantes induzem ao EO em organismos aquáticos (LUSHCHAK, 2011). EO foi relatado após exposição aos agrotóxicos metil paration (OP), e clorpirifos (OP) e deltametrina (PI), por Monteiro *et al.* (2009) e Tuzmen *et al.* (2008), respectivamente.

Os ácidos graxos poliinsaturados constituintes das biomembranas são bastante susceptíveis ao ataque por ERO. O abalo nas interações lipídicas leva a alterações estruturais ocasionando comprometimento funcional das biomembranas, e os hidroperóxidos derivados da peroxidação lipídica podem ser metabolizados originando uma série de produtos como alcanos, aldeídos, derivados epóxidos, entre outros. Esses subprodutos podem ser potencialmente citotóxicos, como é o caso do malondialdeído (MDA). Ele tem a capacidade de reagir com proteínas e também de promover lesão oxidativa no DNA (LOUREIRO *et al*., 2002). Estudos têm avaliado os níveis de MDA como indicativo de EO celular (CHUNG *et al*., 2013). Piner *et al*. (2007) observaram aumento de MDA em *O. niloticus* após 4 dias de exposição ao fention (OP). Cossu *et al.* (1997), em estudo de biomonitoramento com molusco, diagnosticaram aumento de MDA nos animais residentes no local contaminado por metais e HPAs, inclusive BaP.

Os biomarcadores típicos para indicar exposição aos OP são as *B*-esterases, que possuem resíduo serina na sua estrutura química, sítio de ligação do agrotóxico. Os OP

classicamente inibem a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e da carboxilesterase (CbE) (THOMPSON, 1991) enquanto que os PI tenderiam a induzir a atividade da CbE, pois a enzima participa da metabolização desses compostos que apresentam grupamento éster (WHEELOCK *et al*., 2008). A AChE, principal *B*-esterase, é responsável pela hidrólise da acetilcolina à colina e ácido acético nas sinapses, no tecido nervoso de vertebrados e invertebrados. As CbEs hidrolisam ésteres carboxílicos, presentes principalmente no fígado de vertebrados e glândulas digestivas de invertebrados.

O diazoxon, diazinon bioativado, diminuiu a atividade da AChE em truta, carpa, zebrafish e lebiste conforme a concentração aumentou de 0,1 a 10 µM, após 30 minutos (KEIZER *et al*., 1995). Chandrasekera e Pathiratne (2005) expuseram *O. niloticus* a 10 $\mu g.L^{-1}$ do OP clorpirifos por 24 horas e observaram inibição da CbE no fígado.

1.2.2 Genotoxicidade

Muitos dos compostos químicos aos quais os organismos estão frequentemente expostos podem induzir modificações químicas no DNA. Estas modificações na estrutura do DNA são prejudiciais às células, uma vez que podem prejudicar processos vitais, tais como a duplicação do DNA e a transcrição gênica. Elas também podem causar mutações e aberrações cromossômicas. A mutação em célula somática pode levar ao câncer e em célula germinativa, à morte (aborto) ou a aberrações cromossômicas e consequentemente a doenças metabólicas congênitas (GRISOLIA, 2005).

Os agentes mutagênicos ambientais são substâncias no ambiente que induzem alterações na molécula de DNA. Essas alterações podem ser corrigidas pelo próprio mecanismo de reparo das células, mas, quando não reparadas ou reparadas erroneamente, originam mutações no material genético (CONNOR; FERGUNSON, 1993).

1.2.2.1 O teste do micronúcleo

Uma técnica simples, rápida e de baixo custo para a avaliação da mutagenicidade induzida por agentes contaminantes é o teste do micronúcleo (MN) (LANDOLT; KOCAN, 1983). Micronúcleos são estruturas delimitadas por membranas que contêm fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram

incorporados a um dos núcleos filhos após a mitose. Segundo Fenech (2000) os MN podem ser resultantes de eventos celulares que levam a fragmentação do material genético, como, por exemplo, os fragmentos acêntricos (que perdeu o centrômero), decorrentes de quebras cromossômicas, durante o processo de divisão celular (por agente clastogênico); ou ainda de perdas de cromossomos inteiros, que não são incorporados ao núcleo principal, durante o ciclo celular (por agente aneugênico). Embora o micronúcleo possa se originar espontaneamente, a sua indução é comumente utilizada para se detectar danos no material genético, resultantes de agente mutagênico (HEDDLE *et al*., 1983).

Os eritrócitos de peixes são usualmente submetidos a teste de MN na investigação de contaminação aquática por serem células nucleadas, e o sangue periférico, de fácil coleta (GRISOLIA *et al*., 2001). Além da análise de MN, alterações na morfologia e no envoltório nuclear, decorrentes de efeitos de substâncias químicas presentes na água podem ser observadas em eritrócitos de peixes. Estas alterações podem estar relacionadas com falhas na divisão celular, processo de morte celular e reações decorrentes de genotoxicidade e/ou mutagenicidade por compostos químicos ambientais (FENECH, 2000) e, portanto, podem ser usadas como indicativas de reatividade com o material genético, complementando a análise de micronúcleo.

Carrasco *et al*. (1990) classificaram essas anormalidades, como: *blebbed* (evaginações sutis do envoltório nuclear); *lobed* (evaginação proeminente do envoltório nuclear); *notched* (invaginação do envoltório nuclear ou núcleo em forma de rim) e *brokeneggs* (pequena porção nuclear ligada ao núcleo principal por uma pequeno filamento nucleoplasmático). Estas alterações podem estar relacionadas com falhas na divisão celular, processo de morte celular e reações decorrentes de genotoxicidade de compostos ambientais (FENECH, 2000) e, portanto, podem ser usadas como indicativas de reatividade com o material genético, complementando a análise de MN.

1.3 Situação dos ambientes aquáticos: "cocktail" de contaminates

Estudos sobre os efeitos de multicontaminantes, situação corriqueira nos ambientes aquáticos, são de extrema importância, pois pouco se conhece a respeito dessa questão sobre a fisiologia dos organismos residentes. Trabalhos já realizados

sobre o assunto são ainda escassos e geralmente tratam de misturas de uma mesma categoria, de dois ou mais poluentes orgânicos, por exemplo, de agrotóxicos da mesma classe ou de diferentes HPA.

A utilização de uma bateria de biomarcadores poderia ser útil para se avaliar a resposta frente a misturas de contaminantes em organismos sob estresse ambiental (WANG *et al*., 2010).Como já comentado, classicamente a inibição da atividade das *B*-esterases é ferramenta no diagnóstico de exposição a agrotóxicos OP, enquanto o BaP é típico indutor de EROD, o E2 inibe a EROD, e o BaP e os agrotóxicos podem ser potenciais indutores da GST. Peroxidação lipídica e depleção ou estímulo de síntese de GSH ocorrem em situação de estresse oxidativo celular, e aumento na taxa de micronúcleos são atribuídos a agentes genotóxicos, como o BaP . Porém, nada ou muito pouco se sabe sobre o efeito da exposição a misturas desses contaminantes nos biomarcadores. É possível que os efeitos clássicos desses contaminantes possam ser afetados ou mascarados pelo efeito de outro contaminante presente em associação em ambientes contaminados. Em consonância com essa idéia, em estudos prévios de nosso grupo observamos que 500 $\mu g.L^{-1}$ do BaP promoveu indução da EROD, mas quando associado a 500 $\mu g.L^{-1}$ do diazinon, houve diminuição na atividade da enzima, revelando para a EROD o diazinon reduziu o efeito da pré-exposição ao BaP (TRIDICO *et al*., 2010).

1.4 Estudo de monitoramento ambiental

Estudos de monitoramento ambiental são rotineiros nos países do hemisfério norte a partir de 1980. No hemisfério sul, este tipo de estudo é mais recente. No Brasil especificamente, tem crescido nos últimos anos.

A contaminação do meio aquático seja por atividades agrícolas, tratamento ineficaz de efluentes e desastres ecológicos representa um crescente problema no Brasil, como consequência do desenvolvimento acelerado e não controlado de nosso país. Deste modo, estudos diagnósticos da qualidade de nossas águas, sejam por análises químicas e/ou estudos com biomarcadores bioquímicos de contaminação, assumem um papel relevante no sentido de se avaliar áreas com potenciais riscos ambientais.

Além do foco no efeito de misturas de contaminantes em peixes sob condições controladas de laboratório, esse trabalho de doutorado propôs também a aplicação

prática da metodologia dos biomarcadores bioquímicos em estudo de monitoramento ambiental, onde objetivamos fazer o diagnóstico da qualidade da água do rio Tietê que percorre o município de Araçatuba - SP.

Segundo avaliação da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) em 2006, o IVA - Índice de qualidade de água para proteção da vida aquática – foi classificado em "boa" qualidade, em média, ao longo do ano na região de Araçatuba. O IVA é determinado a partir da mensuração de parâmetros químicos e físicos, exclusivamente, sendo relevante um melhor esclarecimento a respeito das condições fisiológicas dos organismos residentes nessas águas.

1.5 A cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana, o maior produtor de açúcar e segundo maior produto de álcool e São Paulo, o maior entre os estados produtores de cana (fonte: http://www.unica.com.br/faq/ - 25/11/2013).

O plantio se dá no inicio do período chuvoso (outubro/novembro). Nos primeiros 90 dias a cultura fica mais susceptível às pragas e competição com plantas invasoras por isso requer o uso de agrotóxicos. É também quando a cultura ainda está baixa que se que se aplica a vinhaça no canavial, um adubo orgânico.

No primeiro ano de estabelecimento a cana se desenvolverá, passando por um período de repouso de 4 meses, correspondente a estação seca (junho a setembro, retornando o seu crescimento na estação chuvosa subsequente. O corte se dará no próximo período seco. A queimada do canavial se faz para que remove a palhada e isso facilita e agiliza o corte pelos cortadores.

As usinas sucroalcooleiras apresentam elevado potencial poluidor do ponto de vista ambiental. A queima da palha libera HPAs, como BaP, monóxido de carbono e óxidos de nitrogênio na atmosfera.

1.6 Os organismos-teste

Os poluentes são potencias desreguladores dos ecossistemas aquáticos e a opção pela ictiofauna como sentinela nesse estudo deveu-se ao fato do grupo possuir grande

representatividade nos ecossistemas dulcícolas, abrange vários níveis tróficos, participa de complexas relações interespecíficas com os mais diversos grupos de organismos aquáticos e apresenta alta taxa de assimilação dos poluentes (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Dessa forma é pertinente supor que perturbações na sua fisiologia, atribuídas ao contaminante, poderão vir a acarretar em consequências para a sua fisiologia, comportamento, ecologia e reprodução.

1.6.1 A espécie *Oreochromis niloticus*

A espécie, de origem africana, foi introduzida no Brasil em 1971 em açudes do nordeste, e no sudeste em 1982 e se adapta facilmente as condições ambientais brasileiras. Particularmente no estado de São Paulo, é a principal espécie cultivada em aquicultura, para fonte alimentar.

De acordo com Alves-Costa (2001), a espécie é um excelente organismo-teste para ensaios de avaliação da toxicidade de substâncias presentes em ambientes aquáticos. A presença de contaminantes nos ambientes de produção pode gerar danos a saúde dos animais e ambiental e os estudos com os biomarcadores pode ser uma ferramenta na avaliação da toxicologia ambiental.

Objetivos

2. Objetivos

- avaliar respostas bioquímicas e genotoxicidade em tilápia do Nilo adulta (*Oreochromis niloticus*), decorrentes de exposição subletal crônica a benzo(a)pireno e 17β-estradiol (DE) e agrotóxicos diazinon (OP) e cipermetrina (PI), isoladamente e em misturas;

- avaliar a qualidade da água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP, sob influência de atividades canavieiras e de condomínio náutico, por meio de biomarcadores bioquímicos e de genotoxicidade em tilápia.

Capítulo I

Capítulo I

Exposição aos contaminantes isolados e em misturas em baixas e altas concentrações

Os contaminantes raramente estão sozinhos nos ambientes aquáticos; eles geralmente estão presentes em misturas nos ambientes aquáticos, logo as interações entre os compostos podem potencializar a biodisponibilidade, a absorção, e a biotransformação desse "coktail" de compostos.

Os organismos são continuamente expostos a misturas de vários poluentes, de diferentes composições químicas, e seus metabólitos. Se os compostos químicos em uma mistura têm diferentes sítios-alvo, não interagem entre si e têm diferentes mecanismos, eles agem de forma independente. Se os compostos químicos não interagem, mas agem no mesmo alvo e têm mecanismos de toxicidade semelhante, o efeitos são tipicamente aditivo.

São exemplos na natureza de fontes de emissão de mistura de poluente as estações de tratamento de águas residuais de efluentes e escoamento do campo.

Objetivos

- Testar qual das concentrações testadas promove resposta mais acentuada nas tilápias;
- Testar se essa resposta é concentração-dependente;
- Testar se o efeito de um contaminante sob seu biomarcador específico é afetado pela presença de outros contaminantes na mistura;
- Testar se os efeitos da mistura dos contaminantes em altas concentrações diferem dos efeitos da mistura em baixas concentrações.

I. Material e Métodos

Os espécimes de tilápias (*Oreochromis niloticus*) usados nesse trabalho foram todos machos adultos. O estudo dos efeitos de desreguladores endócrinos estrogênicos,

como é caso dos compostos E2 e BaP, é recomendado em organismos machos visto que eles quando expostos a essa categoria de DE são potencialmente sensíveis aos seus efeitos.

Os peixes usados nos experimentos de exposição foram cedidos pela APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios) – Monte Alegre do Sul - SP. Os animas são então transferidos para a EMBRAPA – Meio Ambiente, em Jaguariúna - SP, que conta com excelente infraestrutura para manutenção e criação dos peixes. Os dados biométricos dos peixes estão na tabela 1.

Antes dos experimentos os peixes eram alimentados com ração petelizada (24% de proteína), uma vez ao dia.

Tabela 1: Dados biométricos dos peixes da espécie *Oreochromis niloticus* usados nos experimentos.

Experimento	**Peso (g)**	**Tamanho (cm)**
Contaminantes individuais (I): dez 2010	235,15 ± 53,22	19,28 ± 1,51
Todos os contaminantes misturados (II): set 2011	185,84 ± 52,10	17,66 ± 1,51

Os valores estão expressos em média ± desvio-padrão.

O projeto teve aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal da "Universidade Estadual Paulista" – (CEEA) IBILCE/UNESP, protocolo nº 025/2010.

a) A determinação das concentrações dos contaminantes

Experimento realizado anteriormente em nosso laboratório com biomarcadores bioquímicos em *O. niloticus* mostrou efeito subletal do diazinon, como inibição da AChE no cérebro em 74% a 1 $mg.L^{-1}$, sendo que 2 $mg.L^{-1}$ foi letal (30 g) (RODRIGUES, 2009) e Tridico *et al.* (2010) não observaram efeito a 0,5 $mg.L^{-1}$. No entanto Elnwishy *et al*. (2007) determinaram a LC_{50} do DZN em 2,8 $mg.L^{-1}$ por 96 horas para a espécie (40 g), assim optou-se por testar nesse trabalho as concentrações de 220, 500 e 1260 $\mu g.\ L^{-1}$ do diazinon.

Foi também testado previamente o E2 a 5 e 15 $\mu g.L^{-1}$ na espécie e observou-se indução da BROD a 5 $\mu g.L^{-1}$ e da PROD a 15 $\mu g.L^{-1}$ (BITENCOURT, 2011) e Teles *et al*. (2005) relatam decréscimo na atividade EROD em *Sparus aurata* expostos a 4 $\mu g.L^{-1}$ de E2. Estudos detectaram concentração de 5 $\mu g.L^{-1}$ do hormônio no Rio Atibaia em

Campinas/SP (SODRÉ *et al*., 2007) e 25,8 ng.L^{-1} no Córrego Rico em Jaboticabal/SP (LOPES *et al*., 2010), por isso optou-se por testar as concentrações de 0,5; 2,5 e 5 µg.L^{-1} do E2.

Em estudo prévio observou-se também que o BaP a 500 µg.L^{-1} induziu a EROD em *O. niloticus* (TRIDICO *et al*., 2010) no entanto Costa *et al*. (2009) relatam indução com 10 µg.L^{-1} do composto na espécie, o que levou a proposta em testar as concentrações de 10, 100 e 500 µg.L^{-1} do composto.

Para o agrotóxico cipermetrina Sarikaya (2009) estabeleu LC_{50} em 5,99 µg.L^{-1} por 96 horas (25 g) para *O. niloticus*, sendo que Uner *et al*. (2001) relatam efeitos em parâmetros oxidativos na espécie com 3 µg.L^{-1} e Korkmaz *et al*. (2009) observaram alterações morfológicas no fígado da espécie sob 0,22 µg.L^{-1} por isso nesse trabalho foram testadas as concentrações de 0,5; 1,5 e 3 µg.L^{-1} do composto.

b) Os experimentos de exposição controlada aos contaminantes

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (LEA), na EMBRAPA – Jaguariúna (Fig. 1).

Durante os experimentos os peixes foram mantidos em aquários de vidro de 80 x 50 x 50 cm (comprimento x largura x altura) com 100 litros de água desclorada, de poço artesiano, sob constante aeração e temperatura controlada de 25 ± 0,5^{o} C e privados de alimentação durante o período de experimental. Antes da adição dos contaminantes eles foram aclimatados nos aquários por 3 dias.

Figura 1: Laboratório de Ecotoxicologia Aquática. A e B: área de experimentação animal. C e D: coleta de material biológico.

No experimento I foram usados 78 animais divididos em 13 aquários, formando 1 grupo controle (sem contaminante) e 12 grupos tratados, com 3 concentrações de cada um dos 4 contaminantes individualmente, por 5 dias, conforme mostra a figura 2.

As concentrações de benzo(a)pireno usadas foram: 10, 100 e 500 $\mu g.L^{-1,}$ de diazinon (OP) foram 220, 500 e 1260 $\mu g.L^{-1}$, de cipermetrina (PI) foram 0,5; 1,5 e 3,0 $\mu g.L^{-1}$ e de 17β-estradiol foram 0,5; 2,5 e 5,0 $\mu g.L^{-1}$.

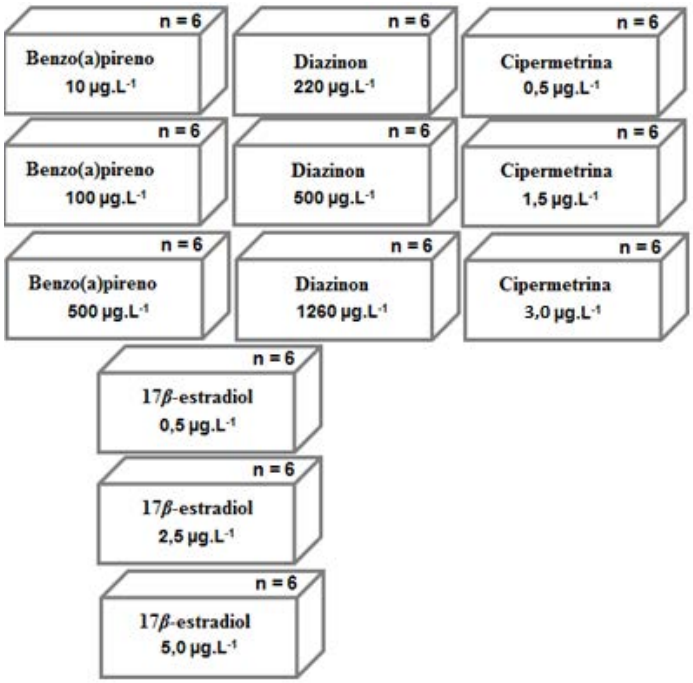


Figura 2: Representação esquemática do experimento I. As tilápias *Oreochromis niloticus* foram expostas por 5 dias aos diferentes contaminantes, individualmente, em 3 concentrações.

No experimento II foram usados 18 peixes divididos em 3 aquários, formando 1 grupo controle, 1 grupo exposto à mistura dos 4 contaminantes, em concentrações previamente consideradas baixas, e 1 grupo exposto à mistura dos 4 contaminantes, em concentrações previamente consideradas altas, por 5 dias, conforme a figura 3.

As concentrações de usadas na mistura em baixa concentração foram: benzo(a)pireno: 10, µg.L^{-1}, diazinon 220µg.L^{-1}, cipermetrina 0,5µg.L^{-1} e 17β- 0,5µg.L^{-1}; na mistura em alta concentração foram 100, µg.L^{-1}, diazinon 500µg.L^{-1}, cipermetrina 1,5µg.L^{-1} e 17β- 2,5µg.L^{-1}.

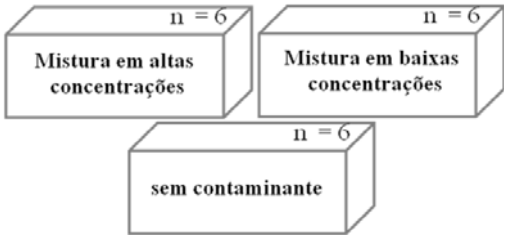


Figura 3: Representação esquemática do experimento II. As tilápias *Oreochromis niloticus* foram expostas aos 4 contaminantes, misturados, por 5 dias. Baixas concentrações: 10 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno; 220 µg.L^{-1} de diazinon; 0,5 µg.L^{-1} de cipermetrina; 0,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol. Altas concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno; 500 µg.L^{-1} de diazinon; 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina; 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol.

A água contaminada, resultante dos experimentos, foi tratada por um sistema de biofiltro (fig. 4) desenvolvido pelo engenheiro agrônomo da EMBRAPA – Jaguariúna, Luiz Guilherme Rebello Wadt, para absorção e degradação dos contaminantes. O sistema, composto de quatro caixas de PVC, blocos de argila e planta aquática (vetiver), funciona pelo processo de recirculação de água.

A primeira caixa recebe a água a se tratada; a segunda é preenchida com blocos de argila, sem as plantas, para facilitar a lavagem; a terceira, com blocos de argila e plantas aquáticas, que têm grande capacidade de produzir biomassa radicular a ainda libera um complexo de enzimas que aceleram o processo de degradação de contaminantes na água. A quarta caixa é composta do mesmo material e tem a mesma função. A água da primeira caixa ou reservatório fica recirculando pelo sistema por 2 meses e então estar pronta para ser reutilizada para irrigação.

Figura 4: Sistema de biofiltro para remoção dos contaminantes da água resultantes dos experimentos, desenvolvido pela EMBRAPA – Meio Ambiente, com a planta vetiver (*Vetiveria zizanioides*).

c) Coleta do material biológico

Transcorridos os períodos experimentais os peixes foram sedados com benzocaína (65 mg/L de água) e eutanasiados por secção cervical.

No primeiro experimento foi dissecado o fígado dos peixes e no segundo experimento foram dissecados o fígado, brânquias e encéfalo (Fig. 5), e coletado sangue por punção caudal com seringa heparinizada (4 cc).

Os tecidos foram imediatamente congelados a – 80 ^{o}C na EMBRAPA e transportados para São José do Rio Preto em gelo seco. Com o sangue foi feito

esfregaço (duas lâminas por peixe) no momento da coleta do sangue e o material foi fixado em metanol PA por 10 minutos para estocagem à temperatura ambiente e posterior coloração.

Figura 5: A: Tilápia *Oreochromis niloticus*. B: fígado. LD: lobo direito, LE: lobo esquerdo, VB: vesícula biliar. C: brânquia. AB: arco branquial, La: lamela. D: encéfalo. Ce: cérebro, BO: bulbo óptico, Cb: cerebelo, Bu: bulbo.

d) Avaliação das esterases

Para o estudo da carboxilesterase (CbE), fragmentos de fígado e brânquia foram homogeneizados (1:4 massa:vol) em tampão Tris HCl 0,1 M; pH 8,0 e centrifugados por 20 min a 9168 x g. A fração sobrenadante foi coletada e estocada a – 30 ºC. A atividade da CbE foi medida pelo método de Ellman *et al*. (1961). Feniltioacetato foi usado como substrato e a reação do DTNB com o substrato foi monitorada a 412 nm por espectrofotômetro.

Para o estudo da acetilcolinesterase (AChE), fragmento de encéfalo foi homogeneizado (1:4 massa:vol) em tampão Tris HCl 0,1 M; pH 8,0 e centrifugado por 20 min a 9168 x g. A fração sobrenadante foi coletada e estocada a – 30 ºC. A atividade da AChE foi medida pelo método de Ellman *et al*. (1961). Iodeto de acetiltiocolina foi

usada como substrato e a reação do DTNB com o substrato foi monitorada a 412 nm por espectrofotômetro.

e) Avaliação da glutationa *S*-transferase (GST) e isoformas do complexo P450 (CYP)

Para a análise enzimática da GST fragmentos de fígado e brânquia, e para EROD, BROD e PROD fragmentos de fígado foram homogeneizados (1:8 massa:vol) em tampão Tris HCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, sacarose 0,5 M; pH 7,4 contendo inibidor de protease (PMSF 100 µM), e centrifugado a 9168 x g por 20 minutos. A fração sobrenadante foi coletada e centrifugada novamente a 50.000 x g por 60 minutos, gerando uma fração sobrenadante e um *pellet*.

A atividade enzimática da GST foi medida na fração sobrenadante e as atividades da EROD, BROD e PROD, como indicativos de citocromo P450 foram medidas no pellet macerado manualmente em tampão Tris-HCl 0,1 M; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; KCl 0,1M e 20% de glicerol; pH 7,5.

As atividades da EROD, BROD e PROD foram avaliadas segundo o método de Burke e Mayer (1985). Os substratos 7-etóxiresorufina, 7-benzilóxiresorufina e 7-pentóxiresorufina foram usados nos ensaios da EROD, BROD e PROD respectivamente, na concentração final de 5 µM. A formação do produto fluorescente, a resorufina (λ_{excit} = 537 nm, λ_{emiss} = 583 nm), foi monitorado por 3 minutos a 30 ^{o}C por espectrofotômetro fluorímetro. Foi feita uma curva padrão com concentrações conhecidas de resorufina e usada para quantificar resorufina formada nos ensaios das isoformas.

A análise da GST foi realizada segundo o método de Keen *et al*. (1976). A amostra foi adicionada em um meio de reação contendo CDNB, como substrato, e glutationa reduzida, e o aumento de absorbância devido à formação do produto CDNB-SG foi acompanhado a 340 nm por espectrofotômetro.

A quantificação de proteínas total das amostras foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Os valores das atividades da GST, AChE e CbE foram expressos como U/mg de proteína e os valores da atividade da EROD, BROD e PROD foram expressos como pmol resorufina/min/mg proteína. A quantificação de proteínas foi realizada por espectrofotômetro de cubetas ou por leitor de microplacas

f) Avaliação da peroxidação lipídica (níveis de MDA)

Para análise dos níveis de malondialdeído (MDA) fragmentos de fígado e brânquia foram homogeneizados (1:3 massa:vol) em tampão Tris HCl, 0,1 M, pH 8,0. Em seguida, foi adicionado 300 µL de solução de TBA 0,4% diluído em HCl 0,2 M. As amostras foram incubadas por 40 minutos a 90 ^{o}C. Após este período, as amostras de MDA-TBA foram extraídas com 1 mL de *n*-butanol após centrifugação por 3 min a x 1123 g e mantidas à 0 ^{o}C por 15 minutos e posteriormente injetadas diretamente no HPLC (20 µL) acoplado a um detector UV e monitoradas a 532 nm (ALMEIDA *et al*., 2003; 2004).

A fase móvel consistiu em solução KH_2PO_4 50 mM, pH 7,0 com 40 % metanol, bombeada (1 ml.min^{-1}). A coluna utilizada foi LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de poro).

A quantificação do MDA foi feita com base em uma curva padrão injetando-se previamente no HPLC concentrações conhecidas de padrões autênticos de MDA derivatizado com o TBA. Os dados foram expressos em pmol MDA/mg tecido.

g) Avaliação dos níveis de glutationa reduzida (GSH)

Para análise dos níveis de GSH nos tecidos, fragmentos de fígado e brânquia foram homogeneizados (50 mg) em 500 µL de ácido perclórico 0,25 M / 10% metanol e centrifugados a 9168 x *g* por 5 minutos a 4^{o}C. A fração sobrenadante foi coletada.

A análise de GSH foi realizada por meio de HPLC acoplado a um detector eletroquímico, seguindo a metodologia de Rodríguez-Ariza *et al*. (1994). O detector foi ajustado para os potencias de 300 mV (canal 1) para GSH e 650 mV (canal 2) para GSSG.

A fase móvel consistiu em solução fosfato de sódio monobásico 50 mM, ácido octanosulfônico 0,25 mM e acetonitrila 2%, pH 2,5; bombeada (0,9 mL.min^{-1}). A coluna usada foi C-18 (250 x 4,6 mm 5 µm de diâmetro de poro). As amostras foram filtradas em filtros de polietileno e posteriormente 20 µL foram injetados.

A quantificação de GSH foi feita com base em uma curva padrão injetando-se previamente no HPLC concentrações conhecidas de padrões autênticos de GSH

preparado a partir de uma solução estoque a 10 mg/mL em fase móvel. A concentração de GSH foi expressa em nmol/g tecido.

h) Teste do micronúcleo

Para o teste do micronúcleo e anormalidades nucleares, após a fixação dos esfregaços procedeu-se o processo de coloração pela reação de *Schiff*, seguindo o protocolo:

1. colocar as lâminas no recipiente com HCl 10% e deixar em banho-maria à 60ºC por 11 min;

2. lavar as lâminas com água destilada, na cumbuca;

3. colocar o reativo de *Shiff* na cumbuca e embrulhar com papel alumínio e colocar no escuro por 2 horas;

4. devolver o reativo de *Shiff* e lavar as lâminas com água destilada, na cumbuca;

5. colocar as lâminas para secar, no rack, *overnigh.*

Após a coloração, em cada lâmina foram analisados 1500 eritrócitos, totalizando 3000 eritrócitos por peixe, em objetiva de 100x, em óleo de imersão, no microscópio de luz.

Durante as análises, além da contagem dos micronúcleos, os núcleos foram avaliados para a presença de anomalidades que, quando notadas foram classificadas como *blebbed*, *lobed*, *notched*, *brokeneggs,* célula binucleada e cariólise, de acordo com Carrasco *et al*. (1990).

Todos os reagentes usados nas análises bioquímicas, inclusive os contaminantes, foram comprados da *Sigma-Aldrich*.

Todos os resíduos químicos resultantes das análises bioquímicas foram armazenados em recipientes apropriados e recolhidos pela Comissão Interna de Segurança Química do IBILCE/UNESP.

i) Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software *Statistica 7.1* com auxílio do *BioEstat* 5. Foram usadas como apoio as bibliografias *Biostatiscal Analysis* (ZAR,

2010) e *Experimental Design and Data Analysis for Biologists* (QUINN; KEOUGH, 2002).

No experimento I os dados foram submetidos à análise por regressão linear e polinomial para se testar se havia relação entre a variação da atividade da enzima pela variação do nível da concentração dos contaminantes. Também foi realizada análise de variância para nos mostrar qual concentração causaria alteração significante dos biomarcadores em relação ao grupo controle e assim poderíamos determinar as concentrações (baixa e alta) de cada contaminante que seriam usadas nas misturas.

Para os dados dos experimentos I e II foram aplicados o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste de homogeneidade das variâncias (Levene). Para dados paramétricos e homogêneos aplicou-se Anova *one-way* seguido do teste *post hoc* de Tukey. Para os dados não paramétricos e/ou não homogêneos foi aplicado Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn.

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Diferenças significativas foram aceitas para valor de $p < 0,05$.

II. Resultados

a) Análise por regressão

A atividade da CbE no fígado mostrou relação linear negativa em relação à concentração do diazinon (OP) nas tilápias ($p < 0,07$) e fraca interação ($R^2 < 0,3$).

A atividade da BROD no fígado mostrou relação polinomial (parabólica) negativa em relação à concentração do E2 nas tilápias ($p < 0,05$) e moderada interação ($R^2 > 0,3$). A figura 6 mostra os gráficos de regressão para as atividades em função das concentrações dos contaminantes.

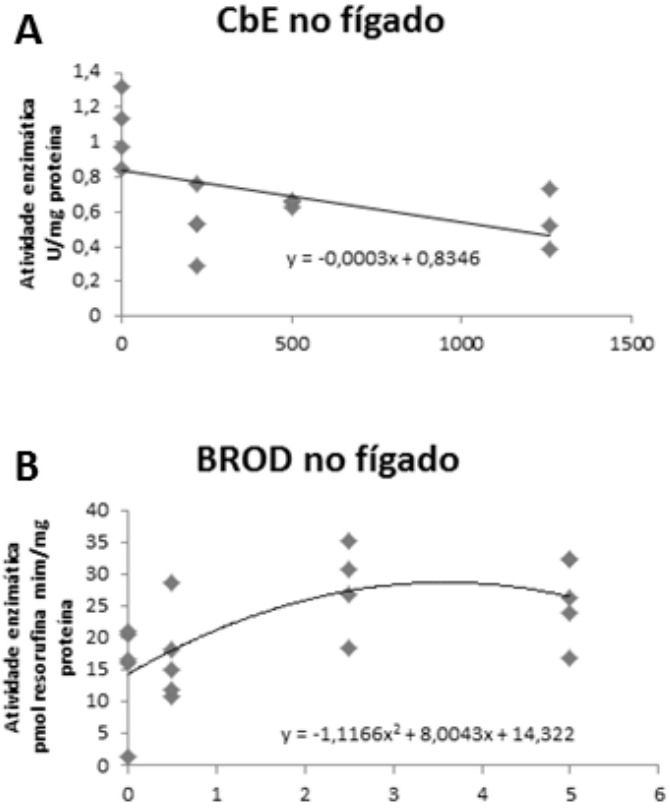


Figura 6. Gráficos de dispersão em *Oreochromis niloticus* expostas por 5 dias aos contaminantes. A: Regressão linear. Atividade da carboxilesterase x concentração do diazinon. B: Regressão parabólica. Atividade da 7-benzilóxiresorufina *O*-desalquilase x concentração do 17β-estradiol.

A tabela 2 apresenta as informações referentes à análise por regressão. Para os demais tratamentos o modelo de função linear e polinomial não é indicado, ou seja, a interação entre as variáveis dependente em função da variável independente não se mostrou significativa, para $p < 0,05$ para estimar os valores das atividades enzimáticas analisadas em função das concentrações dos contaminantes testadas.

Tabela 2: Dados gerados pelas regressões do experimento I de exposição de *Oreochromis niloticus* aos contaminantes benzo(a)pireno, 17*β*-estradiol, cipermetrina e diazinon por 5 dias, individualmente.

	R^2	a	b	c	p
BROD - 17*β*-estradiol	0,3189	-1,1166	8,0043	14,322	0,0117*
CbE - diazinon	0,2546	-0,0003	0,8346		0,0657

a: coeficiente angular
b: coeficiente de regressão
c: coeficiente livre
R^2: ajuste dos pontos da reta de regressão

* Significativo para $p < 0,05$.

b) Análise de comparação entre os grupos experimentais

O E2 na concentração intermediária de 2,5 $\mu g.L^{-1}$ promoveu aumento na atividade da EROD no fígado das tilápias após 5 dias de exposição, porém as outras concentrações e o BaP, o diazinon e a cipermetrina não afetaram a enzima (Fig. 7).

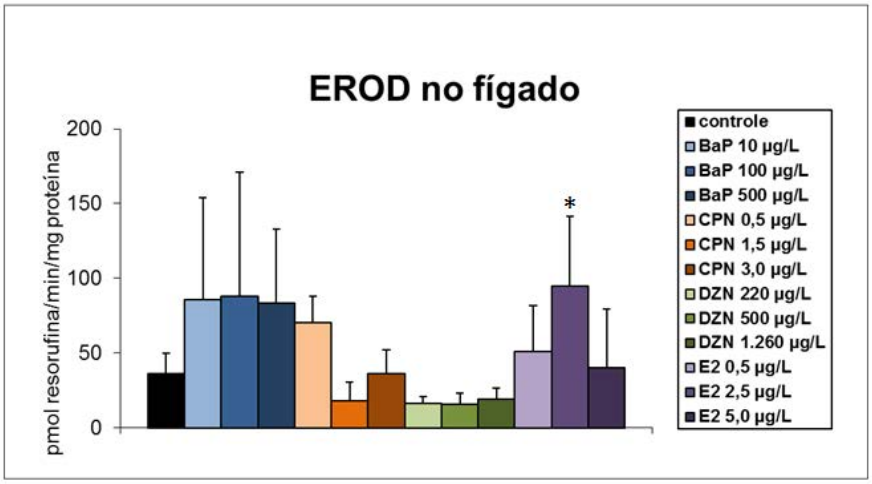


Figura 7: Atividade da enzima EROD (7-etóxiresorufina *O*-desalquilase) no fígado de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição aos contaminantes individualmente. * indica diferença significativa entre o grupo controle ($p < 0,05$). Teste de Dunn.

As 3 concentrações do BaP (10, 100 e 500 $\mu g.L^{-1}$) causaram aumento na atividade da BROD no fígado das tilápias e também a concentração de 1,5 $\mu g.L^{-1}$ da cipermetrina (intermediária). O diazinon e o E2 não afetaram a atividade da enzima (Fig. 8).

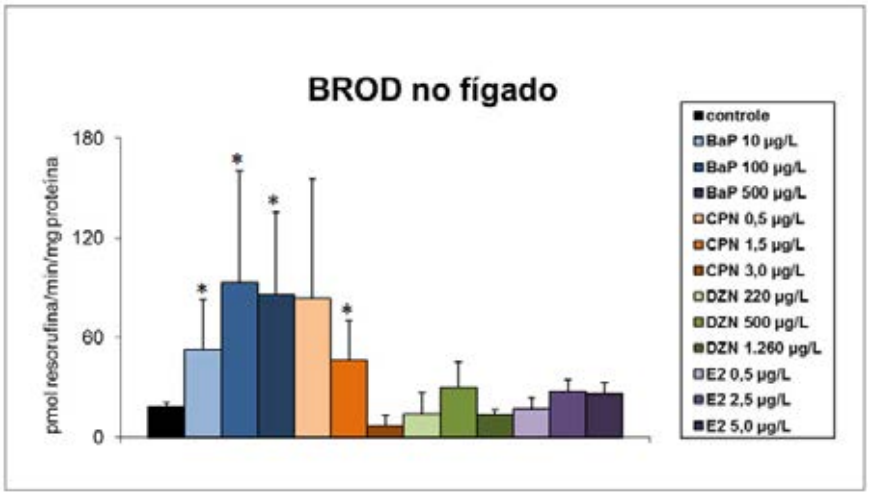


Figura 8: Atividade da enzima BROD (7-benzilóxiresorufina *O*-desalquilase) no fígado de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição aos contaminantes individualmente. * indica diferença significativa entre o grupo controle ($p < 0,05$). Teste de Dunn.

O E2 na maior concentração (5,0 µg.L^{-1}) promoveu diminuição na atividade da PROD no fígado das tilápias. As demais concentrações e o BaP, diazinon e a cipermetrina não afetaram a enzima (Fig. 9).

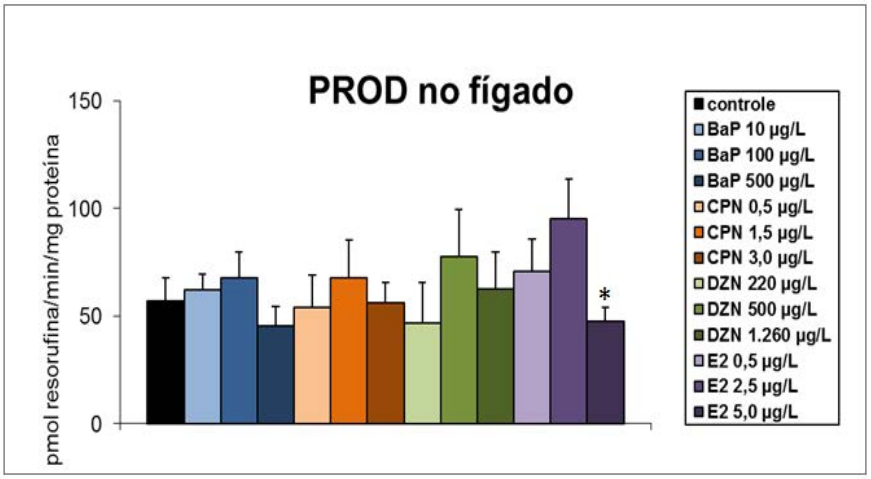


Figura 9: Atividade da enzima PROD (7-pentilóxiresorufina *O*-desalquilase) no fígado de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição aos contaminantes individualmente. * indica diferença significativa entre o grupo controle ($p < 0,05$). Teste de Tukey.

O E2 na menor concentração (0,5 µg.L^{-1}) causou diminuição na atividade da GST no fígado das tilápias. As demais concentrações e o BaP, o diazinon e a cipermetrina não afetaram a enzima (Fig. 10).

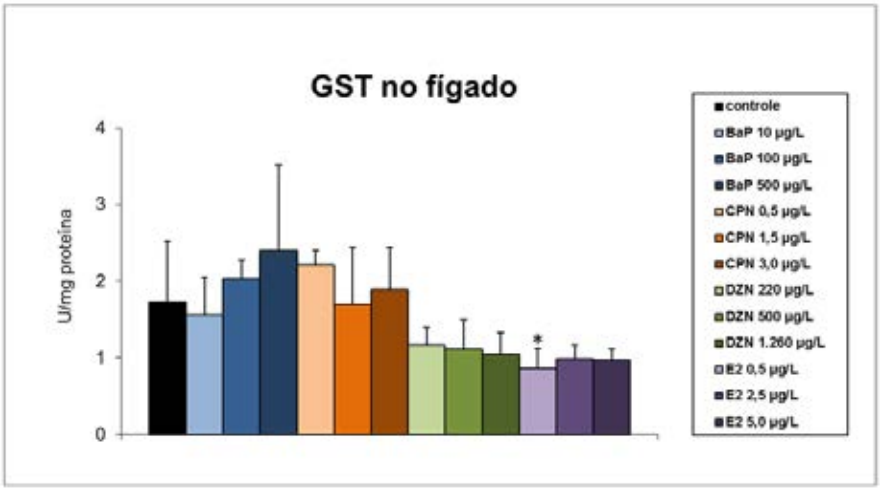


Figura 10: Atividade da enzima glutationa *S*-transferase no fígado de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição aos contaminantes individualmente. * indica diferença significativa entre o grupo controle ($p < 0,05$). Teste de Dunn.

O diazinon causou inibição da CbE no fígado das tilápias, nas 3 concentrações. Os demais contaminantes não afetaram a enzima (Fig. 11).

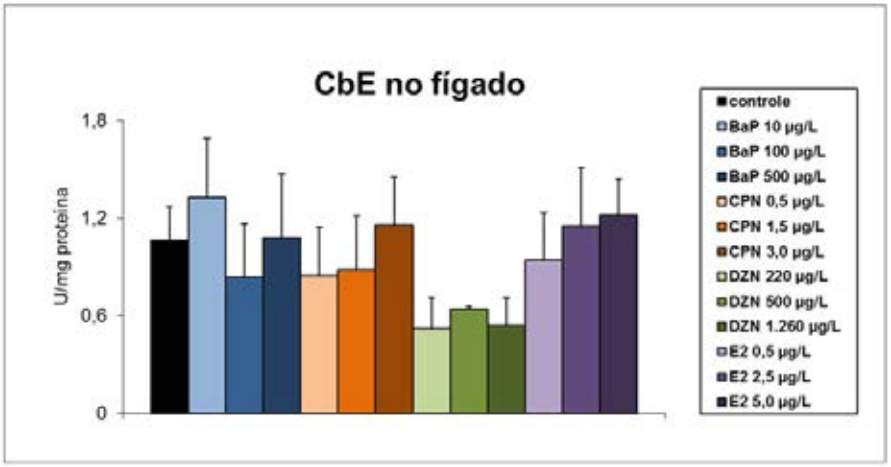


Figura 11: Atividade da enzima carboxilesterase no fígado de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição aos contaminantes individualmente. * indica diferença significativa entre o grupo controle ($p < 0,05$). Teste de Dunn.

A mistura em alta concentração dos contaminantes promoveu aumento na atividade da EROD e BROD no fígado das tilápias após 5 dias de exposição (fig. 12-A e 12-B, respectivamente). A atividade da PROD não foi afetada pelas misturas (Fig. 12-C).

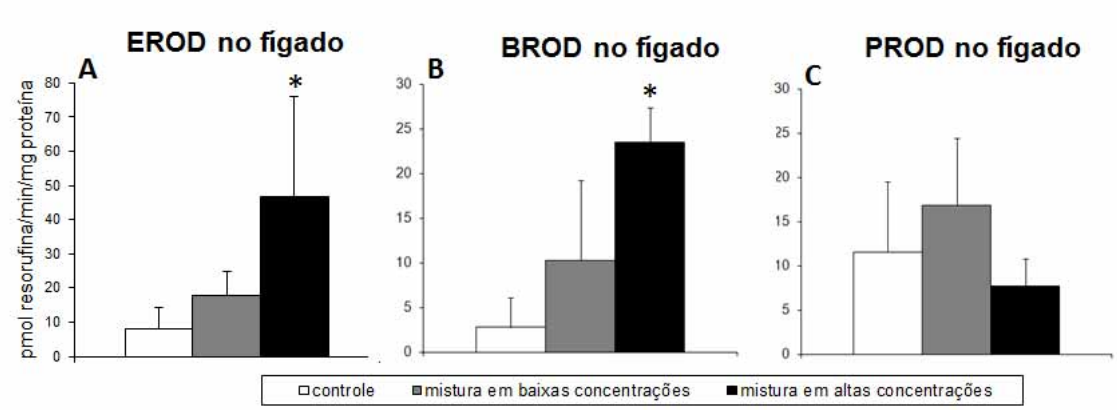


Figura 12: Atividade de enzimas de *fase I* no fígado de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição às misturas dos contaminantes. Baixas concentrações: 10 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno; 220 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol. Altas concentrações: 100 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno, 500 $mg.L^{-1}$ de diazinon; 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol. * indica diferença significativa entre o grupo controle ($p < 0,05$). Teste de Tukey.

As misturas dos contaminantes não afetaram a atividade da enzima GST no fígado e nas brânquias das tilápias (Figs. 13-A e B).

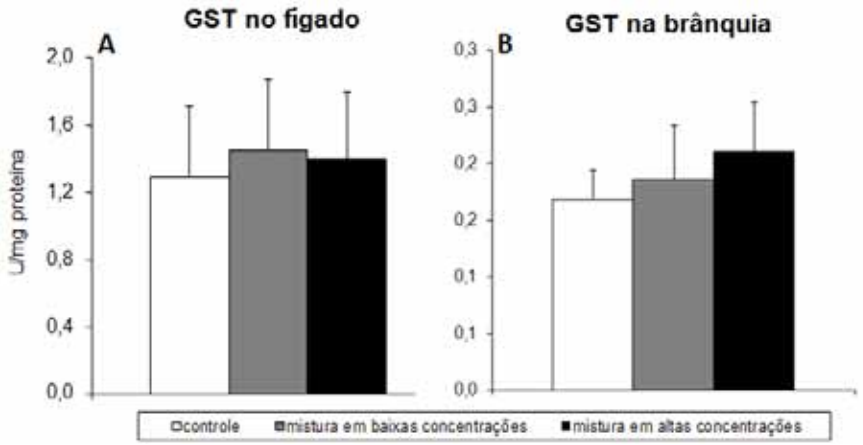


Figura 13: Atividade de enzima glutationa *S*-transferase no fígado de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição às misturas dos contaminantes. Baixas concentrações: 10 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno; 220 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol. Altas concentrações: 100 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno, 500 $mg.L^{-1}$ de diazinon; 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol.

As misturas dos contaminantes não afetaram a atividade da enzima AChE no encéfalo das tilápias (Fig. 14).

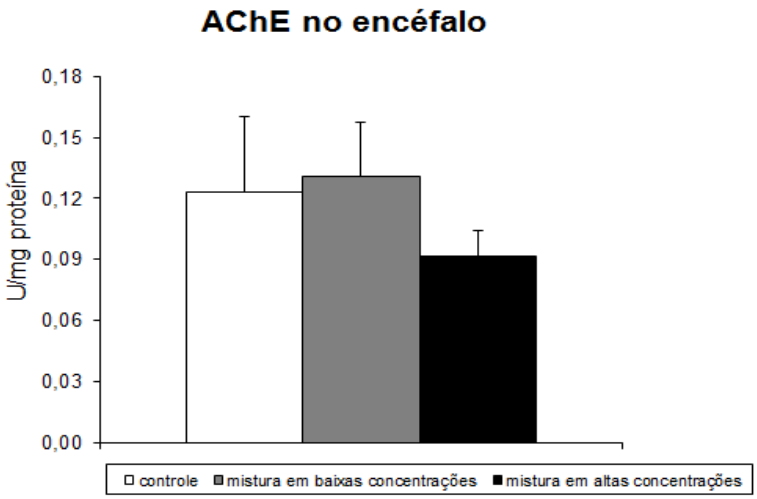


Figura 14: Atividade de enzima acetilcolinesterase no encéfalo de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição às misturas dos contaminantes. Baixas concentrações: 10 $\mu g.L^{-1}$de benzo(a)pireno; 220 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol. Altas concentrações: 100 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno, 500 $mg.L^{-1}$ de diazinon; 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol.

As misturas, em alta e baixa concentrações, causaram inibição da CbE no fígado das tilápias (Fig. 15-A) mas não causaram efeito na brânquia (Fig. 15-B).

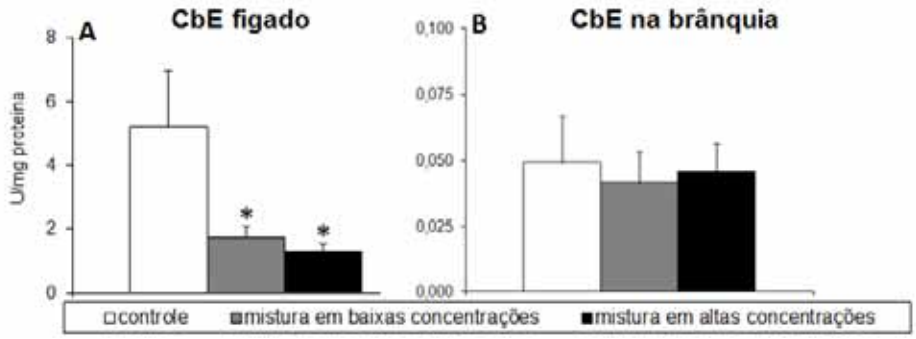


Figura 15: Atividade de enzima carboxilesterase no fígado e na brânquia de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição às misturas dos contaminantes. Baixas concentrações: 10 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno; 220 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol. Altas concentrações: 100 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno, 500 $mg.L^{-1}$ de diazinon; 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol. * indica diferença significativa entre o grupo controle ($p < 0,05$). Teste de Dunn.

As misturas dos contaminantes não afetaram os níveis de MDA no fígado das tilápias (Fig. 16-A), porém na brânquia, a mistura em altas concentrações diminuiu o nível de MDA nas tilápias (Fig. 16-B).

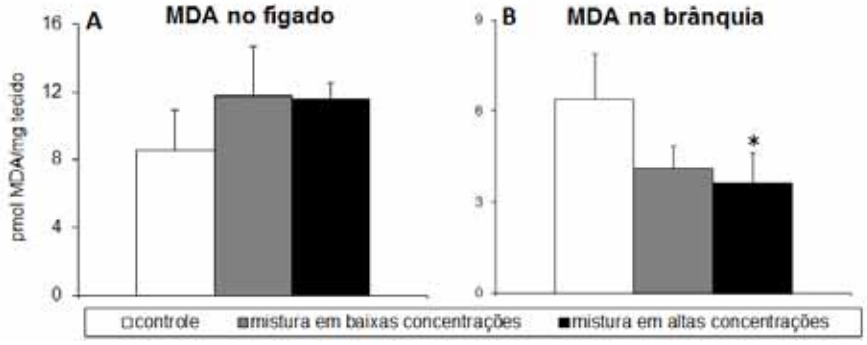


Figura 16: Níveis de malondialdeído no fígado e brânquia de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição às misturas dos contaminantes. Baixas concentrações: 10 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno; 220 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol. Altas concentrações: 100 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno, 500 $mg.L^{-1}$ de diazinon; 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol. * indica diferença significativa entre o grupo controle ($p < 0,05$). Teste de Tukey.

Os níveis de GSH foram afetados nos dois tecidos nas tilápias e de forma diferente pelas misturas. No fígado ocorreu uma diminuição gradual no nível da GSH com o aumento da concentração da mistura dos contaminantes (Fig. 17-A). Na brânquia ocorreu um aumento gradual no nível de GSH com o aumento da concentração da mistura (Fig. 17-B).

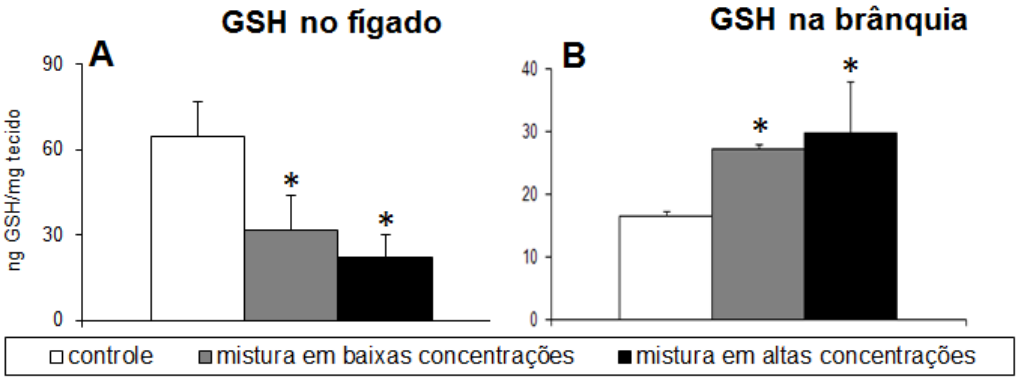


Figura 17: Níveis de glutationa reduzida no fígado e brânquia de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição às misturas dos contaminantes. Baixas concentrações: 10 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno; 220 µg.L^{-1} de diazinon; 0,5 µg.L^{-1} de cipermetrina; 0,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol. Altas concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno, 500 mg.L^{-1} de diazinon; 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina; 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol. * indica diferença significativa entre o grupo controle ($p < 0,05$). Teste de Tukey.

O teste do micronúcleo não mostrou aumentou significativo na frequência de micronúcleos promovido pelas misturas dos contaminantes e as misturas também não causaram alterações na frequência de anormalidades nucleares nos eritrócitos das tilápias (Fig. 18).

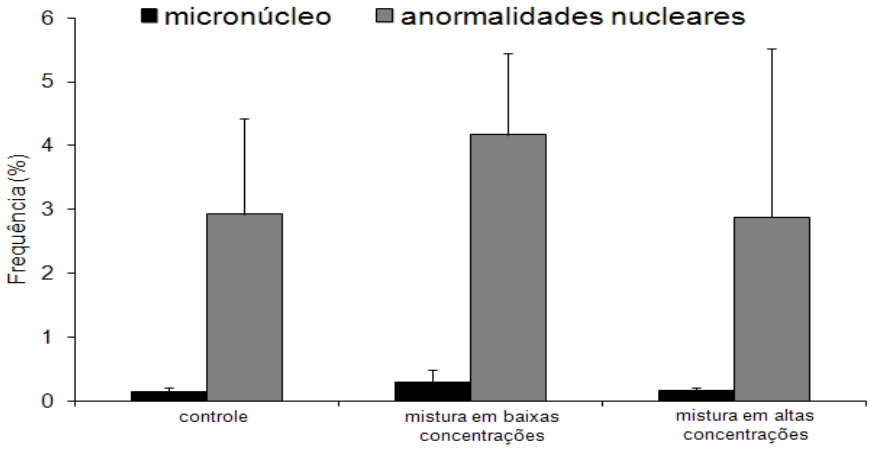


Figura 18: Taxa de micronúcleo e anormalidades nucleares nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição às misturas dos contaminantes. Baixas concentrações: 10 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno; 220 µg.L^{-1} de diazinon; 0.5 µg.L^{-1} de cipermetrina; 0.5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol. Altas concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno; 500 µg.L^{-1} de diazinon; 1.5 µg.L^{-1} de cipermetrina; 2.5 µg.L^{-1} de 17*β*-estradiol.

As frequências de anormalidades foram observadas na seguinte ordem: *notched* > *lobed* > *blebbed* > *brokeneggs*. Não foi observada célula binucleada e cariólise.

Tabela 3: Incidência de anormalidades nucleares (média e desvio padrão) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* após 5 dias de exposição a misturas de contaminantes.

Alterações	Controle	Baixa concentração	Alta concentração
BL	7,2 ± 4,19	2,4 ± 1,51	2,2 ± 2,48
NT	26,0 ± 19,06	48,6 ± 11,10	32,6 ± 29,55
LB	6,2 ± 5,56	5 ± 5,19	6,0 ± 5,65
BE	3,0 ± 1,41	1,6 ± 1,51	1,6 ± 2,60
BN	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
CA	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
MT	7,0 ± 7,23	9,6 ± 4,30	7,0 ± 11,38
TA	352	426	352
NCA	18000	18000	18000

BL: núcleo blebbed; NT: núcleo notched; LB: lobed: BE: brokeneggs; BN: célula binucleada; CA: cariólise; MT: média total; TA: total de células analisadas com alterações; NCA: número total de células analisadas.
Baixa concentração: 10 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno; 220 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon; 0.5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 0.5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol. Alta concentração: 100 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno; 500 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon; 1.5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 2.5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol. Teste de Kruskal-Wallis.

III. Discussão

Analisando a interação concentração-resposta, a curva de efeito para a atividade da CbE mostrou que à medida que aumenta a concentração do diazinon, a atividade da enzima no fígado diminui linearmente.

O OP clorpirifos a 10^{-4} M inativou a CbE, *in vitro*, no crustáceo *Procambarus clarkii* (VIOQUE-FERNÁNDEZ *et al*., 2007) e no girino de *Scinax fuscovarius*, 1 e 3 $mg.L^{-1}$ de diazinon causou inibição da CbE após 2 dias (LEITE *et al*., 2010). Em *O. niloticus* Tridico *et al*. (2010) observaram inibição da CbE após 5 dias com 500 $\mu g.L^{-1}$.

As CbEs são enzimas que hidrolisam compostos xenobióticos que contenham grupamento éster como os piretróides, assim a cipermetrina poderia induzir a atividade da enzima, que atuaria na sua metabolização mas isso não foi observado. Wheelock *et al*. (2005) testaram o PI esfenvalerato de 0,01 a 1 $\mu g.L^{-1}$ em *Chinook salmon* a também não observaram efeito do composto ne espécie. Em mamíferos sabe-se que as isoformas hCE-1 e hCE-2 hidrolisam os piretróides (ROSS *et al*., 2006). Porém para peixes as isoformas envolvidas nesse processo ainda não estão estabelecidas.

Na representação gráfica da relação dose-resposta, as curvas de efeito são geralmente sigmóides, para a maioria dos compostos químicos e a curva de distribuição normal sigmóide tem uma proporção linear entre 16 e 84% (KLAASSEN; WATKINS, 2011). A curva correspondente à ação de estrogênios e substâncias que mimetizam os estrogênios tem a forma de U invertido, num conceito conhecido por *Hormese*. Caracteristicamente para compostos químicos em geral a resposta é proporcional à dose até um limite máximo de resposta. Para hormônios em geral, na *hormese*, os efeitos benéficos são promovidos por doses baixas, sendo que as doses maiores tendem a desativar o sistema de resposta ou produzir efeitos adversos.

Observamos na curva de efeito para a atividade da BROD em função do E2 que à medida que aumenta a concentração do hormônio inicialmente a atividade aumenta, porém, à proporção que a concentração continua a crescer, a atividade passa a decrescer, numa relação parabólica. Esse resultado sugere a participação da enzima de fase *I* BROD na metabolização do E2.

O aumento nas atividades de enzimas de biotransformação de fases *I e II*, como citocromo P450 e GST, respectivamente, são considerados os primeiros sinais biológicos da presença de contaminantes indutores da biotransformação no ambiente aquático, como HPAs, por exemplo (VAN DER OOST *et al*., 2003).

Não observamos efeito na atividade da EROD no fígado das tilápias promovido pelo BaP em nenhuma das concentrações testadas. Esse achado pode ser atribuído ao período de exposição, a concentração do composto para a massa corpórea dos peixes. O BaP é um típico indutor da EROD. Curtis *et al.* (2011) relataram aumento na atividade da enzima em *Oncorhynchus mykiss* expostas a 3 µg BaP/g peixe/dia por 3 e 14 dias e Brammell *et al*. (2010), em *Lepomis macrochirus* submetidos a 10 e 50 mg/kg do BaP por 7 dias. Tridico *et al*. (2010) observaram aumento da EROD em *O. niloticus* expostas a 500 $\mu.L^{-1}$ de BaP por 3 dias e os peixes eram menores.

Não observamos efeito na atividade da EROD no fígado das tilápias promovido pelo diazinon em nenhuma das concentrações testadas. Wheelock *et al*. (2005) avaliaram o efeito do OP clorpirifos na espécie *Oncorhynchus tshawytscha* e detectaram diminuição na atividade da EROD nos peixes submetidos a dose subletal de 7,3 $\mu g.L^{-1}$ enquanto que os peixes submetidos a 1,2 $\mu g.L^{-1}$ apresentaram leve diminuição na atividade da enzima, após 4 dias; nesse caso o efeito se mostrou concentração -

dependente. Flammarion *et al.* (1998) também relataram que o OP metidation a 30 $\mu g.L^{-1}$ aumentou a EROD na espécie *Gobio gobio* após 4 dias. Assim, os efeitos de agrotóxicos OP sob CYP1A variam para compostos diferentes dessa categoria, em espécies diferentes de peixes.

Segundo Wheelock *et al*. (2005) o efeito dos compostos OP no CYP é resultante da metabolização mediada pelas isoformas a que estão sujeitos esses compostos; a dessulfuração dos OP pelo CYP (subfamílias 2 e 3A) leva a liberação de um íon enxofre livre que se liga ao grupamento heme do CYP1A, inibindo sua atividade catalítica na biotransformação do OP. Trabalhos anteriores em nosso laboratório também mostraram diminuição na atividade da EROD pelo diazinon em *O. niloticus* (RODRIGUES, 2009; TRIDICO *et al*., 2010) revelando ser a atividade EROD um biomarcador sensível a contaminação por diazinon. Tridico *et al.* (2010) observaram inibição da EROD pelo por diazinon 500 $\mu.L^{-1}$ por 2 dias sendo as tilápias menores o que mostra a atividade EROD como biomarcador sensível ao OP.

Não observamos efeito na atividade da EROD no fígado das tilápias promovido pela cipermetrina em nenhuma das concentrações testadas. O PI deltametrina causou aumento na atividade da EROD em *Ancistrus multispinis* a 300 e 400 $\mu g.L^{-1}$ por 4 dias (ASSIS *et al*., 2009) e em cultura de hepatócitos de mamíferos foi relatado aumento na atividade da EROD pela cipermetrina (SOUZA *et al*., 1997) sugerindo a atuação de CYP1A na metabolização de piretróides.

O E2 é conhecido por reduzir a atividade EROD nos organismos aquáticos. Teles *et al*. (2005) relataram diminuição na atividade da enzima em *Sparus aurata* com 4 $\mu g.L^{-1}$ do E2 após 4 horas. Navas e Segner (2001) descrevem dois eventos: inibição direta pelo E2 do sítio catalítico da enzima CYP1A e a ligação do E2 com seu receptor-estrógeno inibe a transcrição de CYP 1A.

Observamos aumento na atividade da EROD pela concentração de 2,5 $\mu g.L^{-1}$ do E2. Teles *et al.* (2004) expuseram *Dicentrarchus labrax* a 36 $\mu g.L^{-1}$, uma concentração mais de 10 vezes mais alta, por 24 horas e não observaram efeito na enzima e expuseram *D. labrax* a 2 $\mu g.L^{-1}$ por 10 dias e também não observaram efeito (TELES *et al.*, 2006). Esses achados podem sugerir que concentração elevada do hormônio ou período de exposição mais prolongado não revelaria uma resposta na atividade da EROD.

Segundo Badawi *et al.* (2001) a CYP1 A1 participa da metabolização do E2 em tecidos extra hepáticos em humanos. Esse relato poderia explicar nosso achado para a concentração de 2,5 $\mu g.L^{-1}$, onde o fígado, quando o organismo submetido a alta concentração do hormônio, passaria a atuar na metabolização dele.

As atividades PROD e BROD são biomarcadores que também têm se mostrado sensíveis em estudos de biomonitoramento, porém, são estudados com menos frequência em peixes, sendo a BROD ainda menos avaliada, e ainda não se sabe qual (is) isoforma(s) específica de P450 é responsável pela atividade dessas duas enzimas em peixes.

Bitencourt *et al* (2011) observaram aumento da PROD em *O. niloticus* expostas a 15 $\mu g.L^{-1}$ de E2, contrariando nossos achados, onde observamos diminuição na enzima com 5 $\mu g.L^{-1}$ de E2.

Já a BROD parece atuar na metabolização da cipermetrina e do BaP, segundo nossos resultados. Porte *et al*. (2002) em estudo de biomonitoramento diagnosticaram aumento de atividade da PROD em *Mullus barbatus* residentes em local contaminado com HPAs. Mortensen e Arukwe (2009) observaram em *Salmo salar* aumento na atividade da BROD, PROD e EROD por exposição ao tributilestanho de 1 a 5 µM, de 12 a 48 horas.

Analisando a interação concentração-resposta, a curva de efeito para a atividade da PROD mostrou que à medida que aumenta a concentração do BaP, a atividade da enzima no fígado diminui linearmente.

Meimberg *et al.* (1997) observaram aumento na atividade da EROD, BROD e PROD em gastrópodes expostos ao Aroclor (mistura de bifenilas policloradas). Parente *et al.* (2004) detectaram aumento na EROD e PROD em *O. niloticus* residentes no rio Guandú, principal abastecedor de água da cidade do Rio de Janeiro alertando para a presença de indutores de CYP1A no local como HPAs.

Ainda que trabalhos indiquem que o BaP (TRIDICO *et al.* 2010), a cipermetrina (GOWLAN *et al*., 2002) e o diazinon (PINER *et al*., 2007) induzem a GST, no presente trabalho esses compostos, nas condições testadas, não foram capazes de alterar a atividade dessa enzima. É possível que maiores concentrações ou tempo de exposição fosse necessário para causar aumento na atividade da GST. Com relação à exposição ao E2, causou um decréscimo na atividade da GST, efeito similar ao observado por

Vaccaro *et al*. (2005), que observaram diminuição da GST em *Dicentrarchus labrax* expostos a 0,1 a 5 mg/Kg de E2.

A GST é um potencial biomarcador de *fase II* em organismos aquáticos para o BaP, a cipermetrina e o diazinon. Porém nesse estudo apenas o E2 promoveu diminuição na sua atividade. No entanto a principal enzima de *fase II* que atua no metabolismo do E2 é a glucuronil transferase em humanos (STANCZYK *et al*., 2013), mas essa enzima também é atuante na metabolização do hormônio em peixe (JAMES, 2011). Vaccaro *et al*. (2005) relatam que doses de 0.1 a 5 mg/kg em exposições de 3 a 14 dias causaram diminuição da GST em *Dicentrarchus labrax*. Abel *et al.* (2004) observaram que metabólitos de E2 inibem a GST em humanos.

Em relação às misturas dos contaminantes, para as enzimas de fase *I*, somente a EROD e a BROD foram responsivas, induzidas provavelmente pelo BaP, cipermetrina mas principalmente pelo E2, conforme os resultados da resposta individual aos compostos. A PROD, que não foi induzida pelos contaminantes individualmente, também não foi pelas misturas.

A GST que também não foi induzida pelos contaminantes individualmente no fígado, não foi pelas misturas, nem no fígado nem na brânquia revelando que a associação dos compostos nas concentrações testadas não teve efeito potencializador sobre a enzima. Porém a brânquia mostrou uma leve tendência à indução, mas não significativa.

A atividade da AChE no encéfalo mostrou uma ligeira inibição pela mistura na maior concentração, porém não significativa. Nesse caso esse efeito possivelmente seria atribuído aos agrotóxicos. A AChE é uma *B*-esterase e como já foi discutido, é potencialmente inibida por compostos OP como o diazinon, A cipermetrina , um PI, também tem mostrado efeito inibidor sobre a AChE. Kumar *et al*., (2009) relatou inibição da enzima no encéfalo de *Channa punctatus* com 60 $\mu g.L^{-1}$ após 3 dias.

As misturas se mostraram inibidoras da CbE, nas duas concentrações, e no fígado apenas, sugerindo um mecanismo protetor nas brânquias contra o efeito do diazinon pela CbE . No fígado a atividade da CbE foi inibida pelo diazinon individualmente pela menor concentração em 40% e pela maior em 50%. Já na mistura em baixa concentração, a inibição foi de 67% e em alta concentração foi de 75%. Possivelmente a mistura dos agrotóxicos potencializou o efeito sobre a enzima, pois

Elhalwagy e Zaky (2009) observaram em rato que, a associação do diazinon com o deltametrina, um PI, inibe mais intensamente a CbE no sangue do que quando usado individualmente.

Os níveis de MDA no fígado mostraram uma leve tendência ao aumento, porém não significativo enquanto que na brânquia, a mistura em maior concentração, diminuiu o nível de MDA revelando atuação do sistema de defesa antioxidante neutralizando os radicais livres gerados na biotransformação dos contaminantes e que causaram peroxidação lipídica. A mistura em menos concentração mostrou uma leve diminuição no nível de MDA também sugerindo uma resposta do tecido contra os contaminantes, apesar de não significativo (Chung *et al.,* 2013).

Enquanto no fígado ocorreu depleção de GSH proporcional ao aumento na concentração dos contaminantes nas misturas, na brânquia o efeito foi inverso, ocorrendo estímulo de síntese proporcional ao aumento na concentração dos contaminantes. Porém os efeitos não são concentração-dependente. A GSH está entre as principais defesas celulares antioxidantes e que participam da detoxicação de compostos químicos. É uma potente molécula nucleofílica e redutora, neutralizando radicais livres como metabólitos na lipoperoxidação e atuando como cofator da GST (Hellou *et al.,* 2012).

O teste do micronúcleo não revelou genotoxicidade ocasionada pelas misturas dos contaminantes aos eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. As anormalidades foram mais frequentemente observadas em relação aos micronúcleos e elas são mais espontaneamente encontradas (Çavas e Ergene-Gözükara, 2003). Segundo Fenechand e Crott (2002), anormalidades nucleares em linfócitos humanos tem se mostrado em condição de deficiência de ácido fólico.

No experimento de exposição às misturas a brânquia se mostrou mais sensível às respostas à mistura dos contaminantes para indicadores de estresse oxidativo. O estímulo de síntese de GSH revela uma resposta mais tardia que corrobora com a diminuição no nível de MDA. No fígado a resposta acarretada pelas misturas dos contaminantes foi mais inicial, de depleção de GSH ainda. Além de que houve na brânquia uma discreta tendência ao aumento da atividade da GST com o aumento da concentração das misturas.

Para as enzimas de fase *I* o fígado se mostrou sensível e as atividades da EROD e da BROD se mostraram concentração-dependente e apesar dessa indução da fase *I* os resultados como um todo parecem não indicar forte indício de estresse oxidativo celular no fígado, pois não ocorreu aumento significativo na atividade da GST e principalmente alteração no nível de MDA.

A diminuição no nível de MDA na brânquia foi concentração-dependente. Os achados sugerem que quanto maior a concentração dos contaminantes na mistura, mais o estresse oxidativo gerado em nível celular acarretando em metabólitos da peroxidação lipídica, como o MDA.

Para o experimento de exposição individual aos contaminantes, nossos resultados sugerem que a BROD atua na biotransformação do BaP, cipermetrina e do E2. Nas concentrações testadas, o E2 diminuiu as atividades da PROD e GST e aumentou EROD e o diazinon, como clássico inibidor de esterase, inibiu a CbE, em *Oreochromis niloticus*

Também pôde se concluir que a espécie respondeu de forma adversa quando submetida a concentrações diferentes dos contaminantes e a resposta foi concentração – dependente para a atividade da CbE em função do diazinon e da BROD em função do E2.

As conclusões do experimento I nos levaram a determinar as concentrações que seriam usadas nos próximos experimentos, com misturas. Como as concentrações mais baixas e intermediárias causaram efeitos, foram essas escolhidas para as misturas em baixas concentrações (as menores) e altas concentrações (as intermediárias). As concentrações mais altas do experimento I não foram selecionadas por receios de serem excessivamente altas de forma a levarem à morte dos peixes.

Capítulo II

Capítulo II

Pré-exposição ao 17*β*-estradiol por 3 dias, seguida de exposição ao benzo(a)pireno por mais 5 dias e pré-exposição ao BaP seguida de exposição ao 17*β*-estradiol por mais 5 dias

Como já discutido o BaP é reconhecido indutor da EROD e o E2 é potencial inibidor da enzima, mas não há estudos que relatam a associação dos dois compostos, quando o organismo é pré-exposto a um desses e posteriormente é exposto ao outro, não se conhecendo então os efeitos dessa interação na atuação da enzima.

Não se sabe também, se a ordem de exposição seqüencial de compostos pode acarretar em respostas diferentes, ou seja, se ao pré-expor os peixes ao E2, seguido do BaP, se a resposta será a mesma que pré-expor os animais ao BaP seguido do E2.

Objetivos

- Testar se os efeitos do BaP são alterados pela pré-exposição ao E2?
- Testar se os efeitos do E2 são alterados pela pré-exposição ao BaP?

1. Material e Métodos

Os espécimes de tilápias usados foram todos machos adultos. Os peixes foram cedidos pela APTA e então transferidos para a EMBRAPA – Meio Ambiente.

No experimento de pré-exposição ao E2 seguido de exposição ao BaP foram usados peixes de 192,42 ± 26,59 e 18,43 ± 0,86 cm e no experimento de pré-exposição ao BaP seguido de exposição ao E2, peixes de 168,82 ± 25,33 g e 18,44 ± 1,57 cm.

Durante os experimentos os peixes foram mantidos em aquários de vidro de 80 x 50 x 50 cm (comprimento x largura x altura) com 100 litros de água declorada, de poço artesiano, sob constante aeração e temperatura controlada de 25 ± 0,5^{o} C e privados de alimentação durante o período de experimental. Antes da adição dos contaminantes eles foram aclimatados nos aquários por 3 dias.

O experimento III foi feito em repetição por blocos (três blocos). Cada bloco foi constituído por 4 aquários, formando 1 grupo controle e 2 aquários receberam 17*β*-estradiol. Após 3 dias, 1 desses aquários recebeu BaP e o quarto aquário, que não continha nenhum tratamento, também recebeu BaP. A figura 19 ilustra 1 bloco, assim no total foram usados 48 peixes (12 por bloco). Ao final de 8 dias de exposição, os animais foram coletados para análise. As concentrações de usadas foram de benzo(a)pireno: 100 µg.L^{-1} e de 17β-estradiol: 2,5µg.L^{-1}.

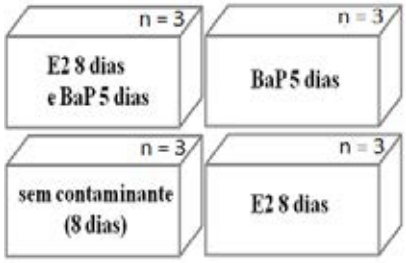


Figura 19: Representação esquemática de 1 bloco do experimento III, no qual um grupo de tilápias *Oreochromis niloticus* foi pré-exposto ao 17*β*-estradiol por 3 dias e depois exposto ao benzo(a)pireno por mais 5 dias, totalizando 8 dias de exposição. Concentrações: de 100 µg.L^{-1} benzo(a)pireno e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol.

O experimento IV também foi feito em repetição por blocos (3 blocos). Cada bloco foi constituído por 4 aquários, formando 1 grupo controle e 2 aquários receberam benzo(a)pireno. Após 3 dias, um desses aquários recebeu 17*β*-estradiol e o quarto aquário, sem tratamento, também recebeu E2. Ao fim de 8 dias, os animais foram coletados para analises. A figura 19 ilustra um bloco, assim no total foram usados 48 peixes (12 por bloco). As concentrações de usadas foram de benzo(a)pireno: 100 µg.L^{-1} e de 17β-estradiol: 2,5µg.L^{-1}.

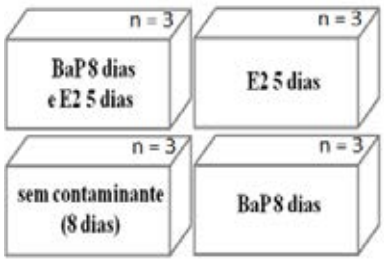


Figura 19: Representação esquemática de 1 bloco do experimento IV, no qual um grupo de tilápias *Oreochromis niloticus* foi pré-exposto ao benzo(a)pireno por 3 dias e depois exposto ao 17*β*-estradiol por mais 5 dias, totalizando 8 dias de exposição. Concentrações: de 100 µg.L^{-1} benzo(a)pireno e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol.

Transcorridos os períodos experimentais, os peixes foram sedados com benzocaína (65 mg/L de água) e sacrificados por secção cervical e o fígado, brânquias e encéfalo foram dissecados e coletado sangue.

A atividade da CbE e da AChE foi medida pelo método de Ellman *et al*. (1961). As atividades da EROD, BROD e PROD foram avaliadas segundo o método de Burke e Mayer (1985). A análise da GST foi realizada segundo o método de Keen *et al*. (1976). A quantificação de proteínas total das amostras foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Os níveis de MDA foram quantificados por HPLC com detector UV e monitorados a 532 nm (ALMEIDA *et al*., 2004; 2003). A análise de GSH foi realizada por meio de HPLC acoplado a um detector eletroquímico, seguindo a metodologia de Rodríguez-Ariza *et al*. (1994). Para o teste do micronúcleo e anormalidades nucleares, após a fixação dos esfregaços procedeu-se o processo de coloração pela reação de *Schiff*.

Para os dados foram aplicados o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste de homogeneidade das variâncias (Levene). Para dados paramétricos e homogêneos aplicou-se Anova *one-way* seguido do teste *post hoc* de Tukey. Para os dados não paramétricos e/ou não homogêneos foi aplicado Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn.

II. Resultados

O E2 inibiu a atividade da EROD no fígado das tilápias após 5 dias de exposição. O grupo exposto ao somente ao BaP apresentou atividade da enzima aumentada em relação ao grupo pré-exposto ao E2 por 3 dias e posteriormente exposto ao BaP por 5 dias (Fig. 20).

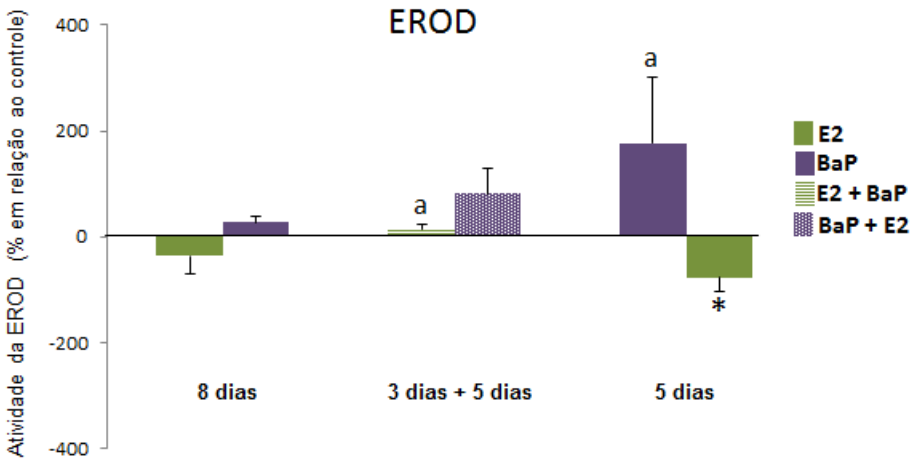


Figura 20: Atividade da enzima EROD (7-etóxiresorufina *O*-desalquilase) no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17*β*-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letras iguais indicam diferença significativa. P-valor < 0,05foi considerado significativo. Teste de Dunn.

O E2 induziu a atividade da enzima BROD no fígado das tilápias após 8 dias de exposição e a pré-exposição ao E2 seguida da exposição ao BaP e a pré-exposição ao BaP seguida da exposição ao E2 . A pré-exposição ao BaP induziu a atividade da enzima em relação ao grupo exposto ao BaP por 8 dias e em relação ao grupo exposto ao E2 por 5 dias (Fig. 21).

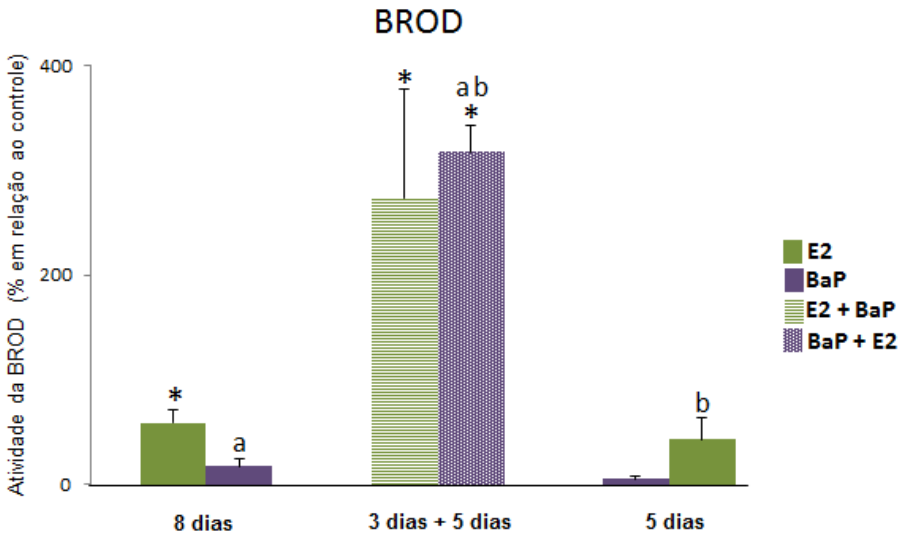


Figura 21: Atividade da enzima BROD (7-benzilóxiresorufina *O*-desalquilase) no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17*β*-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letras iguais indicam diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Dunn.

O BaP diminuiu a atividade da enzima PROD no fígado das tilápias após 8 dias de exposição ao BaP e os tratamentos de pré-exposições não afetaram a atividade da enzima (Fig. 22).

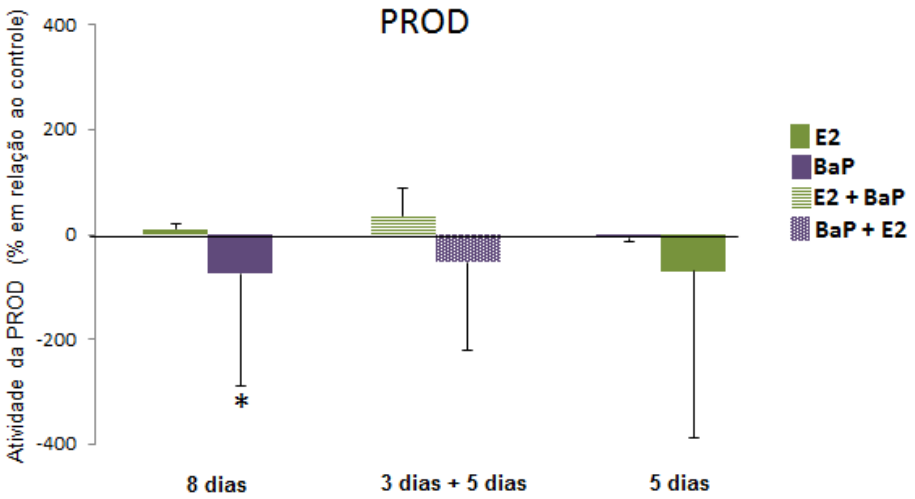


Figura 22: Atividade da enzima PROD (7-pentilóxiresorufina *O*-desalquilase) no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17*β*-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Anova one-way para o experimento III. Teste de Dunn para o experimento IV.

Os grupos expostos ao E2 por 8 dias, pré-exposto ao E2 por 3 dias e posteriormente exposto ao BaP por mais 5 dias, e exposto ao BaP por 5 dias, apresentaram aumento na atividade da GST no fígado. O grupo pré-exposto ao BaP por 3 dias e posteriormente exposto ao E2 por mais 5 dias apresentou atividade da enzima diminuída em relação grupo exposto somente ao E2 e em relação ao controle (Fig. 23).

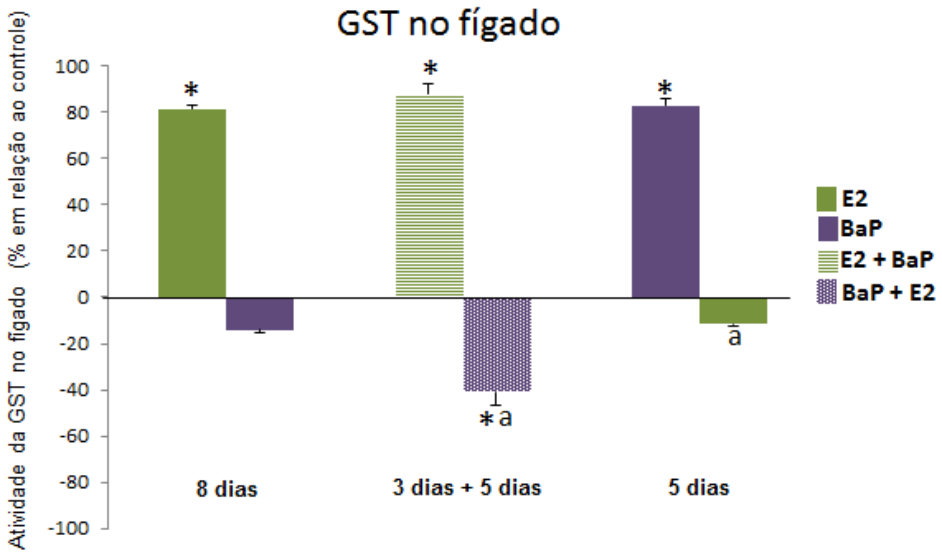


Figura 23: Atividade da enzima glutationa *S*-transferase no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17*β*-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Tukey para o experimento III e Teste de Dunn para o experimento IV.

As tilápias expostas ao BaP por 8 dias apresentaram aumento da atividade da GST na brânquia. Os tratamentos de pré-exposições não afetaram a atividade da enzima (Fig. 24)

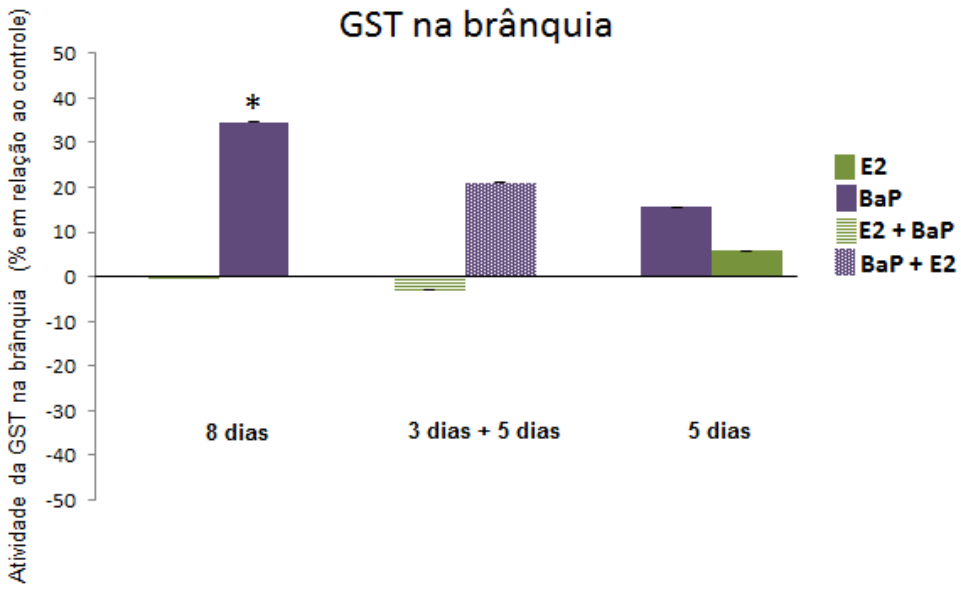


Figura 24: Atividade da enzima glutationa *S*-transferase na brânquia de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Anova one-way para o experimento III. Teste de Dunn para o experimento IV.

A atividade da enzima AChE no encéfalo das tilápias não foi afetada significativamente por nenhum dos tratamentos (Fig. 25)

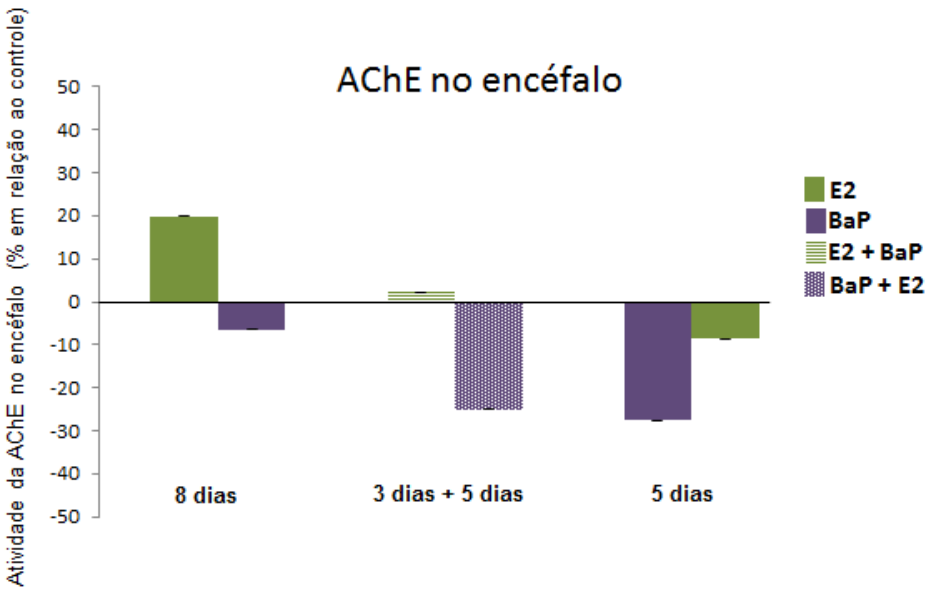


Figura 25: Atividade da enzima acetilcolinesterase no encéfalo de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. Teste de Kruskal-Wallis.

O E2 aumentou a atividade da CbE no fígado das tilápias após 5 dias e o grupo pré-exposto ao E2 por 3 dias e posteriormente exposto ao BaP por 5 dias teve a atividade da enzima diminuída (Fig. 26).

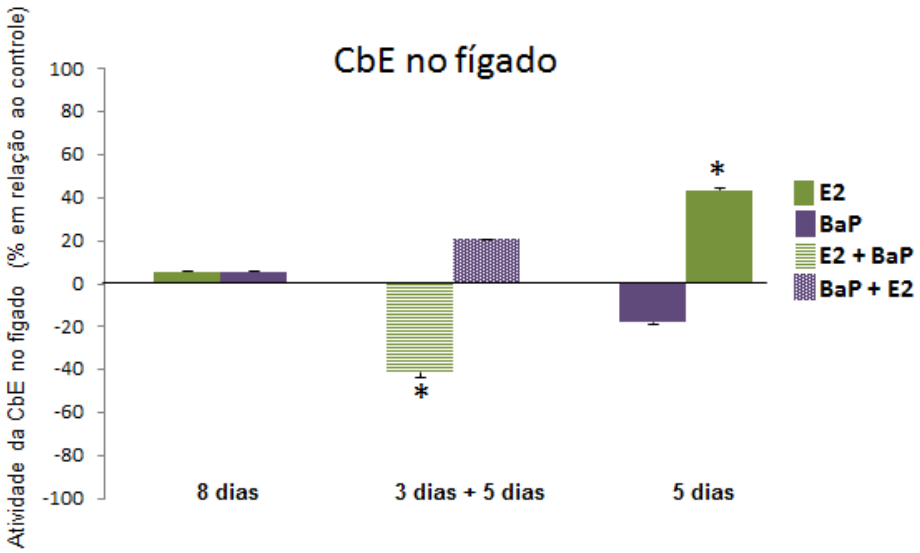


Figura 26: Atividade da enzima carboxilesterase no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Dunn.

A atividade da enzima CbE na brânquia das tilápias não foi afetada significativamente por nenhum dos tratamentos (Fig. 27).

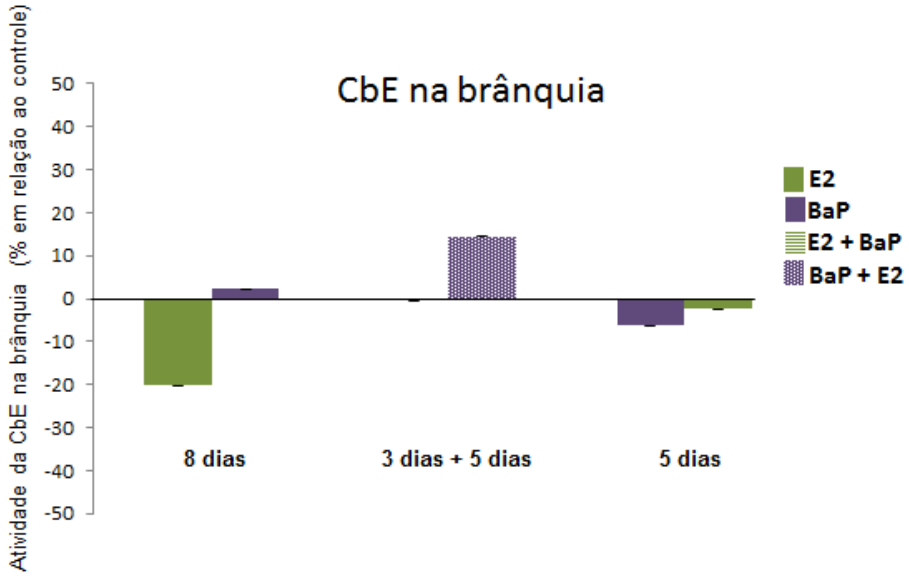


Figura 27: Atividade da enzima carboxilesterase na brânquia de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. Teste de Kruskal-Wallis.

Os níveis de MDA no fígado das tilápias não foram afetados significativamente por nenhum dos tratamentos (Fig. 28).

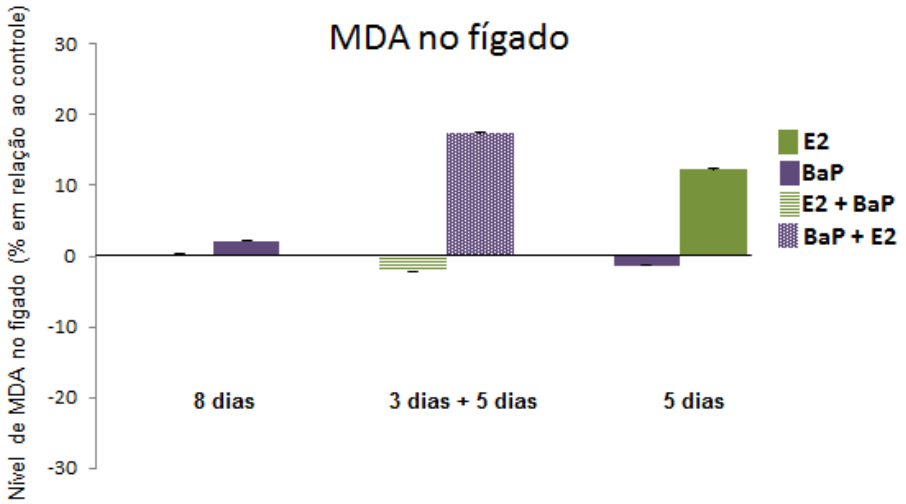


Figura 28: Níveis de malondialdeído no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. Anova one-way.

Os níveis de MDA na brânquia das tilápias não foram afetados significativamente por nenhum dos tratamentos (Fig. 29).

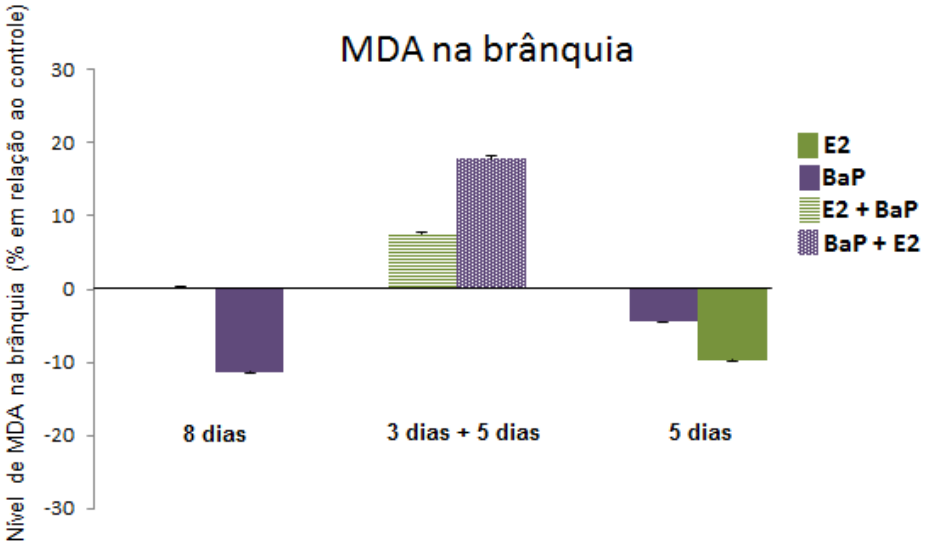


Figura 29: Níveis de malondialdeído na brânquia de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. Anova one-way.

O BaP após 5 dias aumentou o nível de GSH no fígado das tilápias. Também ocorreu um aumento no nível de GSH no grupo exposto somente ao BaP em relação ao grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto ao BaP. O grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto ao E2 apresentou diminuição no nível de GSH em relação ao grupo exposto somente ao BaP (Fig. 30).

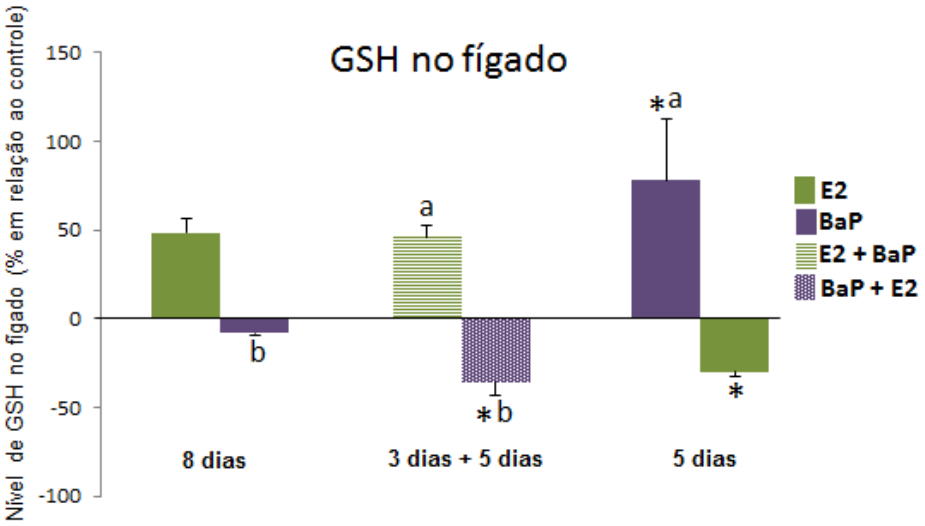


Figura 30: Níveis de glutationa reduzida no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Dunn para o experimento III e Teste de Tukey para o experimento IV.

O BaP e o E2 causaram depleção de GSH na brânquia das tilápias após 5 dias e as duas associações de pré-exposição seguida de exposição aos contaminantes. A depleção foi maior no grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto ao BaP em relação ao grupo exposto somente ao E2 e no grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto ao E2 em relação ao grupo exposto somente ao BaP (Fig. 31).

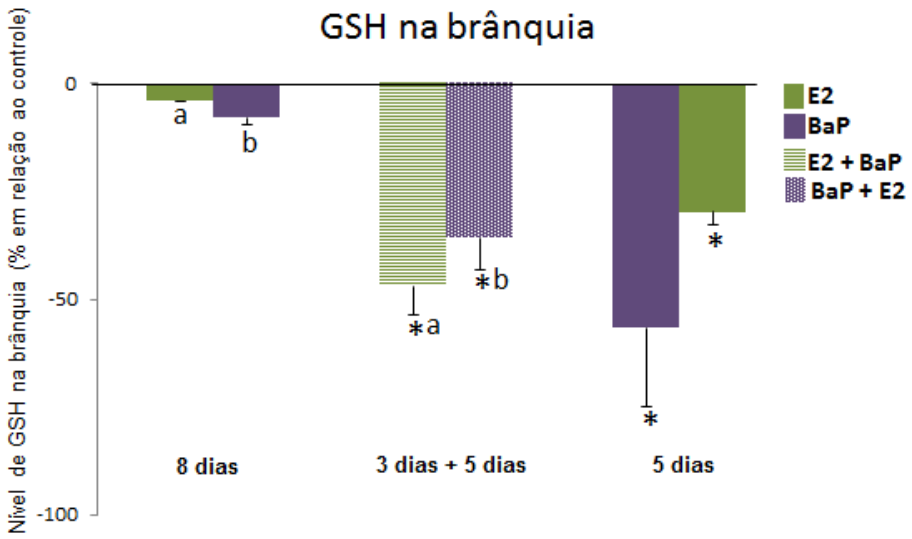


Figura 31: Níveis de glutationa reduzida na brânquia de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição às misturas dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro contaminante). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Tukey para o experimento III e Teste de Dunn para o experimento IV.

Em relação à genotoxicidade, não houve diferença para taxa de micronúcleos entre os grupos no experimento de pré-exposição ao E2 seguido de exposição ao BaP porém para anormalidades nucleares nos eritrócitos das tilápias, o grupo pré-exposto ao HPA e depois exposto ao hormônio apresentou maior taxa de alterações do que o grupo exposto somente ao hormônio (tabela 4).

Tabela 4: Incidência de micronúcleos e anormalidades nucleares (média e desvio padrão) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição a misturas de contaminantes (3 dias de pré-exposição ao 17β-estradiol seguido de 5 dias de exposição ao benzo(a)pireno).

Alterações	**Controle**	**E2 8 dias**	**E2 8 dias e BaP 5 dias**	**BaP 5 dias**
MN	3,8 ± 8,28	1,4 ± 1,67	6,7 ± 5,39	3,8 ± 2,79
BL	4,7 ± 6,83	4,0 ± 3,74	10,2 ± 13,35	7,5 ± 6,76
NT	65,6 ± 35,54	16,2 ± 7,80	62,8 ± 21,45	52,3 ± 22,18
LB	13,5 ± 6,91	7,3 ± 9,89	30,5 ± 17,55	22,0 ± 11,48
BE	1,3 ± 2,39	0,3 ± 0,70	0,7 ± 1,20	0,8 ± 1,36
BN	0,3 ± 1,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,33	0,1 ± 0,33
CA	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
MT	14,2 ± 8,78	4,6 ± 3,69	17,4 ± 8,98	13,8 ± 7,02
TA	1542	1198a	1882a	1492
NCA	36000	36000	36000	36000

MN: micronúcleos; BL: núcleo *blebbed*; NT: núcleo *notched*; LB: lobed: BE: *brokeneggs*; BN: célula binucleada; CA: cariólise; MT: média total; TA: total de células analisadas com alterações; NCA: número total de células analisadas. Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2).Letras iguais indicam diferença significativa. Teste de Dunn.

As frequências de anormalidades foram observadas na seguinte ordem: *notched* > *lobed* > *blebbed* > *brokeneggs* > célula binucleada. Não foi observada cariólise.

No experimento de pré-exposição ao BaP seguido de exposição ao E2 não houve diferenças nas taxas de micronúcleos e anormalidades nucleares nos eritrócitos das tilápias (tabela 5).

Tabela 5: Incidência de micronúcleos e anormalidades nucleares (média e desvio padrão) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição a misturas de contaminantes (3 dias de pré-exposição ao benzo(a)pireno seguido de 5 dias de exposição ao 17β-estradiol).

Alterações	**Controle**	**BaP 8 dias**	**BaP 8 dias e E2 5 dias**	**E2 5 dias**
MN	10,0 ± 9,48	10,0 ± 8,02	10,0 ± 18,84	7,1 ± 6,30
BL	0,7 ± 1,20	0,3 ± 0,51	3,4 ± 4,00	0,7 ± 0,83
NT	63,5 ± 49,57	33,0 ± 16,23	79,4 ± 4,00	71,7 ± 64,01
LB	15,7 ± 9,47	16,7 ± 13,01	20,3 ± 3,00	10,6 ± 7,26
BE	0,0 ± 0,00	0,2 ± 0,44	0,7 ± 8,00	0,2 ± 0,44
BN	0,0 ± 0,00	0,2 ± 0,44	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
CA	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
MT	13,3 ± 10,04	8,4 ± 5,10	17,3 ± 3,00	13,9 ± 12,09
TA	1442	1402	1872	1502
NCA	36000	36000	36000	36000

MN: micronúcleo; BL: núcleo *blebbed*; NT: núcleo *notched*; LB: lobed: BE: *brokeneggs*; BN: célula binucleada; CA: cariólise; MT: média total; TA: total de células analisadas com alterações; NCA: número total de células analisadas. Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP) e 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Teste de Kruskal-Wallis.

As frequências de anormalidades foram observadas na seguinte ordem: *notched* > *lobed* > *blebbed* > *brokeneggs* > célula binucleada. Não foi observada cariólise.

III. Discussão

Na atividade da EROD no fígado das tilápias o efeito inibidor do E2 se sobressaiu ao efeito indutor da enzima pelo BaP em associação com o E2. Já na situação contrária, a reversão da taxa de inibição na atividade da EROD pela associação dos dois compostos causada pela posterior exposição ao E2 não foi significativa. Assim esses achados mostram que a ordem na interação dos dois contaminantes causam efeitos diferentes na atividade da EROD.

A atividade da BROD no fígado das tilápias foi induzida pelas pré-exposições ao BaP e ao E2 sugerindo, independente da ordem, que o histórico de pré-exposição a um composto pode induzir a uma isoforma da fase *I* da biotransformação e um posterior exposição a outro composto aumenta ainda mais a atividade dela. Esses achados sugerem que a associação desses compostos potencializa a atuação desta isoforma do P450.

A atividade da PROD no fígado das tilápias não foi afetada pelas associações do BaP com o E2 em nenhuma ordem, sugerindo que essas situações de pré-exposições testadas não induzem essa isoforma que atuaria na biotransformação dos compostos.

A atividade da GST no fígado das tilápias se mostrou aumentada em todos os grupos do experimento de pré-exposição ao E2, sem diferença no nível de atividade entre os grupos, revelando que a associação do E2 com o BaP não potencializou a indução da fase II da biotransformação. Já a pré-exposição ao BaP potencializou a atividade da enzima mostrando que o composto potencializa a indução da fase II em comparação ao E2 apenas. Esses achados revelam que a ordem da associação dos compostos, nesse caso, influencia na resposta de indução da GST no fígado das tilápias.

Diferentemente do fígado as duas situações de associações do BaP e E2 não induziram a GST na brânquia das tilápias.

A AChE no encéfalo também não foi afetada mas isso deve ser atribuído ao fato dos compostos BaP e E2 não apresentarem efeitos específicos nas *B*-esterases. No entanto o E2 aumentou a atividade da CbE no fígado das tilápias e a pré-exposição ao E2 seguida da exposição ao BaP diminuiu a atividade da enzima. A CbE embora seja uma *B*-esterase, é uma enzima de biotransformação de ésteres e amidas (das amidas, a hidrólise ocorre de forma mais lenta). A estrutura química do E2 não apresenta grupamento éster nem amida, mas pode ser que metabólitos do hormônio apresentem, justificando a indução da enzima pelo E2. De qualquer forma, os resultados mostraram que quando as tilápias foram pré-expostas ao BaP e depois expostas ao E2 esse efeito de aumento na atividade da enzima não foi observado, pelo contrário, ocorreu diminuição na atividade da enzima. Esses achados mostraram que um histórico prévio de exposição ao BaP pode mudar o efeito na atividade da CbE no fígado de tilápias expostas a E2.

Já na brânquia, as associações do BaP e E2 não afetaram a atividade da CbE sugerindo que a biotransformação desses compostos nesse tecido acontece de forma diferente por essa enzima comparado ao fígado.

Os níveis de MDA não foram afetados pelas associações de BaP e E2 no fígado e brânquia nas condições testadas nas tilápias. Houve indução de enzimas de fase *I*, como EROD e BROD, no fígado, mas conflitando esses achados com os resultados para peroxidação lipídica provavelmente não deve ter ocorrido situação de estresse oxidativo celular promovido pelas associações dos compostos.

No fígado das tilápias, a pré-exposição ao E2 minimizou o estímulo de síntese de GSH que o BaP viria a causar. Porém comparando a exposição ao BaP por 5 e 8 dias, no oitavo dia o nível de GSH caiu e o grupo pré-exposto ao BaP e depois exposto ao E2

apresentou maior depleção em relação a esse grupo mostrando novamente que a associação com o E2 diminuiu o nível de GSH na célula. Assim, no caso do efeito das combinações do BaP e E2 no nível de GSH no fígado das tilápias, a ordem da associação não altera o efeito.

No experimento de pré-exposição ao E2 o estímulo na síntese de GSH, um resposta mais tardia à metabolização, corroboraria com o aumento na atividade da GST observado no fígado, refletindo indução da fase II. Porém no experimento de pré-exposição ao BaP ocorreu depleção de GSH pela mistura dos contaminantes e diminuição da atividade da GST. Nesse caso a glutationa peroxidase pode estar atuando e assim usando a GSH como cofator para neutralizar peróxidos orgânicos que podem vir a ser formados, como outros produtos da peroxidação lipídica, já que o nível de MDA, por exemplo, não variou no fígado (FARBER *et al*. 1990).

Na brânquia só ocorreu depleção de GSH. E esse tecido responde diferente às associações dos compostos. Na pré-exposição ao E2 seguida da exposição ao BaP, o BaP potencializa a depleção de GSH mas na pré-exposição ao BaP seguida da exposição ao E2, o efeito observado é o mesmo do fígado, o E2 potencializa a depleção. Assim, na brânquia alterações nos níveis de GSH nas tilápias independem da ordem da associação dos compostos.

A pré-exposição ao E2 seguida da exposição ao BaP diminuiu a incidência de anormalidades nucleares. Esse efeito protetor do hormônio não foi observado no grupo exposto à associação invertida. Assim os resultados sugerem um efeito protetor prévio do E2 contra uma posterior exposição ao BaP em tilápias mas numa situação de exposição invertida não. Butala *et al*., (2004) relataram que a exposição ao BaP em *Ictalurus punctatus* aumenta a taxa de formação do hidroxiestradiol, um metabólito do E2, que apresenta potencial genotóxico.

Analisando os resultados de forma geral podemos concluir que a pré-exposição ao BaP seguida da exposição ao E2 se mostrou ligeiramente mais responsiva nos biomarcadores avaliados nas tilápias, logo a ordem da pré-exposição a um composto seguida da exposição ao outro composto afeta a maioria das respostas testadas. Nos dois tipos de associações do BaP e E2 testados o fígado, de modo geral, se mostrou mais responsivo do que a brânquia, houve indução da fases *I* (EROD e BROD) e *II* (GST) e variações na atividade da CbE e níveis de GSH.

Os experimentos de pré-exposição ao BaP seguido de exposição ao E2 e pré-exposição ao E2 seguido de exposição ao BaP mostrou que as tilápias responderam que maneira adversa conforme se inverteu a ordem dos tratamentos e a pré exposição ao BaP causou mais respontas nos biomarcadores , provavelmente porque o HPA é um composto xenobiótico, indutor de CYP 1A, que tende a causar situação de extresse oxidativo celular. Também o organismo pré-exposto já apresenta indução do sistema de biotransformação e com isso, metabólito (s) mais tóxico pode estar sendo gerado comprometendo a metabolização nas tilápias.

A atividade EROD (CYP 1A) é induzida por agonista de receptor aril hidrocarboneto (WHYTE *et al*., 2000). Já o E2 inibe CYP 1A por ligação direta no sítio catalítico da enzima e a ligação do hormônio com seu receptor-estrógeno inibe a transcrição da isoforma (NAVAS; SEGNER, 2001).

Winzer *et al.* (2002) expuseram cultura de hepatócitos de *Platichthys flesus* a 1 µM de E2 e 100 µM de BaP e quando associou os dois compostos observaram diminuição da atividade da EROD menor do que a promovida só pelo E2 revelando o efeito da interação dos dois compostos na atividade da EROD nas células do peixe.

Son *et al*., (2002) observaram em cultura de células ID8 de ovários de ratos que a dioxina aumenta a expressão da CYP 1A e que o E2 aumentou a expressão isoforma nas células. Esses dados mostram que a interação de compostos antagonistas e agonistas pode ter efeito adverso sobre o organismo.

Capítulo III

Capítulo III

Pré-exposição ao benzo(a)pireno e ao 17β-estradiol, individualmente, por 3 dias, seguido de exposição aos agrotóxicos diazinon (OP) e cipermetrina (PI), individualmente e associados, por mais 5 dias

É preciso nos defrontar com a problemática do efeito "cocktail" nas respostas metabólicas dos organismos, principalmente no possível envolvimento das enzimas de fase *I*, inibição ou ativação delas - chave na biotransformação - particularmente as CYPs (CELANDER, 2011). Isto irá ajudar substancialmente na interpretação de dados de biomarcadores em situações de exposição a misturas complexas de poluentes.

Ainda muito pouco se conhece a respeito dos efeitos da interação de metabólitos na biotransformação de misturas de compostos de catergorias diferentes uma vez que a metabolização de xenobióticos leva a formação de inúmeros subprodutos e a grande maioria deles ainda não foi descrita. Mas estudos estão sendo dados nesse sentido, na tentativa de se tentar elucidar o efeito das misturas complexas nos organismos.

Objetivos

- Testar se os efeitos do BaP, do OP ou do PI são influenciados pela pré-exposição ao E2;
- Testar se os efeitos do E2, do OP ou do PI são influenciados pela pré-exposição ao BaP;
- Testar de a inibição de P450 decorrente da pré-exposição ao E2 potencializa a ação tóxica do OP (inibição de esterases) e, por conseguinte, potencializa a ação tóxica do PI?
- Testar se a biotransformação de (OP + PI) por P450 é efetada pela pré-exposição ao E2?

- Testar se a biotransformação de (OP + PI) por P450 é efetada pela pré-exposição ao BaP?

- Testar qual combinação de mistura de contaminantes afeta mais a espécie?

1. Material e Métodos

Os espécimes de tilápias usados foram todos machos adultos. Os peixes foram cedidos pela APTA e então transferidos para a EMBRAPA – Meio Ambiente.

No experimento de pré-exposição ao E2 seguido de exposição ao BaP foram usados peixes de 146,39 ± 33,57 g e 17,65 ± 1,24 cm.

Durante os experimentos os peixes foram mantidos em aquários de vidro de 80 x 50 x 50 cm (comprimento x largura x altura) com 100 litros de água declorada, de poço artesiano, sob constante aeração e temperatura controlada de 25 ± 0,5^{o} C e privados de alimentação durante o período de experimental. Antes da adição dos contaminantes eles foram aclimatados nos aquários por 3 dias.

No experimento V foram usados 72 peixes divididos em 12 aquários. Grupos foram pré-expostos ao BaP e ao E2 por 3 dias, individualmente, e posteriormente expostos aos agrotóxicos, em mistura e individualmente, por mais 5 dias, conforme ilustra a figura 32. As concentrações usadas foram: 100 μg.L^{-1} de benzo(a)pireno; 500 μg.L^{-1} de diazinon; 1,5 μg.L^{-1} de cipermetrina; 2,5 μg.L^{-1} de 17β-estradiol.

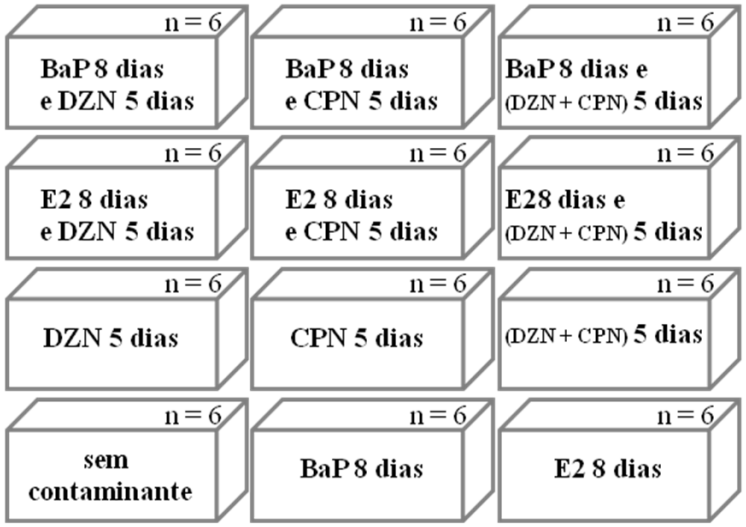


Figura 32: Representação esquemática do experimento V, no qual 3 grupos de tilápias *Oreochromis niloticus* foram pré-expostos ao benzo(a)pireno e 3 grupos foram pré-expostos ao 17*β*-estradiol por 3 dias e depois os grupos foram expostos aos agrotóxicos por mais 5 dias, totalizando 8 dias de exposição. Concentrações: 100 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno; 500 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon; 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina; 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol.

Transcorridos os períodos experimentais, os peixes foram sedados com benzocaína (65 mg/L de água) e sacrificados por secção cervical e o fígado, brânquias e encéfalo foram dissecados e coletado sangue.

A atividade da CbE e da AChE foi medida pelo método de Ellman *et al*. (1961). As atividades da EROD, BROD e PROD foram avaliadas segundo o método de Burke e Mayer (1985). A análise da GST foi realizada segundo o método de Keen *et al*. (1976).

A quantificação de proteínas total das amostras foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Os níveis de MDA foram quantificados por HPLC com detector UV e monitorados a 532 nm (ALMEIDA *et al*., 2004; 2003). A análise de GSH foi realizada por meio de HPLC acoplado a um detector eletroquímico, seguindo a metodologia de Rodríguez-Ariza *et al*. (1994).

Para o teste do micronúcleo e anormalidades nucleares, após a fixação dos esfregaços procedeu-se o processo de coloração pela reação de *Schiff*.

Para os dados foram aplicados o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste de homogeneidade das variâncias (Levene). Para dados paramétricos e homogêneos aplicou-se Anova *one-way* seguido do teste *post hoc* de Tukey. Para os dados não

paramétricos e/ou não homogêneos foi aplicado Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn.

2. Resultados

A atividade da EROD foi induzida pelo BaP no fígado das tilápias após 8 dias de exposição, pelo diazinon após 5 dias de exposição e pela pré-exposição ao BaP por 3 dias seguida da exposição ao diazinon, cipermetrina e misturas deles após 5 dias. A atividade da enzima se mostrou diminuída no grupo pré-exposto ao E2 por 3 dias seguido da exposição ao diazinon por 5 dias em relação ao grupo exposto ao E2. O grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto a cipermetrina apresentou maior atividade em relação ao grupo exposto somente ao E2. O grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto a cipermetrina apresentou indução bem acentuada da enzima que enquanto o grupo exposto somente a cipermetrina apresentou a atividade inibida. O mesmo ocorreu para os grupos pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto a mistura dos agrotóxicos e somente a mistura dos agrotóxicos, e exposto ao diazinon e mistura dos agrotóxicos. O grupos exposto somente ao BaP apresentou indução da enzima mais acentuada do que o grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente a mistura dos agrotóxicos (Fig. 33).

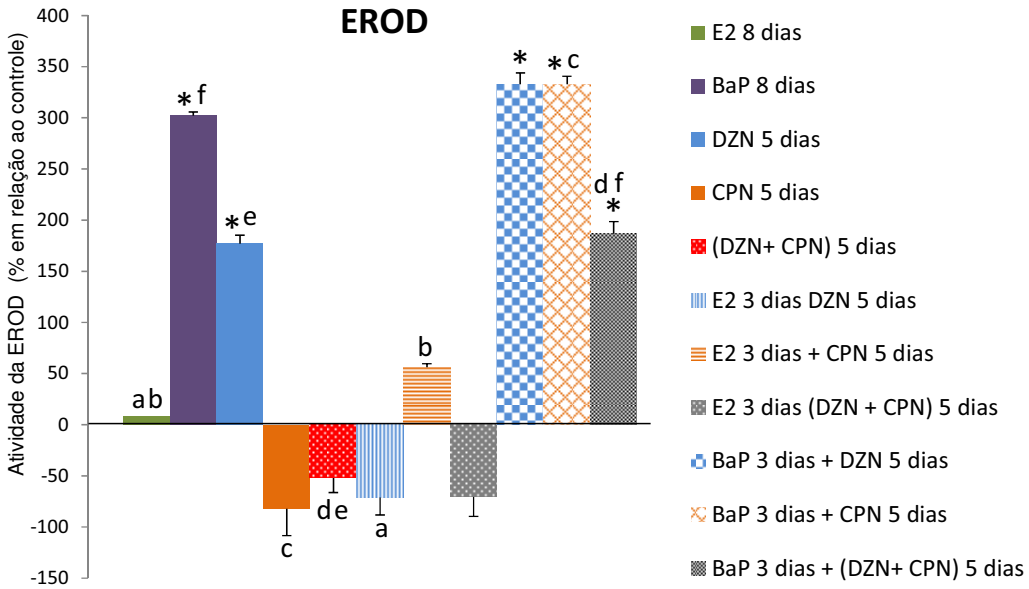


Figura 33: Atividade da enzima EROD (7-etóxiresorufina *O*-desalquilase) no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Dunn.

Nas tilápias, todos os grupos experimentais, exceto o grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto a mistura dos agrotóxicos, apresentaram inibição da BROD no fígado, superior a 50% em relação ao grupo controle. Os grupos exposto somente ao BaP e mistura dos agrotóxicos apresentaram inibição da enzima bem acentuada em relação ao grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto a mistura dos agrotóxicos (Fig. 34).

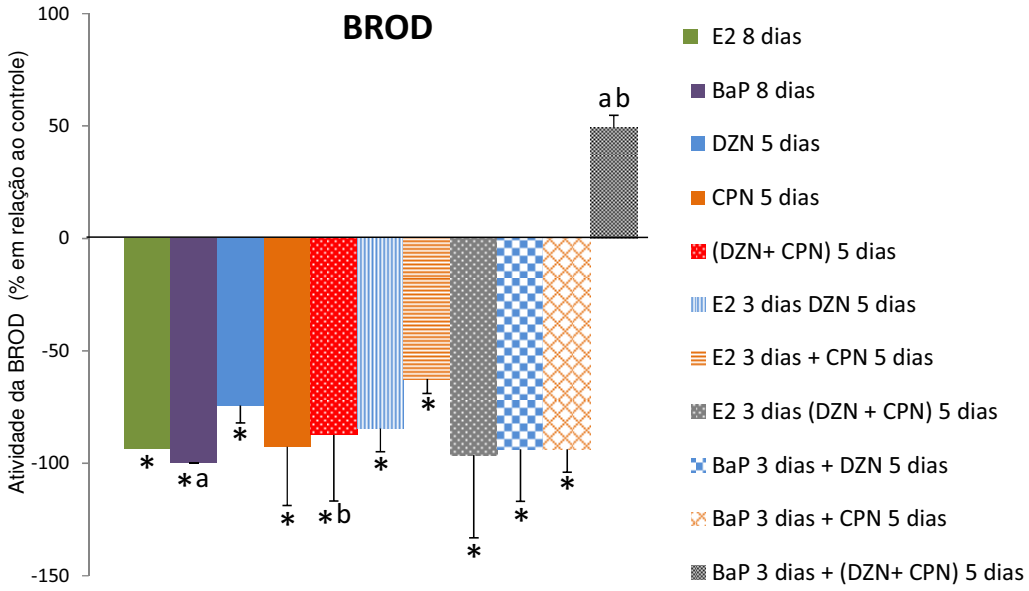


Figura 34: Atividade da enzima BROD (7-benzilóxiresorufina *O*-desalquilase) no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Dunn.

A atividade da PROD foi induzida apenas pelo E2 após 8 dias no fígado das tilápias. Foi inibida pelo BaP após 8 dias, pelos agrotóxicos individualmente e misturados, após 5 dias, e nos grupos pré-expostos ao E2 e BaP e depois expostos aos agrotóxicos. A inibição foi mais acentuada nos grupos expostos somente ao diazinon e cipermetrina em relação ao grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto ao diazinon e cipermetrina, respectivamente. O mesmo efeito ocorreu para a pré-exposição ao E2 e os agrotóxicos. Enquanto que o grupo exposto somente ao E2 apresentou indução de quase 50% na atividade da enzima, o grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto a cipermetrina apresentou ligeira inibição na atividade, e o grupo pré-exposto ao hormônio e posteriormente exposto a mistura dos agrotóxicos apresentou inibição em torno de 100% (Fig. 35).

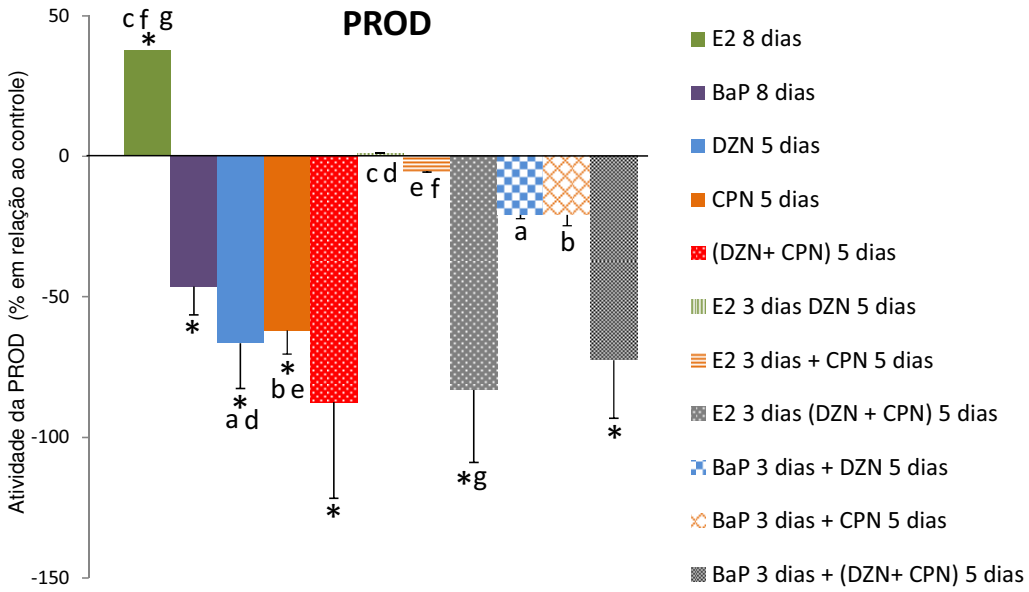


Figura 35: Atividade da enzima PROD (7-pentóxiresorufina *O*-desalquilase) no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Dunn.

A atividade da GST no fígado das tilápias se mostrou diminuída pelo E2 e BaP após 8 dias, diazinon após 5 dias, pré-exposição ao E2 e posterior exposição ao diazinon e pré-exposição ao BaP e posterior exposição aos dois agrotóxicos individualmente. A diminuição na atividade foi mais acentuada no grupo exposto somente ao BaP em relação ao grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto ao diazinon e também mais acentuada no grupo pré-exposto ao BaP e depois exposto ao diazinon em relação ao grupo exposto somente ao agrotóxico. A diminuição da enzima também foi mais acentuada no grupo exposto somente ao BaP em relação ao grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto a cipermetrina. Porém a pré-exposição ao E2 seguida da exposição ao diazinon acentuou a diminuição da atividade em relação ao grupo exposto somente ao hormônio (Fig. 36).

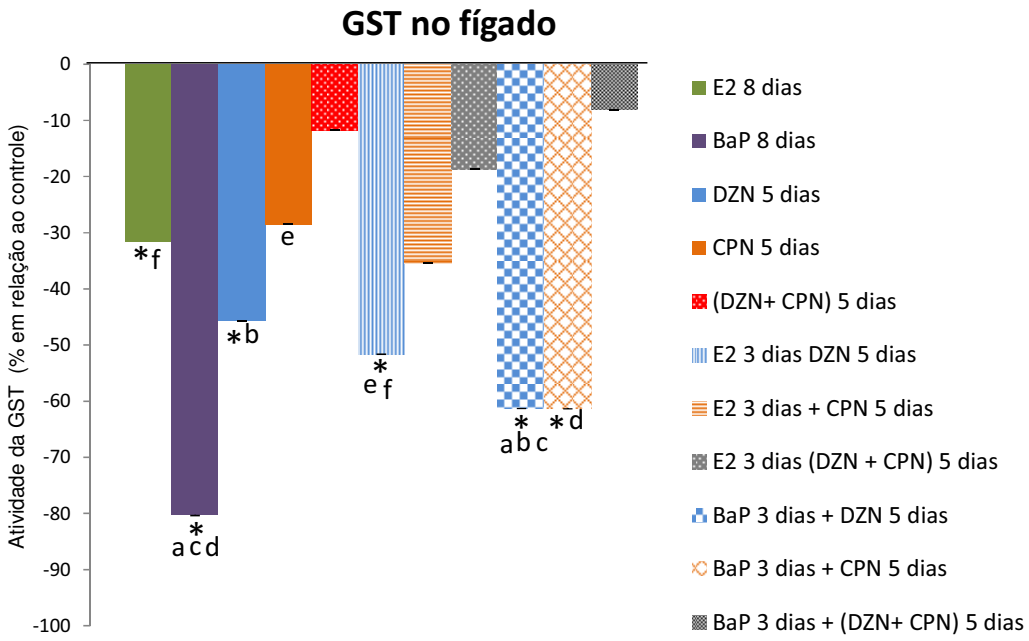


Figura 36: Atividade da enzima glutationa *S*-transferase no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Tukey.

A atividade da GST na brânquia das tilápias se mostrou diminuída pelo E2 e BaP após 8 dias, pelo agrotóxicos individualmente pos 5 dias, pela pré-exposição ao E2 seguida da exposição a cipermetrina e pela pré-exposição ao BaP seguida da exposição a mistura dos agrotóxicos. E a atividade da enzima na brânquia se mostrou aumentada pela pré-exposição ao BaP seguida da exposição aos agrotóxicos individualmente. A exposição somente ao E2 acentuou a diminuição na atividade da enzima em relação aos grupos pré-exposto ao E2 e depois expostos ao diazinon, cipermetrina e mistura dos agrotóxicos. A pré-exposição ao BaP e posterior exposição ao diazinon aumentou a atividade da enzima em relação ao grupo exposto somente ao BaP e ao diazinon, que diminuiram a atividade (Fig. 37).

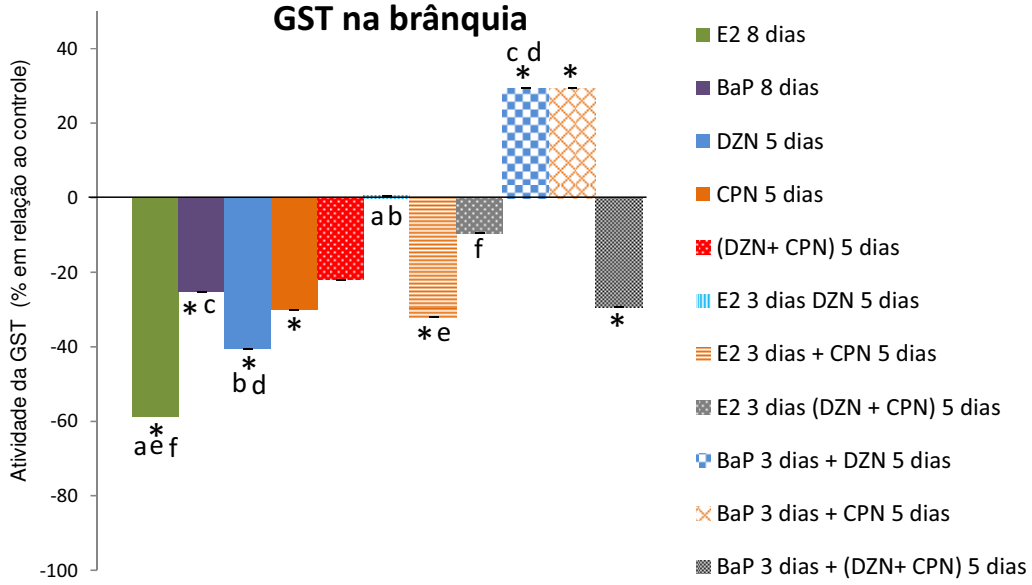


Figura 37: Atividade da enzima glutationa *S*-transferase na brânquia de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Tukey.

No encéfalo das tilápias, somente a cipermetrina afetou a AChE, promovendo aumento na atividade da enzima. E esse aumento foi em torno de 100% maior do que a atividade da enzima nos grupos de pré-exposição ao BaP e E2 seguidos de exposição a cipermetrina e mistura dos agrotóxicos em relação a cipermetrina somente (Fig. 38).

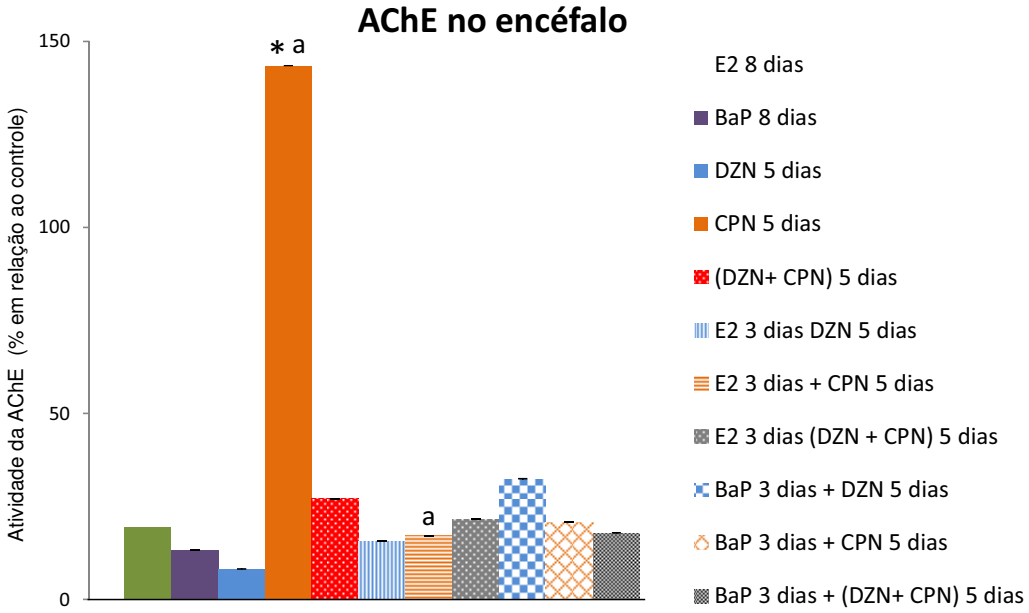


Figura 38: Atividade da enzima acetilcolinesterase no encéfalo de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Dunn.

A atividade da CbE no fígado das tilápias foi diminuída pelo E2 após 8 dias, pelos agrotóxicos individualmente e misturados após 5 dias, pré-exposição ao E2 seguida da exposição ao diazinon e pré-exposição ao BaP segioda da exposição aos agrotóxicos individualmente e misturados. A atividade da enzima foi aumentada pelo BaP após 8 dias e pela pré-exposição ao E2 e posterior exposição a cipermetrina. A mistura dos agrotóxicos inibiu a atividade da enzima em relação ao grupo pré-exposto ao E2 e depois exposto a mistura dos agrotóxicos. Enquanto a pré-exposição ao E2 seguida da exposição à cipermetrina aumentou a atividade da enzima em mais de 150%, a cipermetrina inibiu a enzima em mais de 50%. O grupo exposto ao diazinon apresentou inibição mais acentuada em relação ao grupo pré-exposto ao BaP e depois exposto ao agrotóxico, enquanto que o grupo exposto ao BaP somente apresentou aumento na atividade da enzima e esse mesmo efeito se repetiu para a cipermetrina. Ainda, enquanto o grupo pré-exposto ao E2 e depois exposto a cipermetrina apresentou aumento na atividade da enzima em mais de 150%, o grupo exposto ao E2 somente mostrou diminuição em mais de 50% na atividade (Fig. 39).

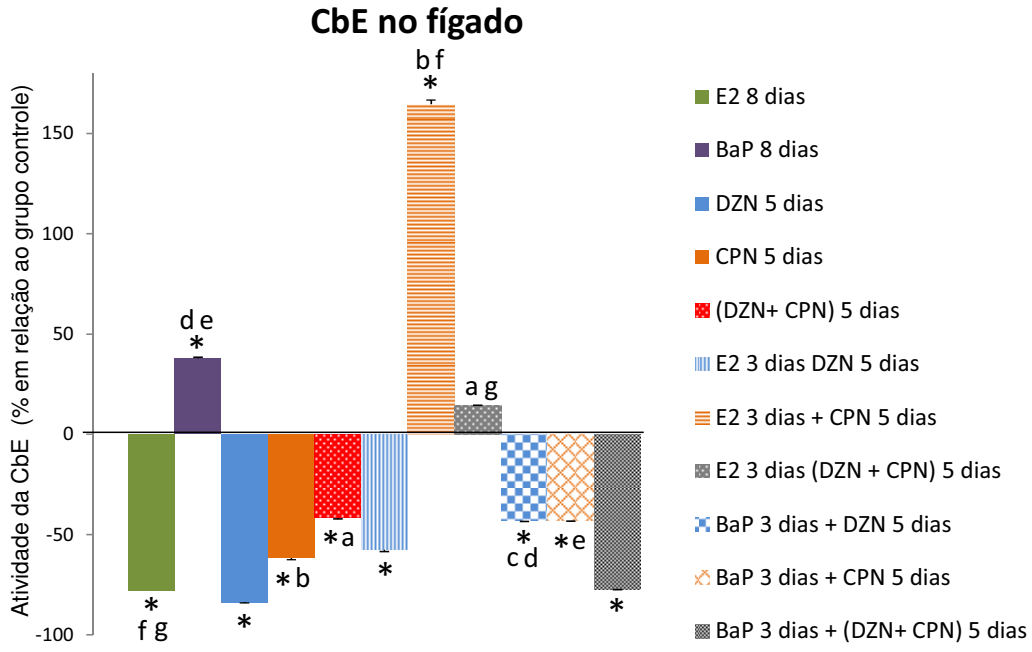


Figura 39: Atividade da enzima carboxilesterase no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Dunn.

Na brânquia das tilápias, a atividade da CbE foi aumentada pelo E2 após 8 dias e pela cipermetrina após 5 dias. O grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto a cipermetrina mostrou menor aumento na atividade em relação ao grupo exposto a cipermetrina e também em relação ao grupo exposto ao hormônio. A atividade da enzima foi aumentada pelo E2 em mais de 200% em relação ao grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto ao diazinon. A pré-exposição ao BaP e posterior exposição aos agrotóxicos aumentou a atividade da enzima em relação ao grupo exposto somente aos agrotóxicos. Enquanto que a pré-exposição ao E2 e posterior exposição à mistura dos agrotóxicos causou ligeira inibição da enzima, a pré-exposição ao E2 e posterior exposição somente a cipermetrina causou aumento na atividade da enzima (Fig. 40).

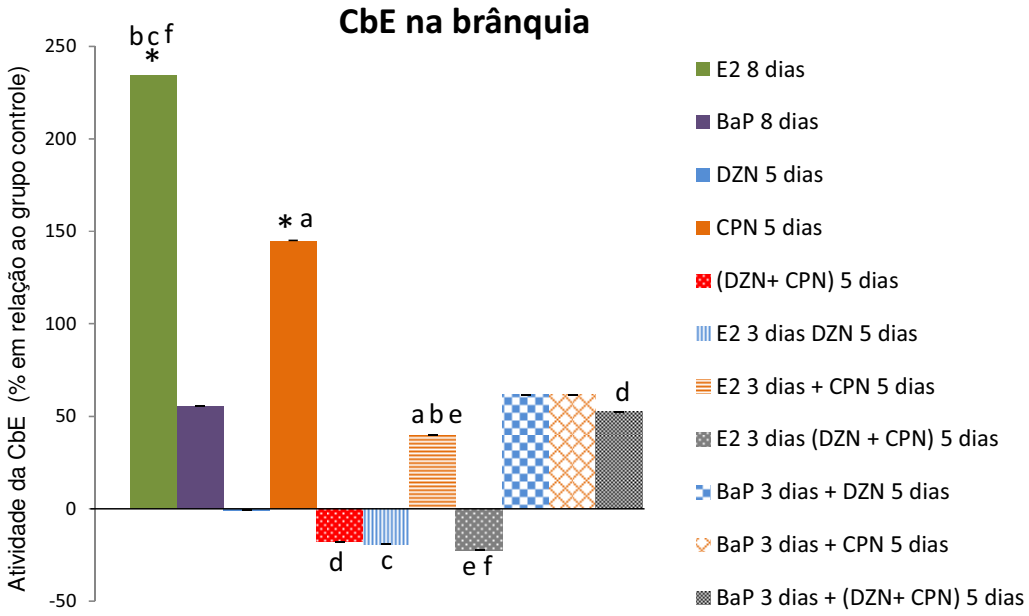


Figura 40: Atividade da enzima carboxilesterase na brânquia de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Dunn.

Os níveis de MDA no fígado das tilápias não foram alterados pelos tratamentos testados (Fig. 41).

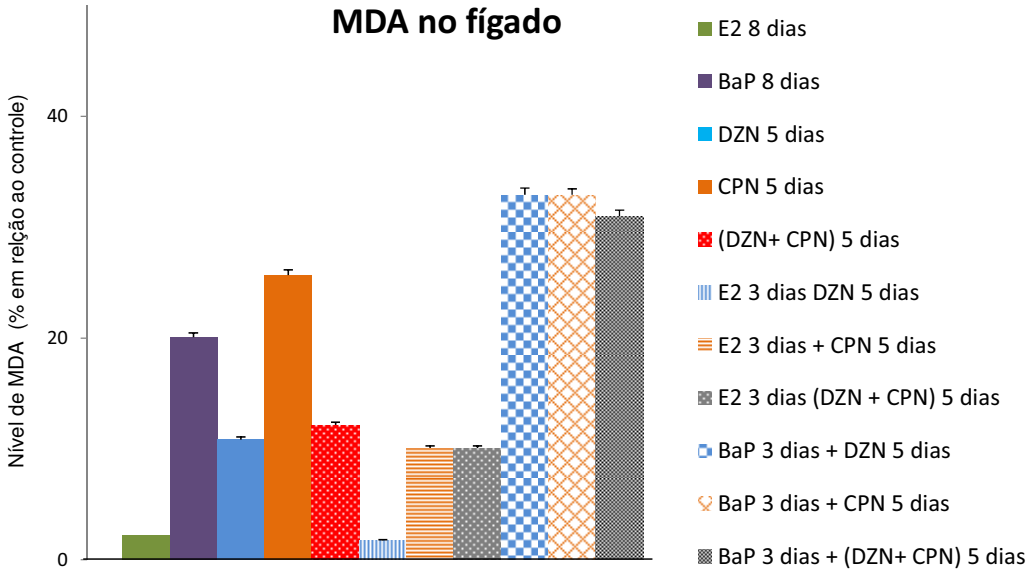


Figura 41: Níveis de malondialdeído no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno (BaP); 500 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon (DZN); 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina (CPN); 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. Teste de Kruskal-Wallis.

Na brânquia das tilápias ocorreu aumento no nível de MDA pelo tratamento de pré-exposição ao E2 seguido de exposição à cipermetrina e diminuição pela pré-exposição ao E2 seguida de exposição ao diazinon e pela exposição ao BaP somente. Ocorreu aumento nos níveis de MDA nos grupos pré-expostos ao BaP e posteriormente expostos aos agrotóxicos individualmente em relação ao grupo exposto ao BaP somente, que apresentou diminuição de MDA. Já no grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto ao diazinon ocorreu diminuição no nível de MDA em relação ao grupo exposto somente ao hormônio. Mas no grupo pré-exposto ao E2 e depois exposto a cipermetrina ocorreu aumento no nível de MDA em relação aos grupos expostos somente ao hormônio e à cipermetrina (Fig. 42).

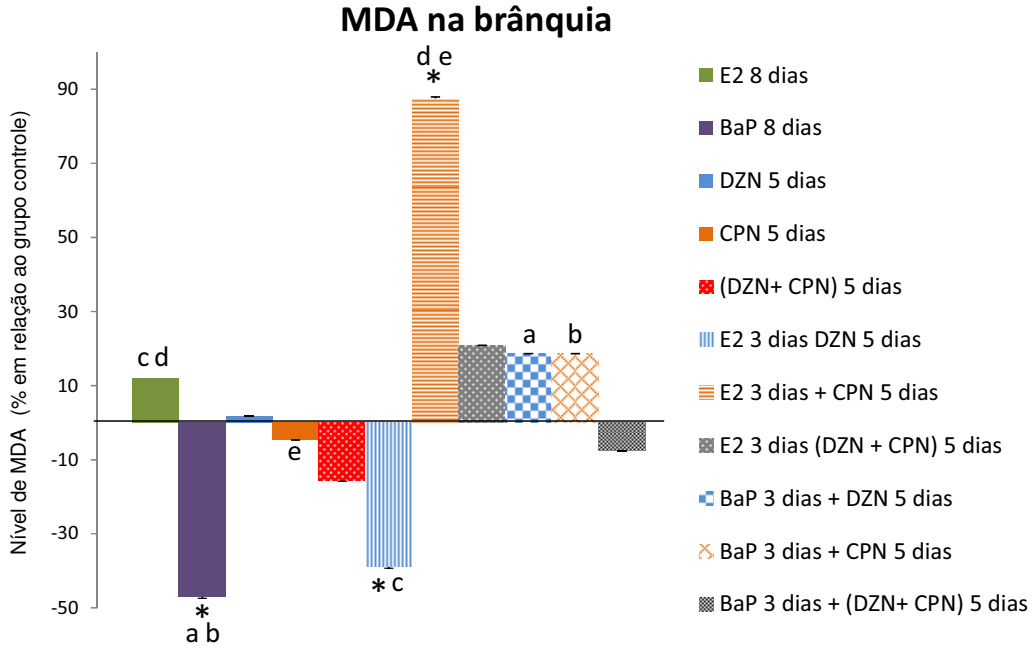


Figura 42: Níveis de malondialdeído na brânquia de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Tukey.

Os níveis de GSH no fígado das tilápias aumentaram pelo BaP após 8 dias, pelos agrotóxicos individualmente após 5 dias e pela pré-exposição ao E2 seguida da exposição a mistura dos agrotóxicos. O grupo exposto somente ao BaP apresentou maior nível de GSH em relação aos grupos pré-expostos ao HPA e depois expostos aos agrotóxicos individualmente. O grupo exposto somente ao diazinon apresentou maior nível de GSH do que os grupos a mistura dos agrotóxicos, e pré-expostos ao BaP e ao E2 e depois expostos a ele. O grupo exposto somente a cipermetrina apresentou maior nível de GSH do que os grupos expostos à mistura dos agrotóxicos e pré-exposto ao E2 e depois exposto a ela (Fig. 43).

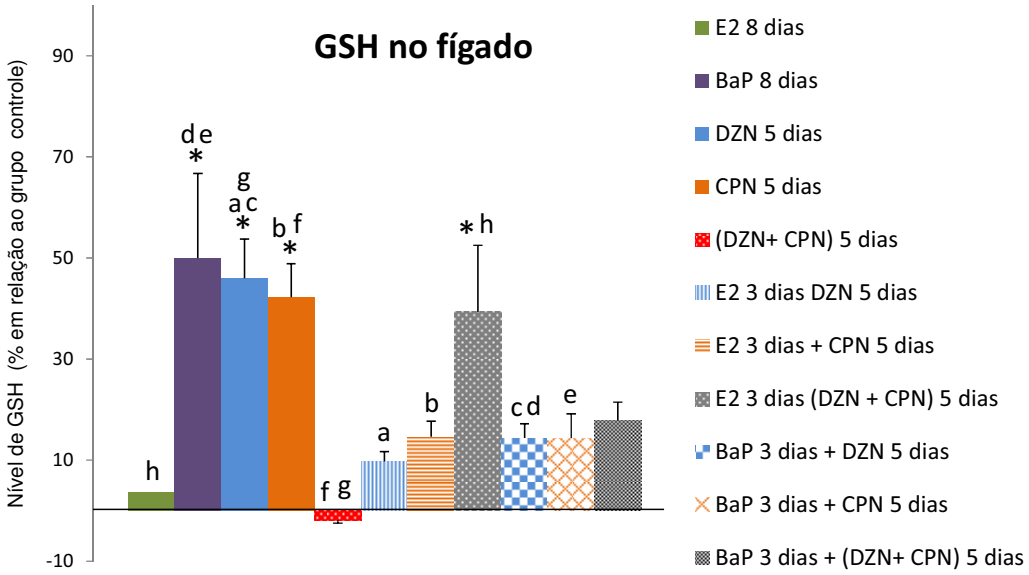


Figura 43: Níveis de glutationa reduzida no fígado de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Dunn.

Os níveis de GSH na brânquia das tilápias aumentaram pelo BaP após 8 dias, pelos agrotóxicos individualmente, pela pré-exposição ao E2 e posterior exposição a mistura dos agrotóxicos e pré-exposição ao BaP seguida de exposição aos dois agrotóxicos individualmente. O grupo exposto somente ao BaP apresentou nível de GSH aumentado em relação aos grupos pré-exposto ao BaP e posteriormente expostos as agrotóxicos individualmente. O grupo exposto ao diazinon somente apresentou nível

de GSH aumentado em relação ao grupo exposto a mistura dos agrotóxicos e pré-exposto ao E2 e depois exposto a ele. O grupo exposto a cipermetrina somente apresentou o mesmo efeito, nível de GSH aumentado em relação ao grupo exposto mistura dos agrotóxicos e pré-exposto ao E2 e depois exposto a ela. O grupo exposto à mistura dos agrotóxicos apresentou menor nível de GSH do que os grupos expostos aos agrotóxicos individualmente e em relação ao grupo que foi pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto a mistura dos agrotóxicos, e o grupo que foi pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto a mistura dos agrotóxicos apresentou depleção no nível de GSH em relação ao grupo exposto à mistura. O grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto a mistura dos agrotóxicos também apresentou depleção no nível de GSH em relação ao grupo exposto somente ao BaP. E o grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto a mistura dos agrotóxicos apresentou aumento de mais de 150% no nível de GSH em relação ao grupo exposto somente ao E2 (Fig. 44).

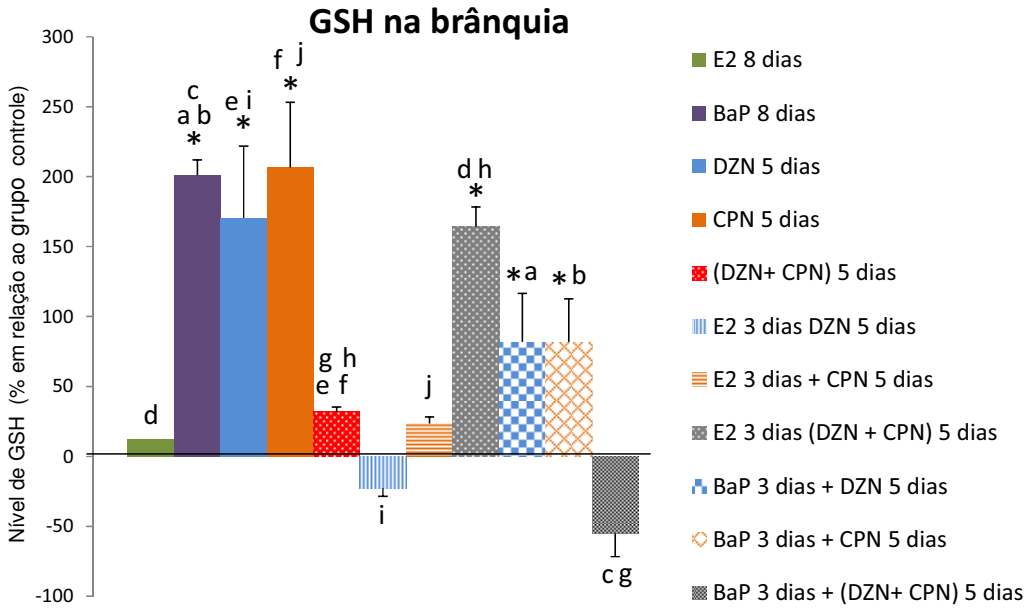


Figura 44: Níveis de glutationa reduzida na brânquia de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle. * indica diferença em relação ao grupo controle. Letra igual indica diferença significativa. P-valor < 0,05 foi considerado significativo. Teste de Dunn.

No fígado o IBR foi mais alto para o tratamento de pré-exposição ao E2 e posterior exposição à cipermetrina (6,641) seguido do tratamento de pré-exposição ao BaP e posterior exposição à mistura dos agrotóxicos (6,403) (Fig. 45-A).

Na brânquia o IBR foi mais alto para o tratamento de pré-exposição ao BaP e posterior exposição à cipermetrina (8,903) seguido do tratamento de pré-exposição ao BaP e posterior exposição ao diazinon (6,979) (Fig.45-B).

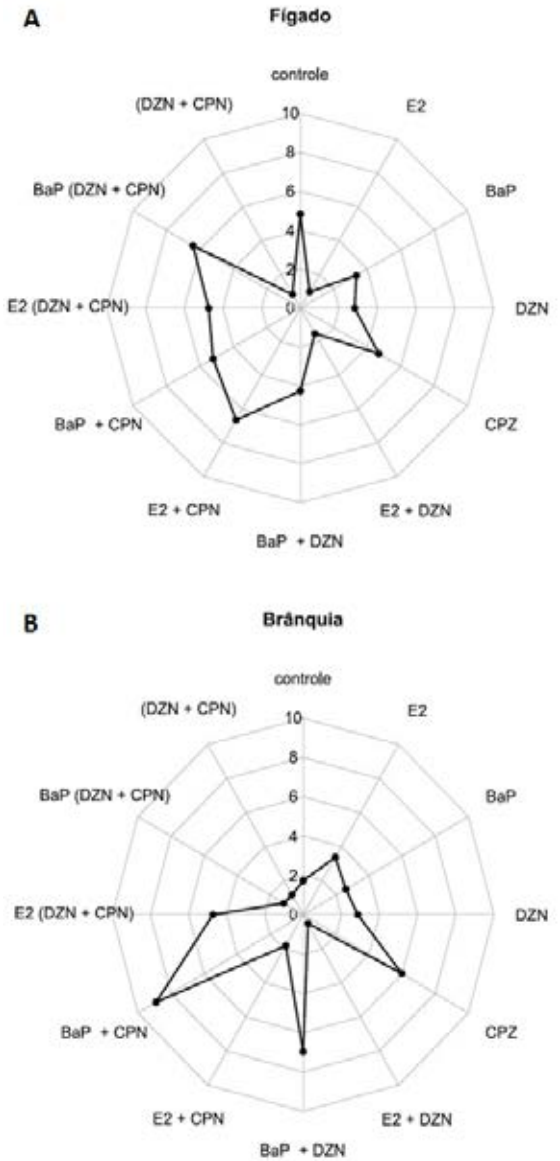


Figura 45: Índice integrado de resposta de biomarcadores (IBR) para o fígado e brânquia em de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno (BaP); 500 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon (DZN); 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina (CPN); 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol (E2).

Em relação a efeitos genotóxicos das misturas, a exposição ao BaP aumentou a frequência de anormalidades nucleares nos eritrócitos das tilápias após 8 dias em relação ao grupo controle. A pré-exposição ao BaP seguida da exposição a cipermetrina diminuiu a frequência de micronúcleos em relação ao grupo exposto somente a cipermetrina e o grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto ao diazinon apresentou maior frequência de anormalidades em relação ao grupo exposto somente ao diaizinon (tabela 6).

Tabela 6: Incidência de micronúcleos e anormalidades nucleares (média e desvio padrão) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)).

Alterações	controle	BaP 8 dias	BaP 8 dias e DZN 5 dias	BaP 8 dias e CPN 5 dias	BaP 8 dias e (DZN + CPN) 5 dias	(DZN + CPN) 5 dias	DZN 5 dias	CPN 5 dias	E2 8 dias	E2 8 dias e DZN 5 dias	E2 8 dias e CPN 5 dias	E2 8 dias e (DZN + CPN) 5 dias
MN	2,4 ±1,08	1,1 ± 1,83	7 ± 4,47	8,0 ± 5,09 b	1,8 ± 2,40	1,0 ± 1,26	1,1 ± 1,60	1,3 ± 1,50 b	1,0 ± 1,54	0,5 ± 0,83	0,1 ± 0,40	0,8 ± 2,04
BL	0,68 ± 1,42	0,6 ± 1,21	0,6 ± 1,21	0,5 ± 1,22	2,5 ± 3,39	0,1 ± 0,40	0,8 ± 1,60	0,3 ± 0,81	5,5 ± 8,36	2,7 ± 3,35	0,6 ± 0,81	0,8 ± 0,98
NT	19,1 ± 10,32	34,8 ± 13,34	8,8 ± 9,88	11,0 ± 6,84	20,1 ± 13,84	15,0 ± 7,40	27,5 ± 16,88	27,6 ± 18,79	17,1 ± 7,88	64,0 ± 30,18	16,5 ± 9,97	16,8 ± 10,12
LB	18,4 ± 8,41	27,3 ± 3,01	7,1 ± 7,30	25,6 ± 9,83	22,8 ± 8,42	18,3 ± 16,95	33,8 ± 23,60	20,1 ± 10,40	24,0 ± 12,26	53,5 ± 24,00	13,6 ± 6,88	26,8 ± 14,21
BE	0,4 ± 1,05	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,51	0,6 ± 1,21	1,0 ± 1,26	0,6 ± 1,21	2,5 ± 3,12	0,8 ± 1,32	1,5 ± 2,50	0,1 ± 0,37	0,3 ± 0,81	0,5 ± 1,22
BN	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,40	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,40	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
CA	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
MT	6,4 ± 3,53	10,4 ± 2,92	2,8 ± 3,15	6,3 ± 3,18	7,7 ± 4,55	5,6 ± 4,32	10,8 ± 7,60	8,1 ± 5,22	8,0 ± 5,16	20,0 ± 9,65	5,1 ± 3,08	7,5 ± 4,42
TA	426 a	754 a	204	454	560	410	778 c	588	578	1686 c	374	540
NCA	18000	1800	18000	18000	18000	18000	18000	18000	18000	18000	18000	18000

MN: micronúcleo; BL: núcleo *blebbed*; NT: núcleo *notched*; LB: lobed: BE: *brokeneggs*; BN: célula binucleada; CA: cariólise; MT: média total; TA: total de células analisadas com alterações; NCA: número total de células analisadas. Concentrações: 100 $\mu g.L^{-1}$ de benzo(a)pireno (BaP); 500 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon (DZN); 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de cipermetrina (CPN); 2,5 $\mu g.L^{-1}$ de 17β-estradiol (E2). Letras iguais indicam diferença significativa.Teste de Dunn.

As frequências de anormalidades foram observadas na seguinte ordem: *notched* e *lobed* > *blebbed* > *brokeneggs* > célula binucleada. Não foi observada cariólise. A figura 47 mostra eritrócitos normais, micronucleados e as anormalidades nucleares observadas nas tilápias.

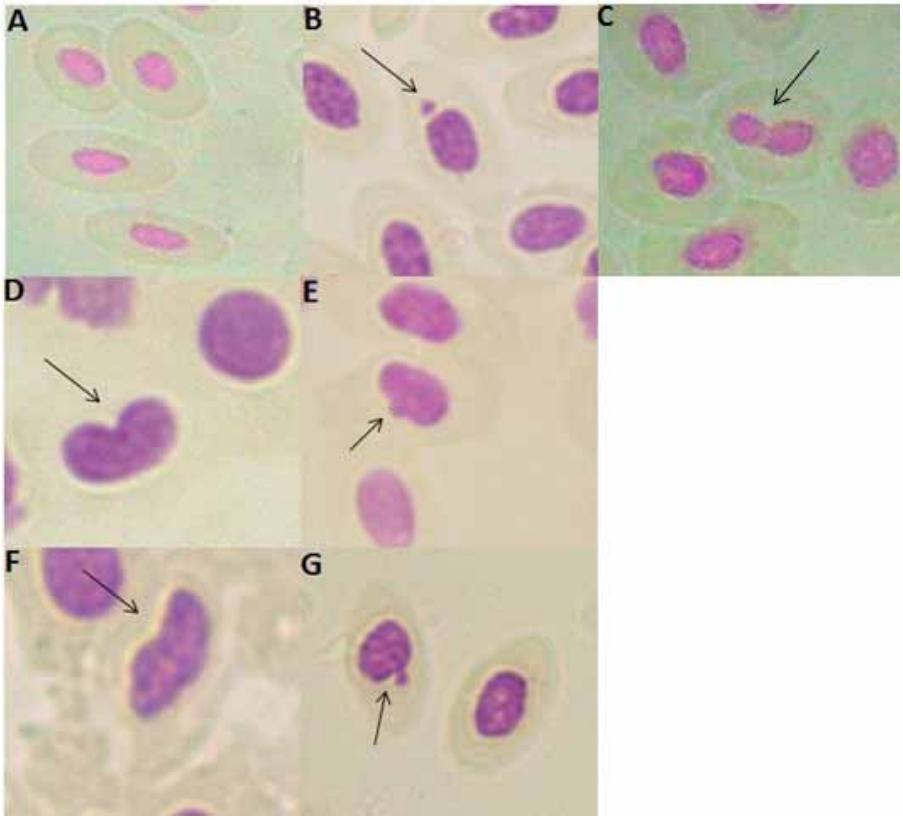


Figura 47: Esfregaço sanguíneo de tilápias *Oreochromis niloticus* após 8 dias de exposição à mistura dos contaminantes (3 dias de pré-exposição seguido de mais 5 dias de exposição ao outro(s) contaminante(s)). Concentrações: 100 µg.L^{-1} de benzo(a)pireno (BaP); 500 µg.L^{-1} de diazinon (DZN); 1,5 µg.L^{-1} de cipermetrina (CPN); 2,5 µg.L^{-1} de 17β-estradiol (E2). **A**: eritrócitros normais. **B**: micronúcleo (seta). **C**: célula binucleada (seta). **D**: núcleo *notched* (seta). **E**: núcleo *lobed* (seta). **F**: núcleo *blebbed.* **G**: *brokeneggs* (seta). Coloração: Reação de *Feulgen*.

3. Discussão

Os grupos pré-expostos ao BaP apresentaram indução ao EROD e a posterior exposição aos agrotóxicos não teve efeito significativo na atividade da enzima mostrando que o HPA é indutor da isoforma mas esses achados sugerem que a isoforma não é importante na biotransformação do diazinon e cipermetrina. Já a pré-exposição ao E2 teve efeito adverso; associado à cipermetrina aumentou a atividade da EROD e, associado ao diazinon e mistura deles diminuiu a atividade da enzima. O E2 sozinho não afetou a atividade da EROD, mas reduziu o nível da atividade para valor bem próximo ao do grupo controle e com a adição do diazinon a atividade reduziu ainda mais. Os resultados para pré-exposição ao E2 e adição do parecem sugerir que a interação deles tem efeito na diminuição da atividade da EROD.

As misturas dos contaminantes de modo geral, independentemente do agrotóxico, promoveu inibição da BROD no fígado nas tilápias. Apenas o BaP teve efeito indutor na atividade mas somente com a posterior adição dos agrotóxicos em conjunto, resultado diferente do observado para a exposição ao BaP associado a cada agrotóxico isoladamente.

O mesmo efeito de inibição foi observado para a PROD no fígado das tilápias. As pré-exposições ao BaP e ao E2 minimizaram a inibição da enzima pela exposição aos agrotóxicos individualmente mas nas exposições subsequente às misturas deles o BaP e o E2 não tiveram efeito sobre a atividade da enzima. Esses resultados sugerem que é a interação do efeito da pré-exposição a um dos compostos com um agrotóxico que induz a enzima. A adição dos agrotóxicos, individualmente, mas principalmente misturados, reduziram a atividade da enzima que fora induzida pelo E2 sozinho, sugerindo a atuação desta isoforma P450 na biotransformação do hormônio e a ação dos agrotóxicos principalmente a associação deles, inibindo esse mecanismo.

A pré-exposição ao E2 não foi significativa na atividade da EROD, quando o diazinon, a cipermetrina e o BaP foi adicionados, na atividade da BROD, quando o os agrotóxicos foram adicionados e na atividade da PROD quando o BaP foi adicionado. Quando o BaP foi adicionado, houve indução na atividade da BROD e quando os agrotóxicos foram adicionados, houve diminuição na atividade da PROD. A pré-exposição ao BaP não foi significativa na atividade da EROD quando o diazinon e o E2 foram adicionados, na atividade da BROD quando nenhum dos compostos foi adicionado. Quando a cipermetrina foi adicionada, houve indução na atividade da EROD, e quando os agrotóxicos foram adicionados houve diminuição na atividade da PROD. Esses achados mostram que a PROD foi mais responsiva às pré-exposições e a adição dos agrotóxicos causam mais efeitos nas enzimas de fase *I* do que o BaP.

Logo, esses achados parecem sugerir que a pré-exposição ao E2 induzindo a atividade da BROD com a adição do BaP poderia vir a acelerar a sua biotransformação; já a diminuição na atividade da PROD com a adição dos agrotóxicos poderia vir a diminuir a biotransformação deles. A pré-exposição ao BaP induzindo a atividade da EROD com a adição da cipermetrina, poderia vir a acelerar sua biotransformação; já a diminuição na atividade da PROD com a adição dos dois agrotóxicos poderia vir a diminuir a biotransformação deles. Então, de modo geral, a adição dos agrotóxicos, independente da pré-exposição, causa diminuição na atividade da PROD.

A mistura do BaP, E2, diazinon (OP) e cipermetrina (PI), juntos, em maior concentração foi mais responsiva nos biomarcadores nas tilápias. E a resposta sobre os biomacardores nas tilápias pode ser adversa quando o contaminante está associado a outro, de outra categoria, sendo que um efeito se sobressai ao outro. Houve indução da EROD mostrando que o efeito do BaP se sobressaiu ao inibidor do E2 e a inibição da CbE no fígado foi mais acentuada pelas misturas dos contaminantes do que pelo diazinon isolado mostrando que a interação dos compostos está potencializando o efeito sob a enzima.

Apesar do grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto ao diazinon mostrar diminuição na atividade da EROD em relação ao grupo exposto somente ao hormônio, em relação ao grupo pré-exposto ao hormônio e posteriormente exposto à mistura dos agrotóxicos não houve diferença. Esses achados mostram que a associação dos dois agrotóxicos não se potencializou.

O que pode ter acontecido, por exemplo, foi que a indução de isoforma (s) CYP por um dos agrotóxicos gerou metabólito (s) que induziu ou potencializou a biotransformação do outro agrotóxico. Para as associações do E2 e do BaP com a cipermetrina, que foram mais responsivas nos biomarcadores no fígado e brânquia respectivamente, pode ter também ter acontecido o inverso. A biotransformação do primeiro composto inibiu alguma isoforma (s) CYP que atuaria na biotranformação da cipermetrina. Ou talvez outro fenômeno, a biotransformação do primeiro composto gerou metabólito (s) que inibiu a biotransformação da cipermetrina ou potencializou as respostas. A isoforma 1A aumentou (EROD) com a concentração de 2,5 $\mu g.L^{-1}$ do E2 por 5 dias, no primeiro experimento, de exposição 5 por dias, coincidindo com o período de pré-exposição das tilápias. A adição da cipermetrina diminuiu a atividade da EROD, no experimento V. A atividade da EROD não foi avaliada na brânquia, assim não temos como inferir se a resposta foi a mesma.

Na atividade da GST no fígado das tilápias, a posterior exposição ao diazinon minimizou a redução na atividade da enzima causada pela pré-exposição ao BaP mas ao contrário, o BaP sozinho, potencializou a diminuição na atividade da enzima. Já na pré-exposição ao E2 a posterior exposição ao diazinon potencializa a redução na atividade da GST. Assim nossos resultados mostraram que, de maneira geral, os tratamentos testados não induziram a GST no fígado das tilápias, ao contrário, diminuíram a

atividade. E o só diazinon, e somente na presença do BaP, parece induzir a fase *II* da biotransformação nas tilápias.

Na brânquia, a atividade da GST respondeu diferente, pois ocorreu indução e foi pela pré-exposição ao BaP seguida das exposições aos agrotóxicos isolados. Individualmente, o BaP, o diazinon e a cipermetrina diminuíram a atividade da enzima revelando que é atribuída ao efeito da pré-exposição seguido da associação com o agrotóxico o aumento na atividade. O E2 sozinho causou maior diminuição na atividade da GST do que a pré-exposição ao E2 seguida das exposições aos agrotóxicos individualmente e misturados, sendo que a associação com o diazinon levou o nível da atividade próxima ao do grupo controle. Também observamos que associado com o BaP o diazinon minimiza a redução na atividade da GST no fígado. De modo geral as taxas de variações observados nos grupos experimentais com relação ao grupo controle observadas na brânquia comparadas com o fígado foram menores e a brânquia apresentou grupos com indução na atividade da enzima mostrando que a esta estrutura é mais sensível no processo de biotransformação das misturas testadas do que o fígado.

A atividade da AChE no encéfalo das tilápias só foi afetada pela cipermetrina, individualmente, apesar do potencial efeito inibidor do diazinon. Nos grupos onde a cipermetrina estava em associação não ocorreu esse efeito de aumento na atividade da enzima e no grupo exposto a mistura dos dois agrotóxicos, o efeito inibidor do diazinon não se sobressaiu. Na literatura há relatos de efeito contrário na enzima pela cipermetrina em peixes. Marigoudar *et al*. (2009) observaram inibição em *Labeo rohita* com 0,33 $\mu g.L^{-1}$ por 14 dias pelo composto. E Kumar *et al*., (2009) observaram inibição por concentrações de 60-80 $\mu g.L^{-1}$ por 4 dias em *Channa punctatus*.

Em relação à atividade da CbE no fígado das tilápias, apesar de somente o diazinon ser o potencial inibidor da enzima, em geral houve diminuição na atividade. No grupo pré-expostos ao BaP e depois expostos ao diazinon e cipermetrina houve inibição mas o BaP sozinho promoveu aumento na atividade da enzima. A carboxilesterase é uma hidrolase de fase *I*; assim nossos resultados poderiam estar mostrando a atuação da enzima na biotransformação de algum metabólito do HPA. O diazinon potencializou a inibição da CbE no grupo pré-exposto ao BaP, aí sim evidenciando o seu efeito. A pré-exposição ao E2 seguida da exposição à mistura dos agrotóxicos causou ligeiro aumento na atividade da enzima, mas a só a mistura dos agrotóxicos inibiu, novamente revelando o efeito do diazinon. E a pré-exposição ao E2

seguida da exposição à cipermetrina promoveu um aumento na atividade da enzima enquanto que só o E2 e só o agrotóxico causaram diminuição na atividade; esses achados sugerem que a associação desses dois compostos induz a biotransformação de algum(s) metabólito(s) pela hidrolase.

Assim como a GST, a CbE respondeu de modo bem diferente do observado do fígado, na brânquia das tilápias. O grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto à mistura dos agrotóxicos apresentou atividade bastante diminuída em relação ao grupo exposto somente ao E2, efeito atribuído ao papel inibidor do diazinon na mistura. O mesmo ocorreu para o grupos pré-expostos ao BaP e depois exposto a mistura dos agrotóxicos e E2 e depois ao diazinon, sempre se sobressaindo o efeito inibidor do organofosforado. A pré-exposição ao E2 seguida da exposição à cipermetrina diminuiu a atividade da enzima em relação aos compostos individualmente, diferente do observado no fígado, onde a interação dos dois aumentou a atividade da enzima. Isso ressalta as particularidades metabólicas entre a brânquia e o fígado.

Na brânquia das tilápias, independentemente da posterior exposição aos agrotóxicos, individualmente, os grupos pré-expostos ao BaP apresentaram maiores níveis de MDA do que o grupo exposto somente ao BaP, que apresentou diminuição; isso sugere que as células respondem melhor quando expostas somente ao BaP pois conseguem combater esses metabólitos indicativos de estresse oxidativo. A pré-exposição ao E2 seguida da exposição ao diazinon teve o nível de MDA diminuído pelo agrotóxico em relação ao E2 também sugerindo uma resposta das células ao EO, mas a pré-exposição à cipermetrina teve efeito inverso, sendo que o agrotóxico aumentou o nível de MDA, mostrando efeito adverso entre os agrotóxicos para biomarcador de estresse oxidativo. E a pré-exposição ao E2 potencializou o aumento no nível de MDA causado pela cipermetrina.

No fígado das tilápias nos níveis de GSH se mostraram menores nos grupos submetidos às associações de contaminantes em relação aos contaminantes individualmente; a única exceção foi o grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto à mistura dos agrotóxicos, que apresentou nível semelhante ao dos grupos expostos aos contaminantes isolados, mas esse efeito se deve a mistura dos agrotóxicos, pois o E2 sozinho também foi exceção dentre os contaminantes individualmente pois o grupo de tilápias exposto a ele apresentou nível de GSH próximo ao do grupo controle.

Ou seja, é a pré-exposição ao hormônio associada ao efeito da interação dos dois agrotóxicos que estimula a síntese de GSH.

Os níveis de GSH na brânquia das tilápias se mostraram em um padrão semelhante ao encontrado no fígado. De um modo geral os resultados observados para os grupos expostos as misturas sugere depleção de GSH, podendo ser atribuída à atividade da GST que usa a glutationa como cofator, ou situação de estresse oxidativo onde a glutationa é requerida para neutralizar radicais livres. Variações no nível de MDA como foram observadas na brânquia pode estar atrelado a esses achados.

Em relação a efeitos genotóxicos nos eritrócitos das tilápias, a posterior exposição à cipermetrina no grupo pré-exposto ao BaP promoveu diminuição na frequência de micronúcleos; no entanto apesar no potencial genotóxico do BaP, ele sozinho não acarretou em aumento na taxa de MN. Já a adição do diazinon no grupo pré-exposto ao E2, cujo potencial genotóxico não é significativamente reconhecido, aumentou a frequência de anormalidades nucleares e o diazinon sozinho também não acarretou em alteração na taxa de anormalidades como também não é significativo seu potencial genotóxico, mas a interação deles sim teve efeito.

A pré-exposição do E2 e do BaP com a cipermetrina ter se mostrado mais responsiva do que a associação com o diazinon, um composto organofosforado, não é surpreendente. De fato para peixes os piretróides são agrotóxicos mais tóxicos do que para mamíferos com a CL_{50} da cipermetrina para várias espécies variando de 0.4–3.20 lg/L em 96 hs (Anadón *et al.* 2009).

Essa resposta observada é bastante instigante. Os peixes machos não sintetizam vitelogenina, proteína precursora da proteína constituinte da gema do ovo, mas eles apresentam o gene para síntese dela, a partir do estímulo do E2 caso sejam expostos a ele. Assim o fígado dos peixes machos é bastante sensível ao hormônio passando a sintetizá-la quando expostos ao E2, pois os hepatócitos têm receptores para ele (Navas e Segner, 2001). Logo não é de nos surpreendermos do fígado de tilápias machos se mostrar mais sensível ao hormônio do que ao BaP, que já está sendo metabolizado pela brânquia e sangue até que chegue até ele.

Apesar dos dois agrotóxicos usados no estudo serem neurotóxicos, a associação deles não acarretou em mais respostas nos biomarcadores avaliados para as tilápias, pelo contrário, o IBR para o tratamento com os dois agrotóxicos isolados foi maior nos

dois tecidos do que para o IBR dos tratamentos dos agrotóxicos misturados. Na brânquia os valores de IBR para os tratamentos com misturas estão menores do que os tratamentos com misturas no fígado e o IBR do fígado também se mostra maior do que na brânquia. Ou seja, as misturas, mais do que os contaminantes isolados afetaram os biomarcadores e o fígado apresentou mais alterações nos biomarcadores.

Os dois agrotóxicos (PI e OP), mesmo de categorias bioquímica diferentes, são neurotóxicos e não observamos efeitos potencializados quando associados. Pelo contrário, o IBR mostrou que misturados, eles não causam menos efeitos nos biomarcadores estudados, no fígado e na brânquia. O esperado era que, a exposição ao diazinon (OP) inibindo a CbE, diminuísse a taxa de hidrólise da cipermetrina, como um composto piretróide, um éster (WHEELOCK *et al.,* 2008).

E mais uma vez o fígado se mostrou responder diferente das brânquias, pois o fígado se mostrou mais sensível à pré-exposição ao E2 enquanto que a brânquia foi à pré-exposição ao BaP.

Há na literatura relatos de que exposição a BaP causa diminuição do nível de E2 (HOFFMANN; ORIS, 2006) pois induz atividade P450, em rato (VAN LIPZIG *et al*., 2005). Estudo mostrou que a exposição aos organosforados clorpirifos e fonofos e piretróides deltametrina e permetrina inibem a metabolização do E2 por CYP3A4 (USMANI *et al*., 2006). Assim estudos têm mostrado que a associação de contaminantes afeta a biotransformação deles individualmente e é importante que isso seja avaliado.

Observamos que a exposição ao BaP em tilápias pré-expostas à mistura de cipermetrina (PI) e diazinon (OP) induz a BROD e a exposição ao E2 em tilápias pré-expostas à mistura de cipermetrina (PI) e diazinon (OP) diminui a atividade da PROD. Estudo anterior em nosso laboratório mostrou que a pré-exposição por 3 dias a 500 $\mu g.L^{-1}$ de BaP não afetou a atividade da CbE na brânquia de tilápias mas a adição de 500 $\mu g.L^{-1}$ de diazinon inibiu a enzima após 2 dias, revelando que a pré exposição ao HPA não teve efeito na atividade da esterase e que prevaleceu o efeito inibido do agrotóxico (TRIDICO *et al*., 2010).

Elhalwagy e Zaki observaram que o clorpirifos a 20 mg/Kg (OP) inibiu a CbE após 7 e 14 dias em ratos e a deltametrina a 2 mg/Kg (PI) não, mas a mistura deles

também inibiu, mostrando que o feito inibidor do organofosforado se sobressai, como também observamos no nosso experimento de mistura a todos os contaminantes.

Liu *et al*. (2006) observaram em ratos que 1/600 da CL50 de cipermetrina em mistura com metil paration (OP) diminuem os níveis de E2 atuando, em associação, como desreguladores endócrinos nos animais.

Micronúcleos (MN) e aberrações cromossômicas (quebras) foram diagnosticados em *Channa* punctata expostos a cipermetrina em concentrações de 0,4-1,2 $\mu g.L^{-1}$ por períodos de 48 a 72 horas (ANSARI *et al*., 2011). Em baixas concentrações, de 10^{-12} e 10^{-8} M, o diaznon causou MN em culturas de células de mamíferos MCF-7 (UKPEBOR *et al*., 2011) e a 750 µM causou MN em linfócitos humanos (KARAMIAN *et al.,* 2013).

O E2 não é reconhecido por apresentar potencial genotóxico, até porque é um hormônio natural, mas causou MN e anormalidades nucleares em *Dicentrarchus labrax* em concentrações de 200 e 2000 $ng.L^{-1}$ (TELES *et al*., 2006).

Observamos que a pré-exposição ao E2 potencializou a taxa de anormalidades nucleares em relação à adição ao diazinon. O que pode ter acontecido é que a pré-exposição gerou algum metabólito que ao reagir com o diazinon ou algum metabólito seu, gerou um composto genotóxico.

Também vimos que a pré-exposição ao BaP minimizou a frequência de MN em relação à adição da cipermetrina. Como o BaP sozinho não induziu aumento na taxa de MN, pode ter acontecido evento semelhante ao descrito anteriormente; a pré-exposição gerou algum metabólito que ao reagir com a cipermetrima ou algum metabólito seu, gerou um composto genotóxico.

Tem se discutido que os micronúcleos possam ser uma forma de eliminação de algum tipo de dano sobre o material genético. Fernandes *et al*., 2007 demostraram em *Allium cepa* que o sistema-teste quando exposto ao agrotóxico herbicida trifluralina, tem o material nuclear amplificado, em decorrência de ação aneugênica do composto (aumento no número de cromossomo) e houve a eliminação de material sob a forma de MN. Evento similar foi observado em tumores humanos; a presença de oncogene amplificado nesses tumores, geralmente presentes em elementos extracromossômicos seria acelerada pela formação de MN (VON HOFF *et al*., 1992).

As anormalidades, nesse trabalho como um todo, foram mais frequentemente observadas em relação aos micronúcleos. Elas são mais espontaneamente encontradas em relação aos micronúcleos (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003). Fenechand e Crott (2002) atribuem à alta taxa de anormalidades nucleares em linfócitos humanos em condição de deficiência de ácido fólico. O folato participa do processo de síntese e reparo do DNA, atuando na metilação da citosina, e na síntese de purinas e pirimidinas (DUTHIE, 2011).

Capítulo IV

Capítulo IV

Estudo de monitoramento ambiental do rio Tietê no trecho do município de Araçatuba – SP

A cidade de Araçatuba é conhecida como a "capital do boi gordo" pela importante atividade de pecuária, mas que vem sendo substituída pela atividade sucroalcooleira em virtude da disponibilidade de terras, proximidade com o rio Tietê e incentivos fiscais.

No entanto nos últimos 10 anos têm ocorrido na região significativo aumento do setor sulcroalcooleiro em substituição à pecuária e construção de condomínios e clubes náuticos na cabeceira do rio e ainda não se conhece a influência dessas atividades na saúde da fauna aquática da região.

De 2004 a 2009 o cultivo de cana-de-açúcar aumentou 238,5% em Araçatuba; é a segunda região que mais cresce em produção, só perde para São José do Rio Preto (RUDORFF *et al*., 2010).

Objetivos

- Testar se as tilápias expostas às aguas coletadas nos pontos do rio Tietê apresentam alterações bioquímicas, influenciados pelas atividades de lazer dos condomínios náuticos e atividades canavieiras na região ou pelos contaminantes decorrentes dessas atividades;

- Testar se há diferença nas respostas bioquímicas entre as estações seca e chuvosa, influenciadas por fatores ambientais e econômicos característicos da região.

1. Material e Métodos

Os peixes usados nos experimentos de exposição à água do rio Tietê foram machos adultos, foram cedidos pela Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas (do Dep. Zoologia e Botânica, IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto) e transportados até um rancho no condomínio Copacabana, em Araçatuba - SP, onde foram mantidos por 5 dias em caixa de PVC com 500 litros de água, com oxigenação.

Antes dos experimentos os peixes eram alimentados com ração petelizada (24% de proteína), uma vez ao dia.

O experimento na estação seca foi realizado em setembro de 2012 e foram usados peixes de 89,81 ± 8,01 g e 14,51 ± 0,15 cm. O experimento da estação chuvosa foi realizado em fevereiro de 2013 e foram usados peixes de 87,52 ± 8,41 g e 13,47 ± 0,20 cm.

Inicialmente foi proposto no projeto que o estudo de monitoramento seria realizado no rio (Fig. 48), onde os peixes seriam alojados em gaiolas e estas presas às margens e mantidas lá por 3 dias, e então coletados. No entanto em visita prévia dos pontos diagnosticou-se baixa concentração de oxigênio dissolvido na água nesses locais atribuída a presença de superpopulação de macrófitas elodea, vulgarmente conhecida por rabo de gato, nas margens do rio (Fig. 48-D e E), um problema que afeta não somente a região de Araçatuba.

Em todos os pontos analisados a concentração de oxigênio dissolvido não chegou a 4 $mg.L^{-1}$ e o recomendado para tilápias é de 6-8 $mg.L^{-1}$. Então tivemos a ideia de coletar a água, colocá-la em aquários de 20 litros, oxigená-la por meio de bomba e lá manter os peixes durante o período experimental. Os experimentos de exposição dos peixes à água do rio foram realizados no rancho, no condomínio Copacabana, em Araçatuba. Galões foram usados para coletar água de 4 pontos do rio por meio de um bote movido a motor de popa.

Os experimentos de exposição dos peixes à água do rio foram realizados no rancho, no condomínio Copacabana, em Araçatuba. Galões foram usados para coletar água de 4 pontos do rio por meio de um bote movido a motor de popa.

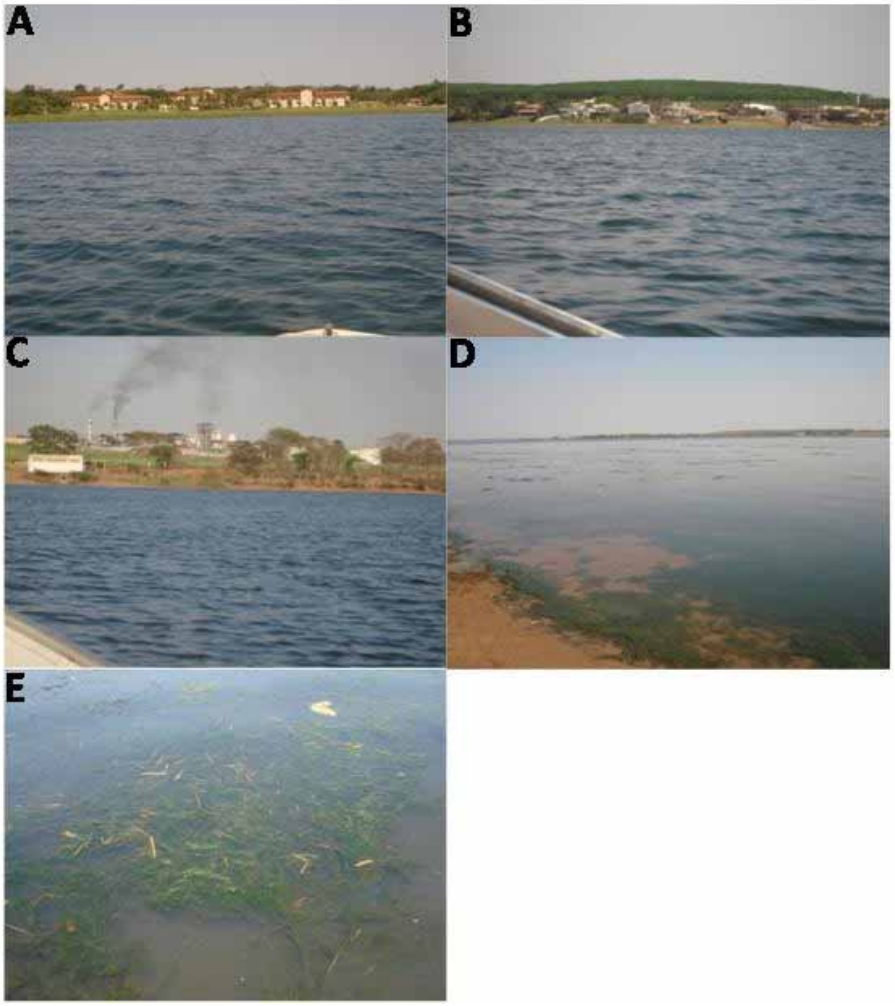
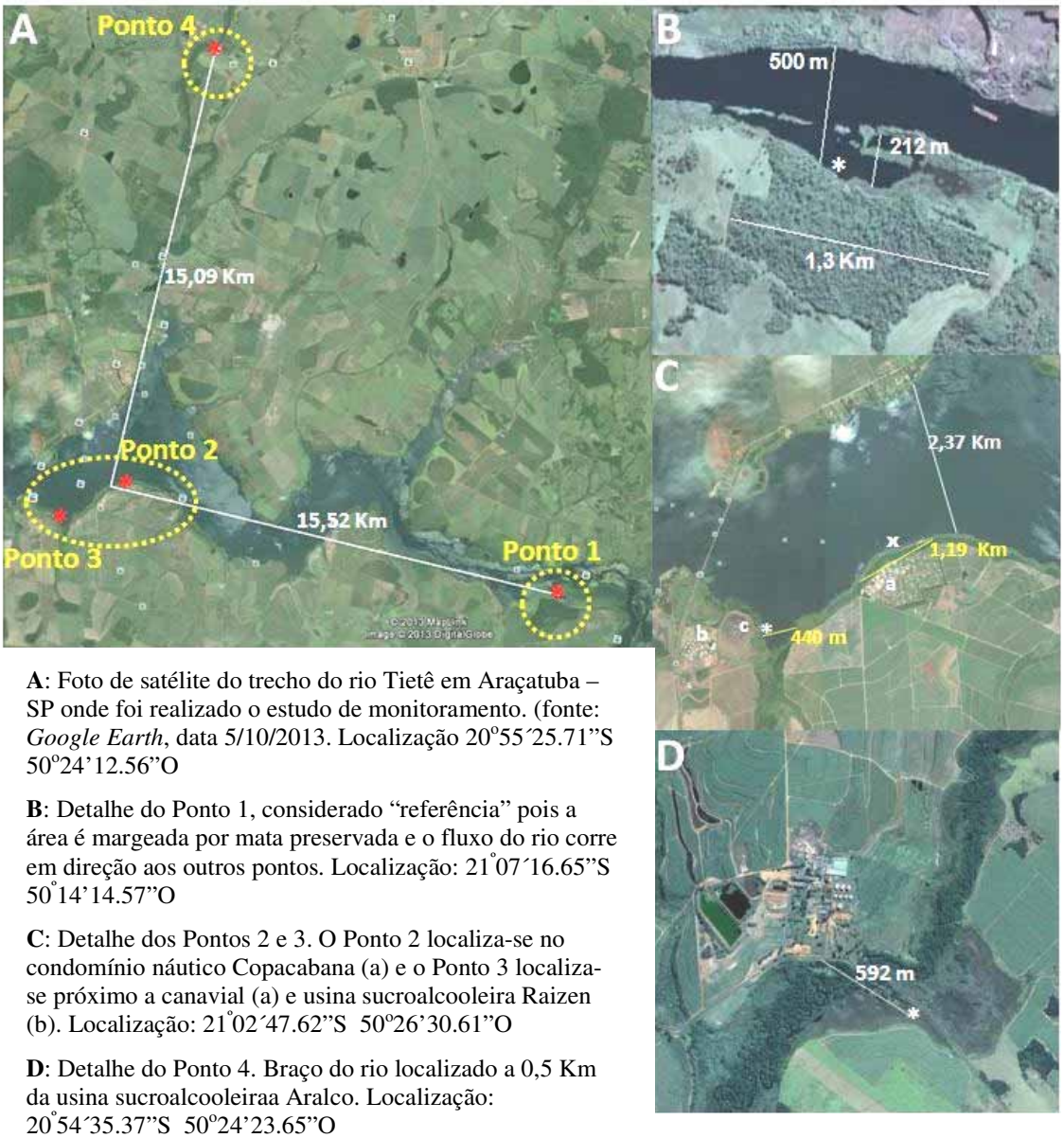


Figura 48: Fotografias do rio Tietê, no município de Araçatuba – SP (fonte: autora). **A**: Tietê Resort Convention Araçatuba. **B**: condomínio Residencial Copacabana. **C**: usina sulcro-alcoleira Raizen. **D** e **E**: margem do rio habitada por algas elodea.

O mapa na figura abaixo mostra a área do rio Tietê que foi estudada.



A: Foto de satélite do trecho do rio Tietê em Araçatuba – SP onde foi realizado o estudo de monitoramento. (fonte: *Google Earth*, data 5/10/2013. Localização 20°55´25.71"S 50°24'12.56"O

B: Detalhe do Ponto 1, considerado "referência" pois a área é margeada por mata preservada e o fluxo do rio corre em direção aos outros pontos. Localização: 21°07´16.65"S 50°14'14.57"O

C: Detalhe dos Pontos 2 e 3. O Ponto 2 localiza-se no condomínio náutico Copacabana (a) e o Ponto 3 localiza-se próximo a canavial (a) e usina sucroalcooleira Raizen (b). Localização: 21°02´47.62"S 50°26'30.61"O

D: Detalhe do Ponto 4. Braço do rio localizado a 0,5 Km da usina sucroalcooleiraa Aralco. Localização: 20°54´35.37"S 50°24'23.65"O

O rio corre no sentido do ponto 1 ao 2. O ponto 1 (B), o primeiro da área escolhida, é margeado por mata preservada com mais de 1 Km de extensão e forma uma espécie de lagoa natural na região, conforme a foto B e por isso foi considerado o ponto "referência".

O ponto 2 (C – x) é margeado por condomínio náutico com cerca de 700 lotes residenciais (a), com intensa atividade de lazer, principalmente nos finais de semana,

feriados e período de férias escolares. O local serve para banho, atividade de pesca e embarque/desembarque de lanchas, moto aquática e motores de popa.

O ponto 3 (C-*) é margeado por área impactada ocupada por canavial (c) e próximo a usina sucroalcooleira (b).

O ponto 4 (D) é um braço do rio, próximo a usina sucroalcooleira. Não há canavial nas redondezas, porém, há relatos de funcionário da usina que o braço do rio recebe efluente direto da usina (comunicação pessoal).

A figura 49 mostra em detalhe cada um dos pontos estudados.

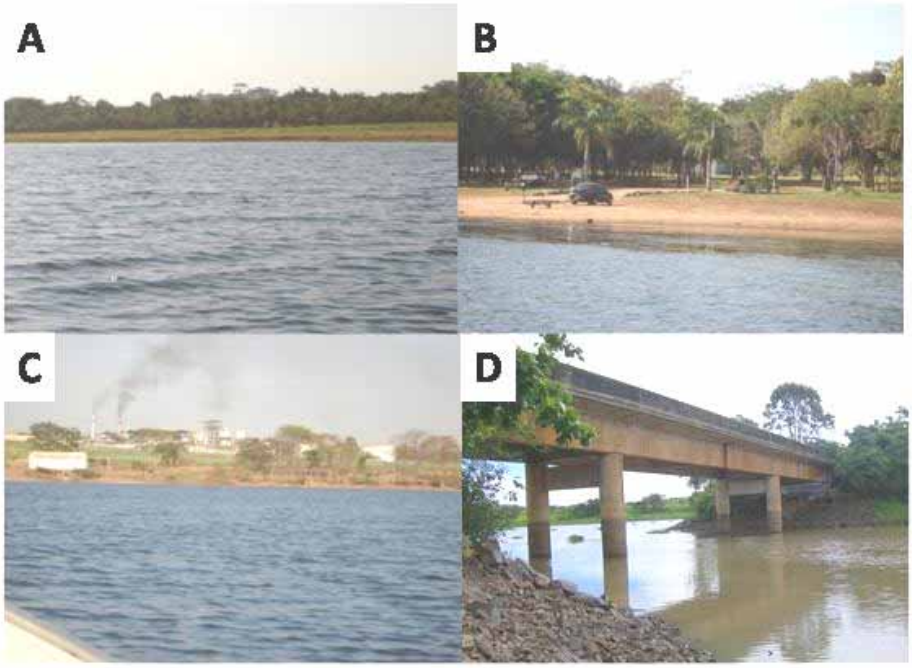


Figura 49: Detalhe dos pontos do rio Tietê, Araçatuba - SP (fonte: autora)
A: Ponto 1 - área preservada (referência)
B: Ponto 2 - condomínio Residencial Copacabana
C: Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucro-alcooleira
D: Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucro-alcooleira

No rancho, caixas de plástico que serviram como aquários foram preeenchidas com 20 litros de água e oxigenadas artificialmente e então os peixes foram colocados (um animal por caixa) e mantidos nessa água por 3 dias (período experimental). Foram usados no estudo 5 peixes expostos à água de cada um dos 4 pontos de coleta, totalizando 20 animais (Fig. 50).

Figura 50: Experimento de exposição das tilápias *Oreochromis niloticus* à água do rio Tietê de Araçatuba - SP. A: rancho no condomínio Copacabana onde foi montado o experimento. B: caixa (500 litros) onde os peixes permaneceram por 5 dias para aclimatação após a viagem. C: galões usados para coleta de água do rio. D e E: experimento de exposição dos peixes à água do rio. F: mensuração de parâmetro fisico-químico da água. G e H: coleta de material biológico.

Transcorridos os períodos experimentais, os peixes foram sedados com benzocaína (65 mg/L de água) e sacrificados por secção cervical e o fígado, brânquias e encéfalo foram dissecados e coletado sangue. Os tecidos foram armazenados em nitrogênio liquido e transportados para o laboratório. Com o sangue foi feito esfregaço e então fixados com metanol.

A atividade da CbE e da AChE foi medida pelo método de Ellman *et al*. (1961). As atividades da EROD, BROD e PROD foram avaliadas segundo o método de Burke e Mayer (1985). A análise da GST foi realizada segundo o método de Keen *et al*. (1976).

A quantificação de proteínas total das amostras foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Os níveis de MDA foram quantificados por HPLC com detector UV e monitorados a 532 nm (ALMEIDA *et al*., 2004; 2003). A análise de GSH foi realizada por meio de HPLC acoplado a um detector eletroquímico, seguindo a metodologia de Rodríguez-Ariza *et al*. (1994).

Para o teste do micronúcleo e anormalidades nucleares, após a fixação dos esfregaços procedeu-se o processo de coloração pela reação de *Schiff*.

Para os dados foram aplicados o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste de homogeneidade das variâncias (Levene). Os dados não paramétricos foram normalizados por transformação quadrática, logarítmica ou recíproca. Aplicou-se Anova *two-way* seguido do teste *post hoc* de Tukey.

2. Resultados

As características químicas e físicas da água coletada nos pontos estudados estão descritas na tabela 7.

Tabela 7: Características fisico-químicas da água coletada no trecho do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Exposição de tilápias *Oreochromis niloticus* à água do rio por 3 dias.

	COLETA DA ÁGUA		EXPOSIÇÃO DOS PEIXES					
			Início do período			Final do período (3 dias)		
	$[o_2]$ dissolvido ($mg.L^{-1}$)	**Temperatura (°C)**	**pH**	**Temperatura (°C)**	**$[o_2]$ dissolvido ($mg.L^{-1}$)**	**pH**	**Temperatura (°C)**	**$[o_2]$ dissolvido ($mg.L^{-1}$)**
ESTAÇÃO SECA								
Ponto 1	3,89	27,5	7,72 ± 0,24	26,8 ± 0,23	6,51 ± 0,31	7,89 ± 0,04	28,5 ± 0,22	6,23 ± 0,14
Ponto 2	2,81	28,5	7,99 ± 0,24	26,7 ± 0,50	6,84 ± 0,21	7,92 ± 0,08	28,3 ± 0,10	6,15 ± 0,21
Ponto 3	3,55	27,6	7,84 ± 0,07	27,0 ± 0,12	6,66 ± 0,17	7,88 ± 0,08	28,6 ± 0,21	6,15 ± 0,22
Ponto 4	4,11	26,8	7,85 ± 0,08	27,9 ± 0,19	6,58 ± 0,25	8,03 ± 0,06	28,9 ± 0,15	6,19 ± 0,18
ESTAÇÃO CHUVOSA								
Ponto 1	2,31	29,1	7,90 ± 0,03	27,3 ± 0,74	6,88 ± 0,19	7,46 ± 0,12	28,0 ± 0	6,17 ± 0,21
Ponto 2	3,18	28,1	7,88 ± 0	26,7 ± 0	6,74 ± 0,24	7,47 ± 0,14	27,9 ± 0	6,15 ± 0,20
Ponto 3	2,97	28,5	7,89 ± 0,01	26,6 ± 0	6,67 ± 0,33	7,41 ± 0,13	27,9 ± 0	6,17 ± 0,15
Ponto 4	4,34	27,8	7,92 ± 0,01	26,6 ± 0,08	6,63 ± 0,30	7,54 ± 0,11	27,9 ± 0	6,18 ± 0,15

Os valores dos parâmetros dos pontos para exposição dos peixes referem-se à média e desvio-padrão das mensurações nos aquários, para cada grupo experimental. Na estação seca o experimento ocorreu em setembro de 2012 e na estação chuvosa, em fevereiro de 2013.

Como pode ser observado, pH, temperatura e nível de oxigênio dissolvido não mostraram oscilações consideráveis durante o período experimental e nem entre os grupos experimentais. O uso da oxigenação artificial melhorou consideravelmente o nível de O_2 na água, que passou para níveis recomendáveis para tilápias de 6-8 $mg.L^{-1}$.

No fígado das tilápias a atividade da EROD não se mostrou diferente entre grupos expostos às águas coletadas nos diferentes pontos do rio Tietê e nem na estação seca em relação à estação chuvosa (Fig. 51).

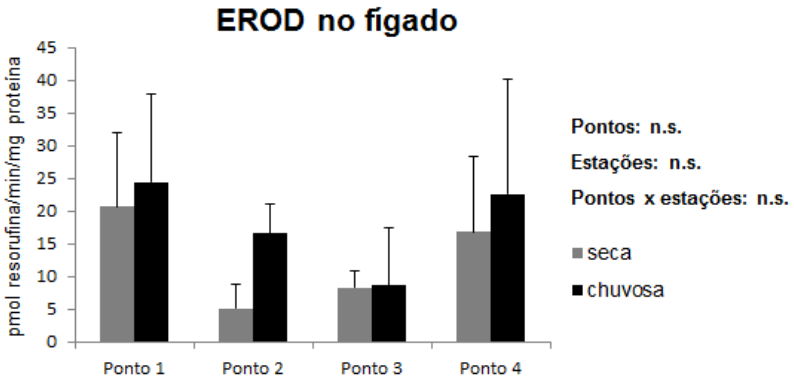


Figura 51: Atividade da enzima EROD no fígado de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. Anova two-way. n.s.: não significativo para $p < 0,05$.

Para a atividade da BROD no fígado das tilápias houve interação dos efeitos "ponto do rio" e "estação do ano". O grupo exposto à água coletada no ponto 4 (braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira), na estação chuvosa, apresentou nível aumentado da atividade da enzima em relação aos demais grupos (Fig. 52).

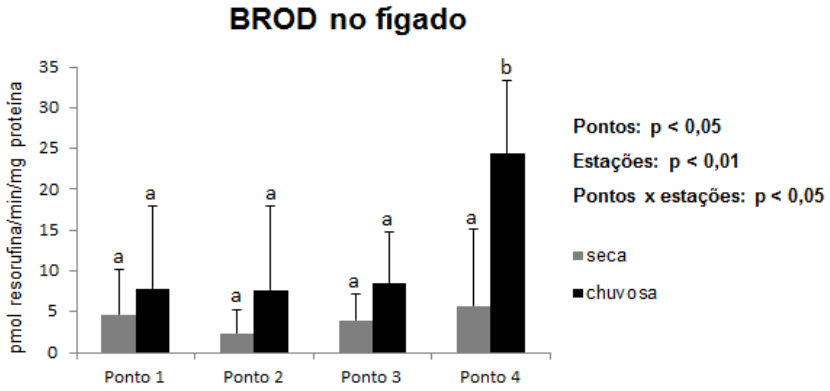


Figura 52: Atividade da enzima BROD no fígado de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. Teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença.

No fígado das tilápias a atividade da PROD se mostrou aumentado no grupo exposto à água coletada no ponto 3 (área próxima a canavial e usina de cana-de-açúcar) em relação aos pontos 1 (área referência) e ponto 2 (área de condomínio náutico), na estação chuvosa (Fig. 53).

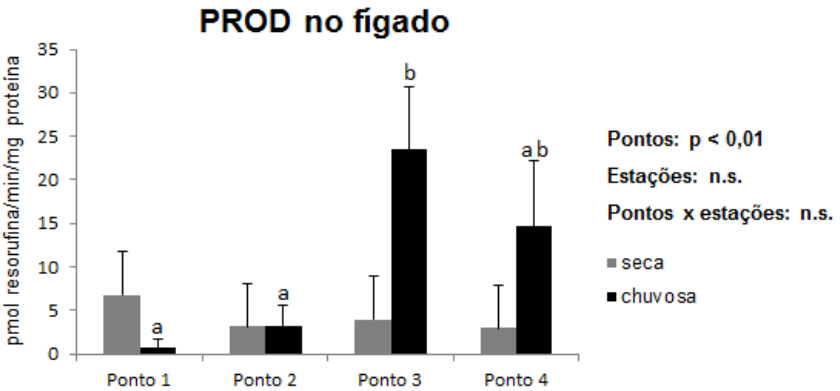


Figura 53: Atividade da enzima BROD no fígado de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. n.s.: não significativo para $p < 0,05$. Teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença.

No fígado das tilápias a atividade da GST se mostrou maior nos grupos expostos à água coletada na estação chuvosa em relação à estação seca, mas não diferiu entre os pontos (Fig. 54)

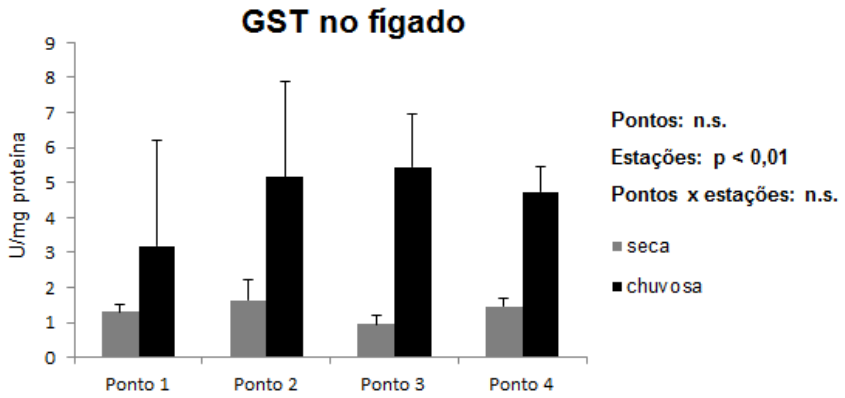


Figura 54: Atividade da enzima glutationa *S*-transferase no fígado de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. n.s.: não significativo para $p < 0,05$. Teste de Tukey.

Na brânquia das tilápias a atividade da GST se mostrou maior nos grupos expostos à água coletada na estação seca em relação à estação chuvosa e aumentado nos grupos exposto à água coletada nos 3 pontos sob influência antrópica em relação ao grupo referência (Fig. 55).

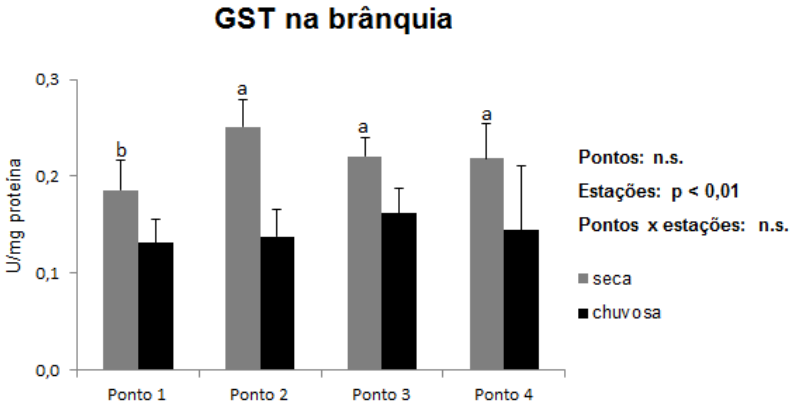


Figura 55: Atividade da enzima glutationa *S*-transferase na brânquia de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. n.s.: não significativo para $p < 0,05$. Teste de Tukey. letras diferentes indicam diferença.

No encéfalo das tilápias a atividade da AChE se mostrou menor nos grupos expostos à água coletada em todos os pontos na estação chuvosa em relação à estação seca, e o grupo exposto à água coletada no ponto 2 (área de condomínio náutico) se mostrou aumentada em relação aos grupos expostos à água coletada nos outros pontos, na estação seca (Fig. 56).

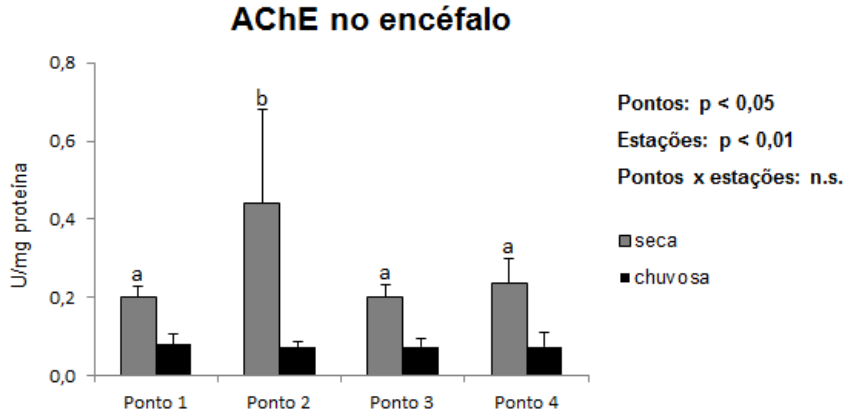


Figura 56: Atividade da enzima acetilcolinesterase no encéfalo de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. não significativo para $p < 0,05$. Teste de Tukey. n.s.: não significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença.

No fígado das tilápias a atividade da CbE se mostrou menor nos grupos expostos à água coletada na estação chuvosa em relação à estação seca, mas não diferiu entre os pontos (Fig. 57).

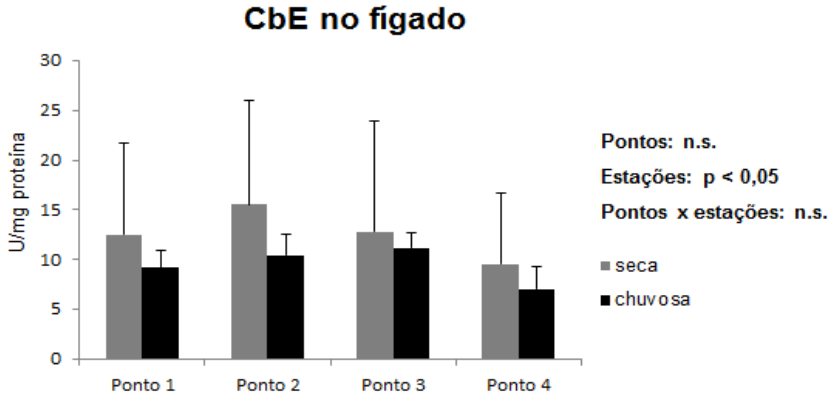


Figura 57: Atividade da enzima acetilcolinesterase no encéfalo de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. n.s.: não significativo para $p < 0,05$. Teste de Tukey.

Na brânquia das tilápias, assim como no fígado, a atividade da CbE se mostrou menor nos grupos expostos à água coletada na estação chuvosa em relação à estação seca, e no grupo exposto à água coletada no ponto 2 (área de condomínio náutico) se apresentou maior em relação aos demais pontos (Fig. 58).

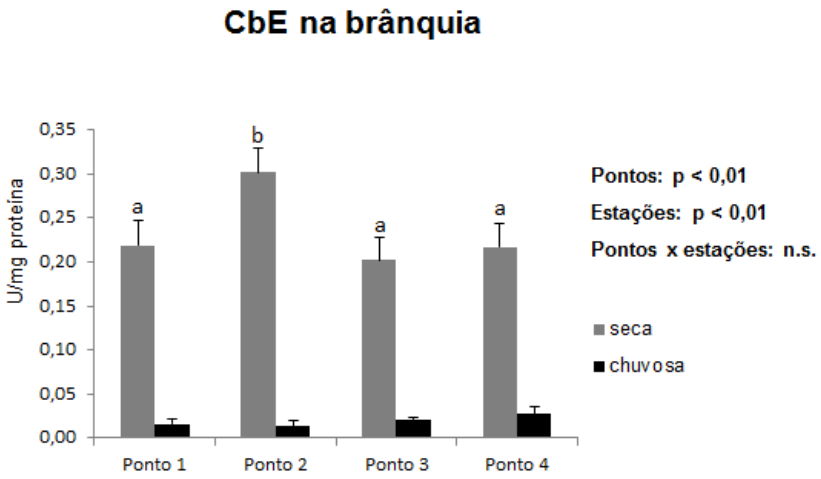


Figura 58: Atividade da enzima carboxilesterase na brânquia de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. n.s.: não significativo para $p < 0,05$. Teste de Tukey.

No fígado das tilápias os níveis do MDA se apresentaram aumentados nos grupos expostos às águas coletadas na estação chuvosa e diminuídos dos grupos expostos às águas coletadas na estação seca (Fig. 59).

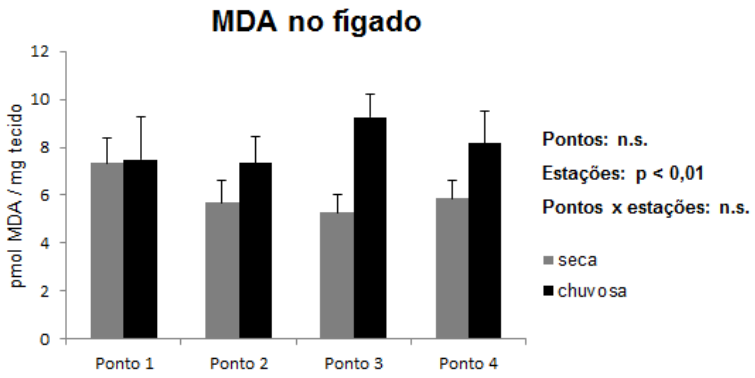


Figura 59: Níveis de malondialdeído no fígado de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. n.s.: não significativo para $p < 0,05$. Teste de Tukey.

Para os níveis de MDA na brânquia das tilápias houve interação dos efeitos "ponto do rio" e "estação". Na brânquia das tilápias os níveis de MDA se apresentaram maiores nos grupos expostos às águas coletadas na estação chuvosa e aumentado no grupo exposto ao ponto 2 (área de condomínio náutico) em relação aos outros grupos e na estação seca, o nível de MDA se apresentou diminuído no grupo exposto à água coletada no ponto 3 (área próxima a canavial e usina) em relação ao ponto 1 (referência) (Fig. 60).

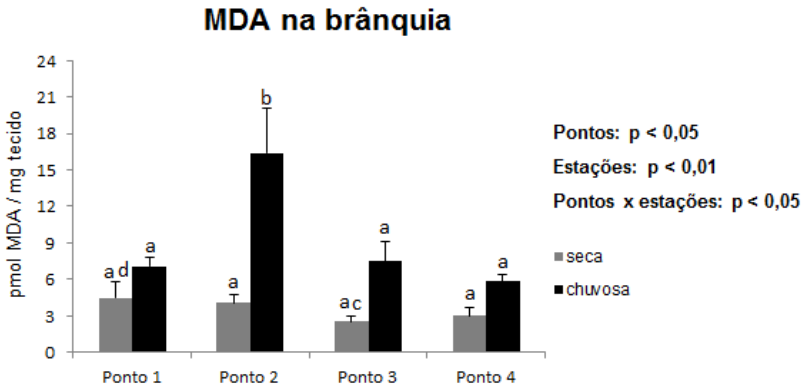


Figura 60: Níveis de malondialdeído na brânquia de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. Teste de Tukey. Letras difentes indicam diferença.

No fígado das tilápias os níveis de GSH se apresentaram maiores nos grupos expostos às águas coletadas na estação seca e aumentado no grupo exposto à água coletada no ponto 2 (área de condomínio náutico) em relação aos outros grupos, na estação. Na estação chuvosa o nível de GSH se apresentou menor no grupo exposto à água coletada no ponto 1 (referência) em relação aos demais pontos (Fig. 61).

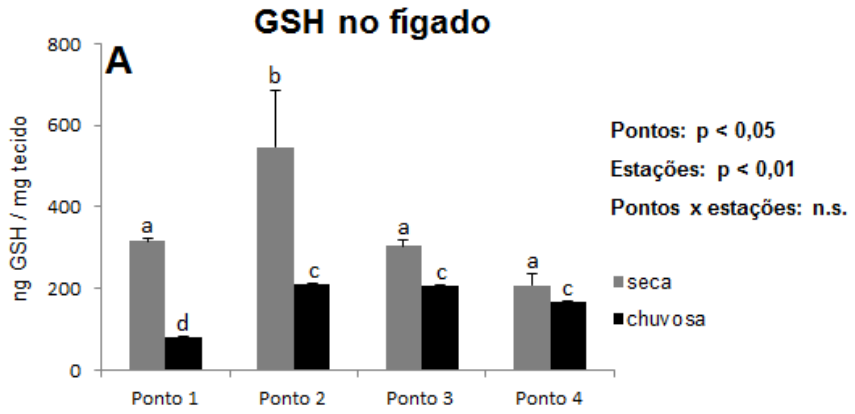


Figura 61: Níveis de glutationa reduzida no fígado de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. n.s.: não significativo para $p < 0,05$. Teste de TukeyLetras diferentes indicam diferença.

Na brânquia das tilápias os níveis de GSH se apresentaram maiores nos grupos expostos às águas coletadas na estação seca e diminuído no grupo exposto à água coletada no ponto 2 (área de condomínio náutico) em relação os grupos expostos à água coletadas nos outros pontos na estação chuvosa (Fig. 62).

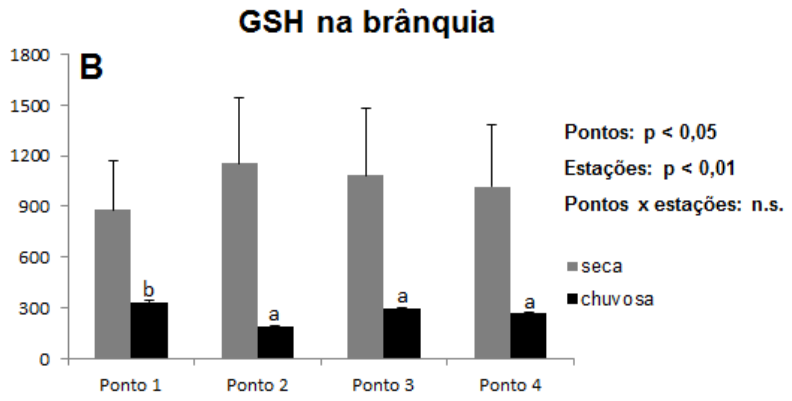


Figura 62: Níveis de glutationa reduzida na brânquia de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. n.s.: não significativo para $p < 0,05$. Teste de TukeyLetras diferentes indicam diferença.

Para a frequência de micronúcleos nos eritrócitos das tilápias houve interação dos efeitos "ponto do rio" e "estação do ano". Houve aumento na taxa de micronúcleos no grupo exposto à água coletada no ponto 1 (referência), na estação chuvosa, em relação a todos os outros grupos (Fig. 63-A).

Para a frequência de anormalidades nucleares nos eritrócitos não houve diferenças entre grupos expostos às águas coletadas nos diferentes pontos do rio Tietê e nem na estação seca em relação à estação chuvosa (Fig. 63-B).

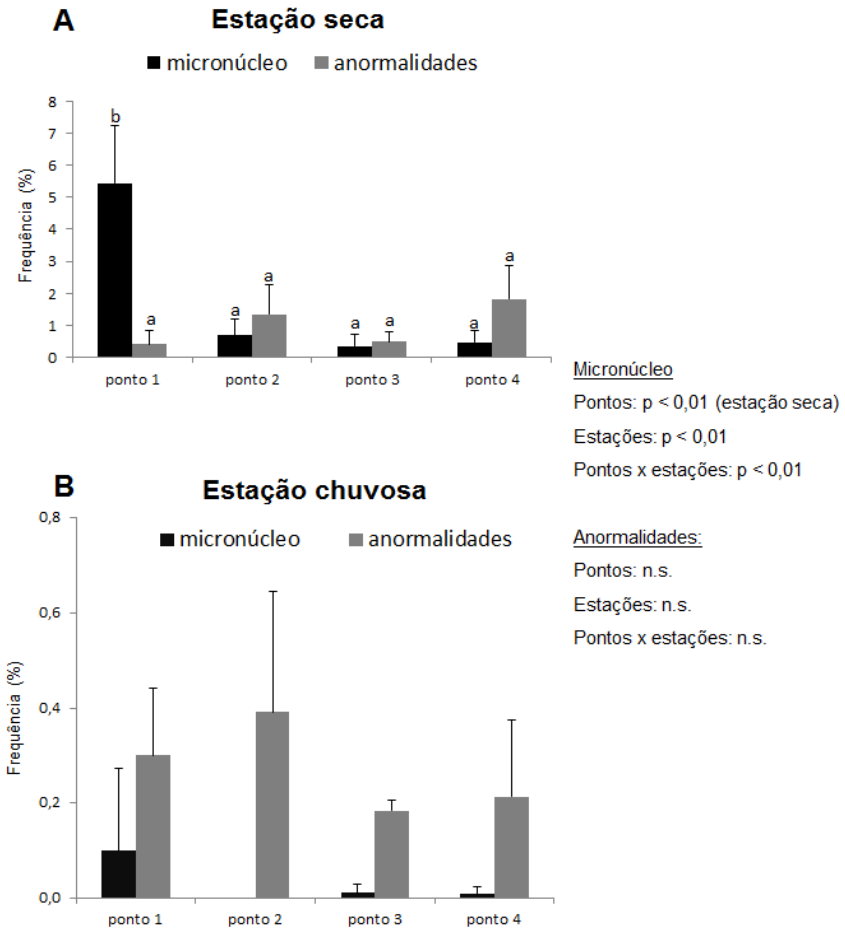


Figura 63: Taxa de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostas por 3 dias à água do rio Tietê no município de Araçatuba – SP. A: Taxa de micronúcleo. B: Taxa de anormalidades nucleares. Ponto 1 - área preservada. Ponto 2 - condomínio náutico residencial. Ponto 3 - área próxima a canavial e usina sucroalcooleira. Ponto 4 - braço do rio Tietê que recebe efluente de usina sucroalcooleira. n.s.: não significativo para $p < 0,05$. Teste de Dunn. * diferente de todos os grupos.

Na estação seca foi observada mais anormalidade do tipo *lobed* (tabela 8) e na estação chuvosa, mais do tipo *notched* (tabela 9).

Tabela 8: Incidência de alterações nucleares (médias e desvios padrão) encontradas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* após 3 dias de exposição em diferentes amostras de água coletadas ao longo do rio Tietê em Araçatuba - SP em estação seca.

Alterações	**Ponto 1**	**Ponto 2**	**Ponto 3**	**Ponto 4**
BL	0,6 ± 1,34	5,0 ± 4,06	0,6 ± 1,34	3,4 ± 1,97
NT	1,0 ± 2,23	4,8 ± 6,90	3,2 ± 2,38	11,8 ± 8,37
LB	4,6 ± 3,57	9,8 ± 5,49	3,6 ± 3,36	11,6 ± 8,14
BE	0,0 ± 0,00	0,6 ± 1,34	0,0 ± 0,00	0,6 ± 1,34
BN	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
CA	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
MT	3,0 ± 1,19	3,3 ± 2,96	1,2 ± 1,18	4,5 ± 3,80
TA	62	202	74	274
NCA	15000	15000	15000	15000

BL: núcleo *blebbed*; NT: núcleo *notched*; LB: lobed: BE: *brokeneggs*; BN: célula binucleada; CA: cariólise; MT: média total; TA: total de células analisadas com alterações; NCA: número total de células analisadas. Teste de Kruskal-Wallis.

As frequências de anormalidades foram observadas na seguinte ordem: *lobed* > *notched* > *blebbed* > *brokeneggs*. Não foi observada célula binucleada e cariólise.

Tabela 9: Incidência de alterações nucleares (médias e desvios padrão) encontradas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* após 3 dias de exposição em diferentes amostras de água coletadas ao longo do rio Tietê em Araçatuba - SP em estação chuvosa.

Alterações	**Ponto 1**	**Ponto 2**	**Ponto 3**	**Ponto 4**
BL	0,3 ± 0,57	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
NT	12,3 ± 8,50	8,2 ± 10,80	33,6 ± 22,67	2,2 ± 1,70
LB	1,0 ± 1,73	3,7 ± 1,91	3,0 ± 2,64	5,1 ± 3,74
BE	3,3 ± 4,93	0,0 ± 0,50	0,0 ± 0,00	0,5 ± 1,00
BN	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
CA	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
MT	2,8 ± 5,12	1,9 ± 5,68	6,1 ± 3,05	1,2 ± 3,03
TA	120	94	222	64
NCA	15000	15000	15000	15000

BL: núcleo *blebbed*; NT: núcleo *notched*; LB: lobed: BE: *brokeneggs*; BN: célula binucleada; CA: cariólise; MT: média total; TA: total de células analisadas com alterações; NCA: número total de células analisadas. Teste de Kruskal-Wallis.

As frequências de anormalidades foram observadas na seguinte ordem: *notched* > *lobed* > *blebbed* > *brokeneggs*. Não foi observada célula binucleada e cariólise.

3. Discussão

De modo geral as enzimas de fase *I* mostraram maior nível de atividade nas tilápias expostas às águas coletadas em áreas próximas de usina e usina e canavial (pontos 4 e 3).

A atividade da EROD não mostrou variação entre os pontos nem entre as estações. Esses achados mostraram que entre os pontos, nos períodos estudados, não haveria na água compostos que pudessem estar induzindo a isoforma em concentração suficiente para elevar o nível basal da enzima, em relação ao do ponto 1, como referência.

A atividade da BROD nas tilápias expostas à água coletada no bracinho do rio próximo a usina, se apresentou elevada, independente da estação, sugerindo a presença no ponto 4 de composto (s) indutor(es) da isoforma de fase *I*, que seria oriundo da própria usina e independentemente da fase de funcionamento dela e de fatores ambientais.

A atividade da PROD nas tilápias expostas à água coletada em área de usina a canavial se apresentou aumentada comparada com área de referência e ocupada por condomínio náutico, na estação chuvosa. Esses achados sugerem a presença no ponto 3 de composto (s) indutor (es) da isoforma de fase *I* que poderia ser oriundo do canavial e/ou usina. Essa observação ocorreu na estação chuvosa que coincide com o período de plantio da cana, momento onde os fertilizantes e agrotóxicos são usados, que poderiam ser carregados pela chuva para o rio.

Mortensen e Arukwe (2009) observaram em *Salmo salar* aumento na atividade da BROD e PROD por exposição ao tributilestanho de 1 a 5 µM, de 12 a 48 horas. Meimberg *et al.* (1997) observaram aumento na atividade da EROD, BROD e PROD em gastrópodes expostos ao Aroclor (mistura de bifenilas policloradas). Parente *et al.* (2004) detectaram aumento na PROD em *O. niloticus* residentes no rio Guandú, principal abastecedor de água da cidade do Rio de Janeiro.

Na estação chuvosa a atividade da GST no fígado se mostrou maior nas tilápias expostas à água coletada na estação chuvosa e menor na brânquia quando expostas à água coletada na estação seca. Uma das explicações para os maiores níveis na atividade da enzima da fase *II* na estação chuvosa pode ser também a questão do uso de agrotóxicos nos canaviais, mas também fatores ambientais devem influenciar. Na

estação chuvosa, o fluxo de água é mais corrente consequentemente, mais material e compostos estão circulantes. Além disso, as chuvas carregam para o rio material particulado como agrotóxicos usado nos canaviais e pastos da região. Isso explicaria a indução da biotransformação por compostos presentes na água do rio nas tilápias.

Na estação seca, os maiores níveis de GST na brânquia das tilápias poderiam ser atribuídos à influência dos ventos, que carregam material particulado para a água, oriundos da queima da cana, como HPAs, que coincide com o período (abril a novembro). Tridico *et al.* (2010) observaram que BaP induzem a atividade da GST.

Também na estação seca, na brânquia, houve indução da GST nos grupos expostos à água coletada nas áreas sob influência de condomínio, usina e canavial. O condomínio fica próximo do ponto 3 e assim próximo a canavial e usina. Logo o vento pode estar carregando material particulado pelas usinas (pontos 3 e 4) e canavial (ponto 3) e com isso atingir o rio. E o próprio condomínio com atividades de lazer, como uso de motor de popa e moto d'água na prainha, entre outros, contamina a água. A coleta foi feita aos domingos justamente quando é maior a atividade humana no condomínio.

A menor atividade da AChE no encéfalo das tilápias expostas à água coletada na estação chuvosa pode ser decorrente do escoamento pela chuva dos agrotóxicos usados não só nos canaviais mas na agricultura e pecuária de forma geral, em toda a região, pois até no ponto referência observou-se esse efeito. Além disso, o fluxo mais corrente, característico da estação, contribui para o efeito. Mas houve um aumento na atividade da enzima nas tilápias expostas à água coletada no condomínio náutico.

Os níveis da CbE no fígado e na brânquia também se mostraram diminuídos na estação chuvosa. Provavelmente pela mesma influência da lavagem dos agrotóxicos pela chuva e pelo fluxo mais corrente na estação que potencializa esse efeito. Na brânquia, também ocorreu aumento na atividade da enzima nas tilápias expostas à água coletada no condomínio; pode ser pelo fator que causou o aumento na atividade da AChE ou pelo fato da CbE ser uma hidrolase de fase *I*, ter sido aumentada pela presença de composto (s) indutores na água (KLAASSEN; WATKINS, 2011).

Na estação chuvosa ocorreram os maiores níveis de MDA nas tilápias. O aumento nos níveis de MDA poderia ser consequência do estresse oxidativo celular gerado na biotransformação dos compostos presentes na água, que corroborando com os

maiores níveis de GST observados no fígado das tilápias, sugerem que nessa estação esses compostos estão em maiores concentrações (CHUNG *et al*., 2013).

Na brânquia o grupo exposto à água coletada na área do condomínio apresentou nível de MDA aumentado em relação a todos os outros pontos em ambas as estações revelando que independentemente da época do ano as atividades antrópicas na área devem estar depositando na água algum tipo de material e/ou resíduo que esteja causando estresse oxidativo celular no epitélio branquial dos peixes. Na estação seca, houve diminuição no nível de MDA no grupo exposto à água coletada na área próxima a usina e canavial em relação à área referência.

Na estação chuvosa houve depleção de GSH no fígado das tilápias em relação à estação seca corroborando com os outros resultados. Nossos achados sugerem que na estação chuvosa, o aumento na concentração de compostos na água carregados pela chuva, está causando indução da GST e com isso depletando GSH, seu cofator. Porém, na estação chuvosa, os grupos expostos à água coletada nas áreas sob influência antrópica, ou seja, de condomínio, canavial e usina e usina, apresentaram estímulo de síntese em relação ao grupo exposto à água da área referência, sugerindo uma resposta mais tardia à metabolização de compostos que devam estar presentes na água. E na estação seca, o grupo exposto à água coletada na área do condomínio apresentou estimulo de síntese da GSH em relação aos outros grupos também sugerindo uma resposta mais tardia à metabolização (HELLOU *et. al*., 2012).

Na brânquia das tilápias também houve depleção de GSH em relação à estação seca, mas esse achado não condiz com a atividade da GST no tecido, que diminuiu. Esse achado pode estar relacionado com a atividade da gluationa peroxidade que não foi avaliada, que pode ter aumentado e consumido GSH (FARBER *et al*., 1990. E essa depleção foi significativamente maior no grupo exposto à água coletada na área do condomínio o que pode sugerir um comprometimento mais expressivo desses peixes.

Em relação aos efeitos genotóxicos, as tilápias expostas à água coletada na área referência apresentaram aumento na taxa de micronúcleos revelando a presença no local de composto (s) com potencial genotóxico, independentemente da estação do ano.

Os efeitos observados no ponto 2, como aumento na atividade da AChE, aumento no nível de MDA, e estímulo de síntese de GSH podem estar relacionados com a presença de metais na água. Lima *et al.* (2013) observaram que o cobre a 0,06 $mg.L^{-1}$

e Sant'Anna *et al*. (2011) observaram que o ferro a 2,6 mM causam aumento na atividade da enzima em *Danio rerio*. E Jebali *et al.* (2006) observaram que o chumbo a 50 (μg/Kg) aumenta a atividade da AChE em *Seriola dumerilli*.

Os motores de popa e motos d'água são movidos á gasolina, que pode conter metais (SANCHEZ-HERNANDEZ, 2000). É comum usuários do condomínio "esgotarem" o combustível que resta no motor, no final dia, queimando-o liberando os resíduos ainda na água. Aumento nos níveis de MDA e estímulo de síntese de GSH observados também podem estar associados à presença de metais na água, que estão induzindo estresse oxidativo (CHUNG *et. al*., 2013; SRIKANTH *et al.,* 2013).

A estação chuvosa e a área de condomínio residencial náutico acarretaram em mais alterações nos biomarcadores bioquímicos testados, em relação à estação seca e à área referência e áreas sob influência de usina sucroalcooleira e usina a canavial.

Avaliando a região estudada, como um todo, ela é caracterizada pela atividade sucroalcooleira, com canaviais e três usinas que produzem açúcar e álcool próximos ao rio e à cidade, além de áreas de criação de gado. As usinas estão em período de produção de março a dezembro.

Tanto no cultivo da cana quanto na pecuária usam-se agrotóxicos para o controle de pragas que são carregados pela chuva para o rio. Na estação chuvosa o fluxo do rio é maior do que na estação seca e com isso, o aporte dos contaminantes trazidos pela água da chuva também é maior e mais substâncias e material são carregados pela correnteza. Isso explicaria nossos achados. Além disso, a estação chuvosa coincide com o período de maior produção das usinas sucroalcooleiras. E a queima do bagaço libera pelas caldeiras HPAs e óxidos de nitrogênio e monóxido de carbono (Paoliello, 2006) que também pode ser carregados da atmosfera para a água do rio.

Na estação chuvosa, mais precisamente no mês de fevereiro, período em que realizamos o estudo, a temperatura ambiental é maior do que em setembro, período em que realizamos o estudo na estação seca. Mas como não fizemos o trabalho com os peixes exposto à água no rio e sim em aquário, em estação experimental, como mostram os dados na tabela 7, a temperatura não oscilou significativamente entre os dois experimentos, então esse fator não deve ter influenciado nas respostas.

A estação chuvosa coincide com o período de aplicação dos agrotóxicos nos canaviais, de janeiro a fevereiro, então a chuva lava a plantação carregando esses

compostos para o rio. Isso corrobora com os níveis diminuídos das esterases observados na estação em relação à estação seca.

Carvalho *et al.* (2011) em estudo de biomonitoramento observaram aumento de mutagenicidade em lagosta na estação chuvosa, em relação à seca e atribui esse achado ao aumento do lixiviamento de compostos das áreas ciliares dos corpos pluviais que deságuam no mar.

A água coletada na área do condomínio, sob influência antrópica, acarretou em mais efeitos nas tilápias sugerindo que as atividades de lazer humanas estão comprometendo o metabolismo dos peixes.

No estudo de monitoramento ambiental na área referência, observamos aumento na taxa de MN, independente da estação. Pode ser uma característica inerente do local, como a presença de alga ou planta na margem do rio que produza substância mutagênica. A taxa de anormalidades não mostrou o mesmo resultado. No entanto esse local pode ter a presença de composto (s) com potencial mutagênico em relação aos pontos outros estudados.

Concluindo, no estudo de monitoramento, as enzimas de fase *I* que se mostraram induzidas foram a BROD e a PROD. A atividade da GST foi afetada de forma adversa na estação seca e chuvosa. A atividade da AChE e da CbE se mostrou diminuída na estação chuvosa. Os níveis de MDA aumentaram e de GSH diminuíram, na estação chuvosa. Mais efeitos nas tilápias foram observados nos biomarcadores, na estação chuvosa, e o grupo exposto à água coletada na área do condomínio náutico (ponto 2) apresentou mais efeitos nos biomarcadores .

Conclusões

3. Conclusões

✓ 100 μg.L^{-1} de benzo(a)pireno; 500 μg.L^{-1} de diazinon; 1,5 μg.L^{-1} de cipermetrina; 2,5 μg.L^{-1} de 17β-estradiol, isoladamente, promove alteração mais acentuadas nas tilápias;

✓ Enquanto na exposição aos contaminantes isolados a atividade da EROD não variou pela exposição ao BaP e E2, a atividade da BROD foi induzida pela BaP e da PROD diminuída pelo E2;

✓ O efeito de um contaminante pode ser afetado pela presença de outro contaminante;

✓ O efeito da mistura pode ser potencializado em relação ao efeito do contaminante individualmente;

✓ As tilápias podem responder diferentemente à mistura em alta e baixa concentração dos contaminantes e em alta concentração causou respostas mais acentuadas;

✓ Os efeitos do BaP , do OP ou do PI podem ser influenciados pela pré-exposição ao E2 e ao BaP;

✓ A inibição de P450 decorrente da pré-exposição ao E2 não potencializou a ação tóxica do OP (inibição de esterases) e, por conseguinte, não potencializou a ação tóxica do PI;

✓ A biotransformação de (OP + PI) por P450 não foi afetada pela pré-exposição ao E2;

✓ A biotransformação de (OP + PI) pela EROD e BROD é afetada pela pré-exposição ao BaP.

- ✓ No estudo de monitoramento no rio Tietê na região de Araçatuba – SP, as tilápias apresentam diminuição das esterases, indução de enzimas de fase *I* e estresse oxidativo;

- ✓ A área que se mostrou mais impactada foi à ocupada por condomínio náutico, de atividades de pesca e lazer;

- ✓ Mais efeitos foram observados nas tilápias expostas às aguas coletadas na estação chuvosa.

Referências

VI. Referências

ABEL EL, LYON RP, BAMMLER TK, VERLINDE CL, LAU SS, MONKS TJ, EATON DL. Estradiol metabolites as isoform-specific inhibitors of human glutathione *S*-transferases. *Chem Biol* Interact., v. 151, p. 21-32, 2004.

ALMEIDA EA, MIYAMOTO S, BAINY AC, DE MEDEIROS MH, DI MASCIO P. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Mar Pollut Bull*., v. 49, p. 386-92, 2004.

ALMEIDA EA, MARQUES SDE A, KLITZKE CF, BAINY AC, DE MEDEIROS MH, DI MASCIO P, LOUREIRO AP. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna. Comp Biochem Physiol Part C Pharmacol Toxicol*., v. 135, 295-03, 2003.

ANADÓN A, MARTÍNEZ-LARRAÑAGA MR, MARTÍNEZ MA. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *Vet J*., v. 182, p. 7-20, 2009.

ANSARI RA, RAHMAN S, KAUR M, ANJUM S, RAISUDDIN S. *In vivo* cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Ecotoxicol Environ Saf*., v. 74, n. 1, p. 150-6, 2011.

ARUKWE A, NORDTUG T, KORTNER TM, MORTENSEN AS, BRAKSTAD OG. Estimation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Dario rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environ Res*., v. 107, p. 362-70, 2008.

ASSIS HCS, NICARETA L, SALVO LM, CLAUDIO KLEMZ, C, TRUPPEL JH, CALEGARI R. Biochemical biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ancistrus multispinis. Braz. Arch. Biol. Technol*., v. 52, p. 1401-07, 2009.

Atlas de saneamento. **Saneamento e meio ambiente**. KRONEMBERGER, D. M. P.; PEREIRA, R. DA S. DE FREITAS, E. A. V.; SCARCELLO, J. A.; CLEVELARIO JUNIOR, J. 36 p. IBGE, 2011.

BADAWI AF, CAVALIERI EL, ROGAN EG. Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16alpha-hydroxylation of 17beta-estradiol. *Metabolism*. v. 50, p. 1001-3, 2001.

BELIAEFF B, BURGEOT T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. Environ. Toxicol Chem., v. 21, p. 1316–22, 2002.

BITENCOURT FO, FRIGHETTO RTS, QUEIROZ JF, LOSEKANN ME, LUIZ, A JB, ALMEIDA EA. PROD and BROD Modulation in Nile Tilapia after Exposure to 17 β-estradiol. *J of Life Sci*., n. 5, p. 287-90, 2011.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*., v. 7, n. 72, p. 248-54, 1976.

BRAMMELL BF, PRICE DJ, BIRGE WJ, HARMEL-LAWS EM, HITRON JA, ELSKUS AA. Differential sensitivity of CYP1A to 3,3',4',4-tetrachlorobiphenyl and benzo(a)pyrene in two *Lepomis* species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*., v. 152, p. 42-50, 2010.

BURKE MD, MAYER RT. Ethoxy-, pentoxy- and benzylloxyphenones ans homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol*., v. 34, p. 33-7, 1985.

BUTALA H, METZGER C, RIMOLDI J, WILLETT KL. Microsomal estrogen metabolism in channel catfish. *Mar Environ Res*., v. 58, p. 489-94, 2004.

CARRASCO KR, TILBURY KL, MAYERS MS. Assessment of the piscine micronuclei test as *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. *Can J of Fish and Aquat Sci*., v. 47, p. 2123-36, 1990.

CARVALHO CMM, CAVALCANTE AA, DANTAS AF, PEREIRA DL, ROCHA FC, OLIVEIRA FM, DA SILVA J. Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in Piauí, Brazil. *Chemosph*., v. 82, p. 1056-61, 2011.

ÇAVAS T, ERGENE-GÖZÜKARA S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat Res*., v. 538, p. 81-91, 2003.

CETIN H, CILEK JE, OZ E, AYDIN L, DEVECI O, YANIKOGLU A. Comparative efficacy of spinosad with conventional acaricides against hard and soft tick populations from Antalya, Turkey. *Vet Parasitol.*, v. 7, p. 101-4, 2009.

CHANDRASEKERA LK, PATHIRATNE A. Response of brain and liver cholinesterases of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to single and multiple exposures of chlorpyrifos and carbosulfan. *Bull Environ Contam Toxicol*., v. 75, p. 1228-33, 2005.

CHUNG ML, LEE KY, LEE CY. Profiling of oxidized lipid products of marine fish under acute oxidative stress. *Food Chem Toxicol.*, v. 53, p. 205-13, 2013.

CONNOR JA, FERGUNSON MA. **Essential Medical Genetics**. Smith Blackwell Scientific Publications. London, 260 p. 1993.

CORRALES J, THORNTON C, WHITE M, WILLETT KL. Multigenerational effects of benzo[a]pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. *Aquat Toxicol*., v. 3, p. 16-26, 2014.

COSTA J, FERREIRA M, REIS-HENRIQUES MA. Exposure route as a key factor in benzo(a)pyrene detoxification in Nile tilapia. 15th. International Symposium "Pollutant Responses in Marine Organisms" (**PRIMO 15**), 17-20 Maio. Bordéus, França. poster 2009.

CRAIG ZR, WANG W, FLAWS JA. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction*., v. 142, p. 633-46, 2011.

CURTIS LR, GARZON CB, ARKOOSH M, COLLIER T, MYERS MS, BUZITIS J, HAHN ME. Reduced cytochrome P4501A activity and recovery from oxidative stress during subchronic benzo[a]pyrene and benzo[e]pyrene treatment of rainbow trout. *Toxicol Appl Phamacol*., v. 254, p. 1-7, 2011.

Dossiê ABRASCO – **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 2 - Agrotóxicos, Saúde, Ambiente e Sustentabilidade**. AUGUSTO, L. G. S.; CARNEIRO, F. F.; PIGNATI , W.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRIC H, K.; FARIA, N. M. X.; BÚRIGO, A. C.; FREITAS, V. M. T.; GUIDUCCI FILHO, E. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

ELHALWAGY ME, ZAKI NI. Comparative study on pesticide mixture of organophosphorus and pyrethroid in commercial formulation. *Environ Toxicol and Pharmacol*., v. 28, p. 219-24, 2009.

ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES V Jr, FEATHER-STONE RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*., v. 7, p. 88-95, 1961.

FARBER JL. Biology of disease mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest*., v. 62, p. 670-8, 1990.

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

FENECHAND M J, CROTT W. Micronuclei neoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes - evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res*., v. 504, p. 131-6, 2002.

FERNANDES TCC, MAZZEO DEC, MARIN-MORALES MA. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pest Bioch and Physiol*, v. 88, p. 252-9, 2007.

FIEDLER H, MUCKE W. *In* **The Handbook of Environmental Chemistry**. Hutzinger O. Springer Verlach. 1995.

FLAMMARION P, MIGEON B, URIOS S, MORFIN P, GARRIC J. Effect of methidathion on the cytochrome P-450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquat Toxicol*., v. 42, p. 93-102, 1998.

GAGNAIRE B, GEFFARD O, NOURY P, GARRIC J. *In vivo* indirect measurement of cytochrome P450-associated activities in freshwater gastropod molluscs. *Environ Toxicol.*, v. 25, p. 545-53, 2010.

GOWLAN BT, MOFFAT CF, STAGG RM, HOULIHAN DF, DAVIES IM. Cypermethrin induces glutathione *S*-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res*.,v. 54, p. 169-77, 2002.

GRISOLIA CK. **Agrotóxicos - Mutações, Câncer & Reprodução**. 1 ed. Editora Universidade de Brasília. 392 p. 2005.

GRISOLIA CK, STARLING FLM. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat Res*., v. 491, p. 39-44, 2001.

HAGEMEYER CE, BÜRCK C, SCHWAB R, KNOTH R, MEYER RP7-Benzyloxyresorufin-O-dealkylase activity as a marker for measuring cytochrome P450 CYP3A induction in mouse liver. *Anal Biochem*., v. 398, p. 104-11, 2010.

HAHN ME, STEGEMAN JJ. Regulation of cytochrome P4501A1 in teleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish Stenotomus chrysops. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v. 127, p. 187-98, 1994.

HARTL MG, KILEMADE M, SHEEHAN D, MOTHERSILL C, O'HALLORAN J, O'BRIEN NM, VAN PELT FN. Hepatic biomarkers of sediment-associated pollution in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Mar Environ Res*., v. 64, p. 191–208, 2007.

HARVEY RG. *In* **Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis**, Harvey RG. American Chemical Society, Washington. 1985.

HEDDLE J A, HITE M, IRKHART B, MACGREGOR JTE, SALAMONE MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity – a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. *Mutat Res*., v. 123, p. 61-118, 1983.

HELLOU J, ROSS NW, MOON TW. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. *Environ Sci Pollut Res*., v. 19, p. 2007-23, 2012.

HOFFMANN JL, ORIS JT. Altered gene expression: a mechanism for reproductive toxicity in zebrafish exposed to benzo[a]pyrene. *Aquat Toxicol.*, v. 78, p. 332-40, 2006.

HYNE RV, MAHER WA. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol Environ Safe*., v. 54, p. 366-74, 2003.

JACOB J, KARCHER W, BELLIARDO JJ, DUMLER R, BOENKE A, FRESENIUS J. **Analitic Chemistry**. 1991.

JAMES MO. Steroid catabolism in marine and freshwater fish. *J Steroid Biochem Mol Biol*., v. 127, p. 167-75, 2011.

JEBALI J, BANNI M, GUERBEJ H, ALMEIDA EA, BANNAOUI A, BOUSSETTA H. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. *Fish Physiol Biochem*., v. 32, p. 93-8, 2006.

JOBLING S, NOLAN M, TYLER CR, BRIGHTY G, SUMPTER JP. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environ Sci Technol*., v. 32, p. 2498-2506, 1998.

JOHNSON AC, BELFROID A, DI CORCIA A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci Total Environ*., v. 256, p. 163-73, 2000.

KARAMIAN A, SHOKRZADEH M, AHMADI A. The potential chemoprotective effects of melatonin against genotoxicity induced by diazinon in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Ind Health*. 2013. Oct 4. [Epub ahead of print]

KEEN JH, HABIG WH, JAKOBY WB. Mechanism for the several activities of the glutathione *S*-transferases. *J Biol Chem*., v. 251, p. 6183-8, 1976.

KEIZER J, D'AGOSTINO G, NAGEL R, VOLPE T, GNEMI P, VITTOZZI L. Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. *Sci Total Environ*., v. 171, p. 213-20, 1995.

KLAASSEN CD, WATKINS JB. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6 ed. New York: McGraw-Hill Medical. 1236 p. 2011.

KORKMAZ N, CENGIZ EI, UNLU E, UYSAL E, YANAR M.. Cypermethrin-induced histopathological and biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and the protective and recuperative effect of ascorbic acid. *Environ Toxicol Pharmacol*., v. 28, p. 198-205, 2009.

KOUREAS M, TSAKALOF A, TSATSAKIS A, HADJICHRISTODOULOU C. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicol Lett*., v. 210, p. 155-68, 2012.

KRONEMBERGER MDP, PEREIRA RS, FREITAS EAV, SCARCELLO JA, CLEVELARIO JUNIOR JC. Saneamento e meio ambiente. Atlas de saneamento – IBGE. 36 p. 2011.

KUMAR A, RAI D, SHARMA B, PANDEY RS. k-cyhalothrin and cypermethrin induced in vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pestic Biochem and Physiol*., v. 93, p. 96–9, 2009.

LANDOLT ML, KOCAN RM. Fish cell cytogenetics: a measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. *Aquat Toxicol*., v. 4, p. 336-53, 1983.

LEITE PZ, MARGARIDO TC, DE LIMA D, ROSSA-FERES DDE C, DE ALMEIDA EA. Esterase inhibition in tadpoles of Scinax fuscovarius (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. *Environ Sci Pollut Res Int*., v. 17, p. 1411-21, 2010.

LEWIS DFV. **Guide to Cytochromes P450 – Structure and Function**. Taylor & Francis Group, 2001.

LIMA D, ROQUE GM, DE ALMEIDA EA. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar Environ Res*., v. 91, p. 45-51, 2013.

LIU P, SONG X, YUAN W, WEN W, WU X, LI J, CHEN X. Effects of cypermethrin and methyl parathion mixtures on hormone levels and immune functions in Wistar rats. *Arch Toxicol.*, v. 80, p. 449-57, 2006.

LOPES LGL, MARCHI MRR, SOUZA JGG, MOURA JA, LORENZON CS, CRUZ C, AMARAL LA. Estrogens in natural and treated waters in the region of Jaboticabal - São Paulo, Brazil. *Quím Nova,* v. 33, p. 639-43, 2010.

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

LOUREIRO APM, DI MASCIO P, MEDEIROS MHG. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogêgense. *Quím Nova*, v. 25, p. 777-93, 2002.

LUSHCHAK VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol*., v. 101, p. 13-30, 2013.

MARIGOUDAR RS, AHMED RN, DAVID M. Cypermethrin induced respiratory and beravioural responses of the freshwater teleost, *Labeo rohita* . *Vet Arhiv*., v. 79, p. 583-90, 2009.

MARTINELLI LA; FILOSO S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. *Ecol Applic.*, v. 18, p. 885-98. 2008.

MEIMBERG H, SCHRENK C, STEINBERG C, KLARENBERG A, KETTRUP A. Induction of ethoxy-, pentoxu- and benzoxyresorufin-O-dealkylase in limnetc gastrpods via Aroclor 1254. *Environ Sci* & Pollut Res., v. 4, p. 183-8, 1997.

MONTEIRO DA, RANTIN FT, KALININ AL. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 149, p. 40–9, 2009.

MORTENSEN AS, ARUKWE A. Effects of tributyltin (TBT) on in vitro hormonal and biotransformation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Toxicol Environ Health A*., v. 72, p. 209-18, 2009.

NAVAS JM, SEGNER H. Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. *Chem Biol Inter*., v. 138, p. 285-98, 2001.

PAL A, GIN KY, LIN AY, Reinhard M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci Total Environ.*, v. 408, p. 6062, 2010.

PAOLIELLO JMM. Aspectos ambientais e potencial energético no aproveitamento de resíduos da indústria sucroalcooleira. **Dissertação de mestrado em Engenharia Industrial**. UNESP – Bauru, 2006.

PARENTE TE, DE-OLIVEIRA AC, SILVA IB, ARAUJO FG, PAUMGARTTEN FJ. Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosph*, v. 54, p.1613–18, 2004.

PERRY MJ, VENNERS SA, BARR DB, XU X. Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposures and sperm concentration. *Reprod Toxicol*., v. 23, p. 113-8, 2007.

PINER P, SEVGILER Y, UNER N. *In vivo* effects of fenthion on oxidative processes by the modulation of glutathione metabolism in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol*. v. 22, p. 605-12, 2007.

PORTE C, ESCARTÍN E, GARCÍA DE LA PARRA LM, BIOSCA X, ALBAIGÉS J. Assessment of coastal pollution by combined determination of chemical and biochemical markers in *Mullus barbatus*. *Mar Ecol Prog Ser*., v. 235, p. 205–16, 2002.

QUINN GP, MJ. **Experimental Design and Data Analysis for Biologists**. Cambridge University Press. 527 p. 2002.

RODRIGUES ACF. Estudo de variações bioquímicas e morfológicas induzidas por praguicidas organofosforado e carbamato em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e cascudo (*Pterygoplichthys anisitsi*), como biomarcadores de contaminação ambiental. **Dissertação de mestrado em Biologia Animal**. UNESP – São José do Rio Preto, 2009.

Rodriguez-Ariza A, Toribio F, López-Barea J.. Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J Chromatogr*., v. 656, p. 311-18, 1994.

Ross MK, Borazjani A, Edwards CC, Potter PM. Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochem Pharmacol*., v. 71, p. 657-69, 2006.

Rudorff BFT, de Aguiar DA, da Silva WF, Sugawara LM, Adami M, Moreira MA. Studies on the Rapid Expansion of Sugarcane for Ethanol Production in São Paulo State (Brazil) Using Landsat Data. *Remote Sens*., v. 2, p. 1057-76, 2010.

SANT'ANNA MC, SOARES VDE M, SEIBT KJ, GHISLENI G, RICO EP, ROSEMBERG DB, DE OLIVEIRA JR, SCHRÖDER N, BONAN CD, BOGO MR. Iron exposure modifies acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) tissues: distinct susceptibility of tissues to iron overload. *Fish Physiol Biochem*., v. 37, p. 573-81, 2011.

SARIKAYA R. Investigation of Acute Toxicity of Alpha-Cypermethrin on Adult Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) *Turk J Fish Aquat Sci*., v., p. 85-9, 2009.

SODRÉ FF, MONTAGNER CC, LOCATELLI MAF, JARDIM WF. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). *J Braz Soc Ecotoxicol.*, v. 2, p. 187-96, 2007.

SOLÉ M, RALDUA D, PIFERRER F, BARCELÓ D, PORTE C. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*., v. 136, p. 145-56, 2003.

SON DS, ROBY KF, ROZMAN KK, TERRANOVA PF. Estradiol enhances and estriol inhibits the expression of CYP1A1 induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in a mouse ovarian cancer cell line. *Aquat Toxicol*., v. 59, p. 17-33, 2002.

SOTO AM, RUBIN BS, SONNENSCHEIN C. Interpreting endocrine disruption from an integrative biology perspective. *Mol Cell Endocrinol*., v. 304, p. 3-7, 2009.

SOUSA G, FONTAINE F, PRALAVORIO M, BOTTA-FRIDLUND D, LETREUT Y, RAHMANI R.Insecticide cytotoxicity and CYP1A1/2 induction in primary human and rat hepatocyte cultures. *Toxicol in vitro*. v. 11, p. 455-57, 1997.

SRIKANTH K, PEREIRA E, DUARTE AC, AHMAD I. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish--a review. *Environ Sci Pollut Res Int*., v. 20, p. 2133-49, 2013.

STANCZYK FZ, ARCHER DF. Gestodene: A review of its pharmacology, potency and tolerability in combined contraceptive preparations. *Contraception*. 2013 Dec 19. pii: S0010-7824(13)00746-4. doi: 10.1016/j.contraception.2013.12.003. [Epub ahead of print]

TELES M, PACHECO M, SANTOS MA. Biotransformation, stress and genotoxic effects of 17beta-estradiol in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Environ Int*., v. 32, p. 470-7, 2006.

TELES M, PACHECO M, SANTOS MA. *Sparus aurata* L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17beta-estradiol (E2) or E2 combined with 4-nonylphenol. *Sci Total Environ*., v. 336, p. 57-69, 2005.

TELES M, GRAVATO C, PACHECO M, SANTOS MA. Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to beta-naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17 beta-estradiol individual and combined exposures. *Chemosph*., v. 57, p. 147-58, 2004.

THOMPSON HM. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamate. *Ecotoxicol*., v. 8, p. 369-84, 1991.

TRÍDICO CP, RODRIGUES ACF, NOGUEIRA L, DA SILVA DC, MOREIRA AB, DE ALMEIDA EA. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and diazinon. *Ecotoxicol Environ Saf*. v .73, p. 858-63, 2010.

TRISCIANI A, CORSI I, TORRE CD, PERRA G, FOCARDI S. Hepatic biotransformation genes and enzymes and PAH metabolites in bile of common sole (*Solea solea*, Linnaeus, 1758) from an oil-contaminated site in the Mediterranean Sea: A field study. *Mar Pollut Bull*., v. 62, p. 806–14, 2011.

TUZMEN N, CANDAN N, KAYA E, DEMIRYAS N. Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. *Cell Biochem Funct*., v. 26, p. 119-24, 2008.

UKPEBOR J, LLABJANI V, MARTIN FL, HALSALL CJ. Sublethal genotoxicity and cell alterations by organophosphorus pesticides in MCF-7 cells: implications for environmentally relevant concentrations. *Environ Toxicol Chem*., v. 30, p. 632-9, 2011.

UNER N, ORUÇ EO, CANLI M, SEVGILER Y. Effects of Cypermethrin on Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Liver and Kidney of the Freshwater Fish, Oreochromis niloticus and *Cyprinus carpio* (L.). *Bull Environ Contam Toxicol*., v. 67, p. 657-64, 2001.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. Relatório 2010. Disponível em http://www.unica.com.br/

USMANI KA, CHO TM, ROSE RL, HODGSON E. Inhibition of the human liver microsomal and human cytochrome P450 1A2 and 3A4 metabolism of estradiol by deployment-related and other chemicals. *Drug Metab Dispos*., v. 34, n. 9, p. 1606-14, 2006.

VACCARO E, MEUCCI V, INTORRE L, SOLDANI G, DI BELLO D, LONGO V, GERVASI PG, PRETTI C. Effects of 17β-estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat Toxicol*.,v. 75, p. 293-305, 2005.

VAN DER OOST R, BEYER J, VERMEULEN NP. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environm Toxicol Pharmacol*., v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN LIPZIG MM, VERMEULEN NP, GUSINU R, LEGLER J, FRANK H, SEIDEL A, MEERMAN JH. Formation of estrogenic metabolites of benzo[a]pyrene and chrysene by cytochrome P450 activity and their combined and supra-maximal estrogenic activity. *Environ Toxicol Pharmacol.*, v. 19, p. 41-55, 2005.

VON-HOFF, DD, MCGILL JR., FORSETH BJ, DAVIDSON KK, BRADLEY,TPRVDD, WAHL GM. Elimination of extrachromosomally amplified Myc genesfrom human tumor cells reduces their tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci* U S A, v. 89, p. 8165-9, 1992.

VERMA N, PINK M, RETTENMEIER AW, SCHMITZ-SPANKE S. Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. *Proteomics*. v. 12, p. 1731-55, 2012.

VIOQUE-FERNÁNDEZ A, DE ALMEIDA EA, LÓPEZ-BAREA J. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comp Biochem and Physiol, Part C*., v. 145. p. 404-12, 2007.

VON-HOFF DD, MCGILL JR, FORSETH BJ, DAVIDSON KK, BRADLEY TPRVDD, WAHL GM. Elimination of extrachromosomally amplified Myc genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity. *Proc of the Nat Acad of Sci of the* USA, v. 89, p. 8165-9, 1992.

WANG C, LU GH, SONG WT, XU S, WANG PF. Integrated biomarker response index for the assessment of environmental stress of the Yangtze River (Nanjing section). *Fish Physiol Biochem*., v. 36, p. 1069-78, 2010.

WHEELOCK CE, EDER KJ, WERNER I, HUANG H, JONES PD, BRAMMELL BF, ELSKUS AA, HAMMOCK BD. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquat Toxicol*., v. 74, n. 2, p. 172-192, 2005.

WHEELOCK CE, PHILLIPS BM, ANDERSON BS, MILLER JL, MILLER MJ, HAMMOCK BD. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring identification evaluations (TIEs). *Rev Environ Contam Toxicol.* v. 195, p. 117-78, 2008.

WHO - World Health Organization. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, chemical environmental and experimental data, 32. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. 477 p. 1983.

WHYTE JJ, JUNG RE, SCHMITT CJ, TILLITT DE. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol*, v. 30, p. 347–570, 2000.

WINZER K, VAN NOORDEN CJ, KÖHLER A. Sex-specific biotransformation and detoxification after xenobiotic exposure of primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Toxicol*., v. 176, p. 229-43, 2002.

ZAR JH. **Biostatistical analysis**. 5 ed. Prentice Hall. 944 p. 2010.