



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

Mariana Rojas Fernandes

Avaliação de parâmetros bioquímicos em órgãos de *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbelas), expostos ao benzo[a]pireno

São José do Rio Preto
2018

Mariana Rojas Fernandes

Avaliação de parâmetros bioquímicos em órgãos de *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbelas), expostos ao benzo[a]pireno

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

Orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

São José do Rio Preto
2018

Fernandes, Mariana Rojas.

Avaliação de parâmetros bioquímicos em órgãos de *Phrynos geoffroanus* (cágado-de-barbelas), expostos ao benzo[a]pireno / Mariana Rojas Fernandes. -- São José do Rio Preto, 2018
35 f. : il.

Orientador: Luis Octávio Regasini

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

1. Química. 2. Biotransformação (Metabolismo). 3. Marcadores bioquímicos. 4. Marcadores químicos. 5. Toxicologia ambiental. 6. Tartaruga. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 598.13

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

Mariana Rojas Fernandes

Avaliação de parâmetros bioquímicos em órgãos de *Phrynos
geoffroanus* (cágado-de-barbelas), expostos ao benzo[a]pireno

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Bonini Domingos
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Mozart Marins
UNAERP – Ribeirão Preto

São José do Rio Preto
22 de março de 2018

Dedico este trabalho (In memorian) à minha amada mãe,
Margarida Abigail, por todo amor e incentivo às minhas escolhas.

Agradecimentos

Agradeço a minha mãe, Margarida, que em vida me trouxe grande aprendizado sobre amor e respeito, junto ao meu pai, Augusto, quem dedicou sua vida à educação minha e de minha irmã, com muito empenho e zelo. Também agradeço à minha irmã, Fernanda, quem sempre me foi fonte de admiração e inspiração. Todo meu amor e gratidão à vocês.

Agradeço também por todo companheirismo e carinho de meu gatinho, Pastel.

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida, por ter me acolhido em seu laboratório, quando parte do corpo docente do programa de pós-graduação em química e por toda ajuda prestada e paciência, ainda que à distância.

Agradeço ao meu atual orientador, Prof. Dr. Luis Octávio Regasini, que no momento de maior desnorteio de meu mestrado, me acolheu com muita boa vontade e sempre esteve solícito a me ajudar em tudo que pode.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Bonini Domingos e ao Prof. Dr. Gustavo O. Bonila Rodriguez por terem participado de minha banca de qualificação e terem acrescentado correções valiosas ao meu trabalho. Bem como os agradeço por novamente terem se disponibilizado a participar deste exame de defesa, assim como o Prof. Dr. Mozart Marins, estando todos sempre à disposição e sendo muito compreensivos.

Agradeço imensamente a todos os companheiros do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquáticas (LABCA), por toda paciência e boa vontade em me ajudar com todas as dificuldades que tive. Em especial, agradeço à Isabela Batalhão e ao Danilo Grünig, os quais sem a paciente ajuda para finalizar minhas análises, teria sido impossível concluí-las, assim como à Milena Devecchi e Juliane Freitas, quem sempre estiveram solícitas à todas as dúvidas que tive, com muita boa vontade. São pessoas muito especiais que sempre serão lembradas com muito carinho, com quem muito aprendi.

Por fim, agradeço aos meus amigos, que sempre me apoiaram e torceram por mim em todas as dificuldades e conquistas, alguns desde a graduação, Alice, Felipe, Adriana, Samara, Éder, outros que são ou foram companheiros de casa,

Aimée, Daniele e Valéria, ou que Rio Preto me presenteou, Danilo, Guilherme, João Paulo, Isabella, Mariana, assim como tantos outros que passaram ou ainda estão em minha vida, todos são fontes de grande amor e aprendizado a mim.

RESUMO

O ambiente aquático, por ação antrópica, é o compartimento que mais recebe disposição final de poluentes. Dessa forma os organismos que os habitam, permanecem em constante exposição à ação destes contaminantes que muitas vezes possuem potencial mutagênico e carcinogênico, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). A espécie *Phrynops geoffroanus* ("Cágado-de-Barbelas"), é comumente encontrada em áreas com grande atividade antrópica, como rios poluídos que recebem efluentes domésticos e industriais. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas de parâmetros bioquímicos, a partir de tecidos armazenados provindos de estudo anterior no qual a espécie, *Phrynops geoffroanus*, foi utilizada como biomarcador de contaminação ambiental por exposição ao benzo[a]pireno, composto mais amplamente estudado dentre os HPAs, nas concentrações de 100 µg/kg corporal, 500 µg/kg corporal, 1000 µg/kg corporal e grupo controle, após sete dias. Foram avaliadas as atividades de EROD, BROD, PROD e GST em amostras de tecidos de baço, encéfalo, rins e testículos. Foi constatada atividade significativa para análises de GST ($p=0,0010$) em amostras de rins, e de EROD ($p=0,0020$) e PROD ($p=0,0214$) em amostras de testículos. Uma vez que os rins contribuem para biotransformação de xenobióticos e os testículos apresentam grande ativação metabólica, os dados demonstraram a sensibilidade e responsividade diferencial de diferentes órgãos do organismo frente ao contaminante, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos de metabolização do BaP na espécie.

Palavras-chave: Benzo[a]pireno. *Phrynops geoffroanus*. Biotransformação. Biomarcadores. Toxicologia ambiental.

ABSTRACT

*The aquatic environment, by anthropic action, is the compartment that receives the final disposal of pollutants. In this way the organisms that inhabit them, remain in constant exposure to the action of these contaminants that often have mutagenic and carcinogenic potential, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Phrynos geoffroanus* is commonly found in areas with high anthropogenic activity, such as polluted rivers that receive domestic and industrial effluents. The objective of this study was to evaluate the response of biochemical parameters from stored tissue from a previous study in which the specimen, *Phrynos geoffroanus*, was used as biomarker of environmental contamination by exposure to benzo [a] pyrene, a compound most widely studied among PAHs at concentrations of 100 µg / kg body weight, 500 µg / kg body weight, 1000 µg / kg body weight and control group after seven days. The activities of EROD, BROD, PROD and GST were evaluated in samples of spleen, brain, kidney and testis tissues. Significant activity was observed for GST analyzes ($p = 0.0010$) in kidney samples, and for EROD ($p = 0.0020$) and PROD ($p = 0.0214$) in testis samples. Since the kidneys contribute to the biotransformation of xenobiotics and the testicles show great metabolic activation, the data demonstrated the sensitivity and differential responsiveness of different organs of the organism to the contaminant, contributing to a better understanding of the metabolism mechanisms of BaP in the species.*

*Keywords: Benzo[a]pyrene. *Phrynos geoffroanus*. Biotransformation. Biomarkers. Environmental toxicology.*

LISTA DE FIGURAS

1. Representação estrutural do benzo[a]pireno (BaP).....13
2. *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbelas).....15
3. Mapa da localização geográfica da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande, representado pela seta verde, onde ocorreu a coleta dos animais.....17
4. Medida do tamanho do animal, com base no comprimento curvilíneo da carapaça (CCCmáx).....18
5. Média \pm desvio padrão da atividade de EROD (A), BROD (B), PROD (C) e GST (D) em baço de *Phrynops geoffroanus*, expostos à 100mg/Kg, 500mg/Kg e 1000mg/Kg de Benzo[a]pireno. Não ocorreu diferença estatística para nenhuma das análises realizadas nesse tecido.....22
6. Média \pm desvio padrão da atividade de EROD (A), BROD (B), PROD (C) e GST (D) em encéfalo de *Phrynops geoffroanus*, expostos à 100mg/Kg, 500mg/Kg e 1000mg/Kg de Benzo[a]pireno. Não ocorreu diferença estatística para nenhuma das análises realizadas nesse tecido.....23
7. Média \pm desvio padrão da atividade de EROD (A), BROD (B), PROD (C) e GST (D) em rins de *Phrynops geoffroanus*, expostos à 100mg/Kg, 500mg/Kg e 1000mg/Kg de Benzo[a]pireno. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.....24
8. Média \pm desvio padrão da atividade de EROD (A), BROD (B), PROD (C) e GST (D) em testículos de *Phrynops geoffroanus*, expostos à 100mg/Kg, 500mg/Kg e 1000mg/Kg de Benzo[a]pireno. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.....25

LISTA DE TABELA

1. Dados biométricos, em média \pm desvio-padrão, dos cágados machos adultos da espécie *Phrynops geoffroanus* utilizados no experimento.....18

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BaP	Benzo[a]pireno
BROD	Isoforma 7-benzilóxiresorufina-O-desalquilase
BSA	Albumina do soro bovino
CCCmáx	Comprimento curvilíneo máximo da carapaça
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CYP1A	Subfamília 1A do citocromo P450
CYP1B	Subfamília 1B do citocromo P450
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROD	Isoforma 7-etóxiresorufina-O-desalquilase
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	International Union for Conservation of Nature
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
PMSF	Fenilmetano sulfonil fluorídrico
PROD	Isoforma 7-pentóxiresorufina-O-desalquilase
SBAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Origem das amostras.....	17
3.2. Exposição ao benzo[a]pireno.....	19
3.3. Coleta das amostras.....	19
3.4. Análises bioquímicas.....	19
3.5. Análises de EROD, BROD e PROD.....	20
3.6. Análise de GST.....	20
3.7. Determinação da concentração de proteínas.....	20
3.8. Análise Estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Avaliação de atividades em enzimas de amostras de baço.....	22
4.2. Avaliação de atividades em enzimas de amostras de encéfalo..	23
4.3. Avaliação de atividades em enzimas de amostras de rins.....	24
4.4. Avaliação de atividades em enzimas de amostras de testículos.	25
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1. Introdução

A ação antropogênica desenfreada vem causando danos aos ecossistemas, de maneira que, a urbanização acelerada e crescente aumenta, conseqüentemente, a produção e liberação de poluentes no ambiente (RODRIGUES, 2014). Estes podem ser carregados até o destino final por diversas formas, como por meio de chuvas, acidentes por derramamento, despejo direto de efluentes, escoamento superficial no solo e também, podem ser conduzidos pelo ar alcançando e se depositando em corpos aquáticos, que constituem, portanto, o principal destino final dos poluentes (ARIAS et al., 2007; RASHED, 2001).

Uma vez presente no ambiente aquático, os poluentes podem exercer efeitos negativos à biota e aos ecossistemas, ocasionando destruição de habitats naturais, alterações no crescimento, reprodução e sobrevivência de espécies, muitas vezes resultando em depleção ou até mesmo desaparecimento de muitas populações (CAJARAVILLE et al., 2000; TORREIRO-MELO et al., 2015). Dessa forma a biodiversidade fica comprometida, levando a impactos substanciais muitas vezes irreversíveis aos ecossistemas (BICKMAM, 2000).

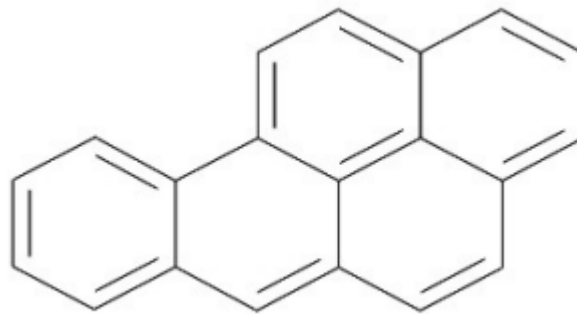
Dentre os poluentes, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), destacam-se em estudos ambientais devido a sua ampla distribuição no ambiente, seu potencial mutagênico e carcinogênico e por apresentarem alta persistência no ambiente (FERRIZI, 2011; IARC, 1995; TRAPIDO, 1999; WHO, 1983; WANG et al., 2014). São classificados como HPA os compostos químicos constituídos apenas por átomos de carbono e hidrogênio, que possuem dois ou mais anéis benzênicos e podem apresentar geometria linear, angular ou agrupada (NETTO et al., 2002).

Embora os HPAs possuam pouca solubilidade em água, em ambiente aquático podem se adsorver em partículas suspensas e posteriormente, se depositarem em sedimentos e matéria orgânica ao serem utilizados como alimento, pelos indivíduos deste habitat, dessa forma podendo ocorrer sua bioacumulação no organismo (PERFETTI et al., 1992; GODOI et al., 2004).

Em áreas nas quais os corpos aquáticos localizam-se próximos a áreas de intensa urbanização, os HPAs são encontrados em maiores concentrações (BANNI et al., 2009). Dentre eles, destaca-se o benzo[a]pireno (BaP) (Figura 1), hidrocarboneto de alto peso molecular (252 g mol^{-1}) e cinco anéis aromáticos

(GUIMARÃES, 2004). A contaminação do ambiente pelo BaP se dá por fontes naturais, como as queimadas (combustões espontâneas, emissões vulcânicas) e síntese por micro-organismos, ou por fontes antrópicas, especialmente devido a queima de combustíveis fósseis e acidentes com derramamento de petróleo (ALMEIDA et al., 2007).

Figura 1. Representação estrutural do benzo[a]pireno (BaP).



Fonte: Meire et al., 2007

Contaminantes ambientais, tal como o BaP, podem ser identificados por meio de análises bioquímicas, podem ser úteis como indicativos da exposição dos animais, (CAPPELINI et al., 2012; MANDAL; SINGH, 2013). Por meio de biomarcadores pode-se avaliar a qualidade ambiental em decorrência da poluição, de maneira que possibilita identificar os efeitos provocados na biota pela exposição a contaminantes. (ROMÉO e GIAMBÉRINI, 2012; WANG et al., 2014).

Dentre os biomarcadores mais usados para se avaliar o efeito de substâncias tóxicas orgânicas em organismos aquáticos, estão as enzimas de biotransformação, de maneira que, a primeira resposta do organismo após a intoxicação geralmente é uma tentativa das células de metabolizar os compostos tóxicos (VAN DER OOST., et al 2003). As reações de metabolização de xenobióticos geralmente envolvem duas fases, na fase I o composto é modificado pela inserção de um ou mais átomos de oxigênio na molécula e na fase II a molécula modificada é conjugada com o tripeptídeo glutatona (GSH), sulfato ou ácido glucurônico. As reações de fase I são catalisadas principalmente por uma família multienzimática do retículo endoplasmático liso, os citocromos P450, enquanto que as reações de fase II são

catalisadas por enzimas de conjugação, tais como glutathione S-transferase (GST), sulfato-transferase e glucuronosil-transferase (HERMES-LIMA, 2004; ALMEIDA et al., 2005).

Desta forma, a avaliação da atividade de enzimas de fase I e II em organismos expostos a poluentes orgânicos pode fornecer dados relevantes sobre o processo de metabolização de compostos tóxicos nos organismos, ou seja, aumentos expressivos na atividade dessas enzimas podem indicar que o organismo está potencialmente intoxicado. Sabe-se que HPAs, como o BaP, causam aumentos significativos na atividade das isoformas CYP1A e CYP1B do citocromo P450, bem como da GST em animais aquáticos, especialmente em peixes, que representam o grupo de vertebrados mais estudado em toxicologia aquática (JONSSON et al., 2009; PISONI et al., 2004). Por outro lado, os efeitos desse composto em répteis, como os quelônios, é menos conhecido.

Como biomarcador de fase I a enzima 7-etóxiresorufina-O-desalquilase (EROD), tem sua atividade analisada a fim de mensurar a indução do citocromo P450, isoforma 1A, em organismos expostos a contaminantes como BaP. Também existem outras isoformas de P450, utilizadas para este fim, como a 7-pentóxiresorufina-O-desalquilase (PROD) e a 7-benzilóxiresorufina-O-desalquilase (BROD) (RODRIGUES, 2014). Durante a fase I, os metabólitos gerados, precisam ser ligados a moléculas endógenas, por meio de reações de conjugação que ocorrem na fase II, para que a hidrossolubidade do xenobiótico aumente e por consequência, facilite sua excreção. Neste processo, a enzima glutathione S-transferase (GST) atua de maneira crucial (KLAASSEN et al., 2011).

Quelônios de água doce podem ser ótimos organismos sentinela para o estudo dos efeitos negativos de poluentes aquáticos, devido sua vasta distribuição geográfica, por ocuparem grande variedade de habitats e por apresentarem vida longa, fato que lhes proporciona maior sensibilidade às ações antrópicas em longo prazo (MEYERS-SCHÖNE; WALTON, 1994).

Dentre os quelônios, a espécie denominada *Phrynops geoffroanus* (Figura 2), descrita pioneiramente por Schweigger em 1812, popularmente conhecida como cágado-de-barbelas, são considerados interessantes organismos a serem estudados quanto seus mecanismos de biotransformação de xenobióticos, por se tratarem de uma espécie que apresentam extensa distribuição geográfica, sendo encontrada na

América do Sul, habitando pequenos rios, lagos e canais poluídos do perímetro urbano, apresentarem vida longa, fato que lhes proporciona maior tempo de exposição à contaminantes ambientais (VOGT, 2008; VENÂNCIO, 2012).

Segundo VENÂNCIO et al (2013), espécie destaca-se por sobreviver em águas poluídas, sendo comumente encontradas ao longo da bacia hidrográfica do Turvo/Grande, que abrange a região Noroeste do estado de São Paulo, localizado na cidade de São José do Rio Preto, sendo considerada a mais poluída do estado (COMITÊ DA BACIA HIDROGRÁFICA TURVO/GRANDE, 2014). O fato desses animais habitarem locais nessas condições, incomum à outros organismos, justifica-se devido à grande disponibilidade de matéria orgânica, gerado por dejetos de esgoto urbano e biomassa em geral, uma vez que são utilizados como alimento (BRITES, 2002).

Figura 2. *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbelas).



Fonte: ICMBio, 2017.

Em função desta espécie ser geralmente encontrada em locais de despejo frequente de contaminantes de várias procedências, justifica-se a importância em se avaliar as respostas provocadas por contaminantes nesses organismos.

Poucas são as fontes encontradas na literatura a respeito desta espécie de quelônios em estudos de toxicologia ambiental, o presente trabalho propõe avaliar a resposta de enzimas de biotransformação causada pela exposição por concentrações definidas do HPA benzo[*a*]pireno.

2. Objetivo

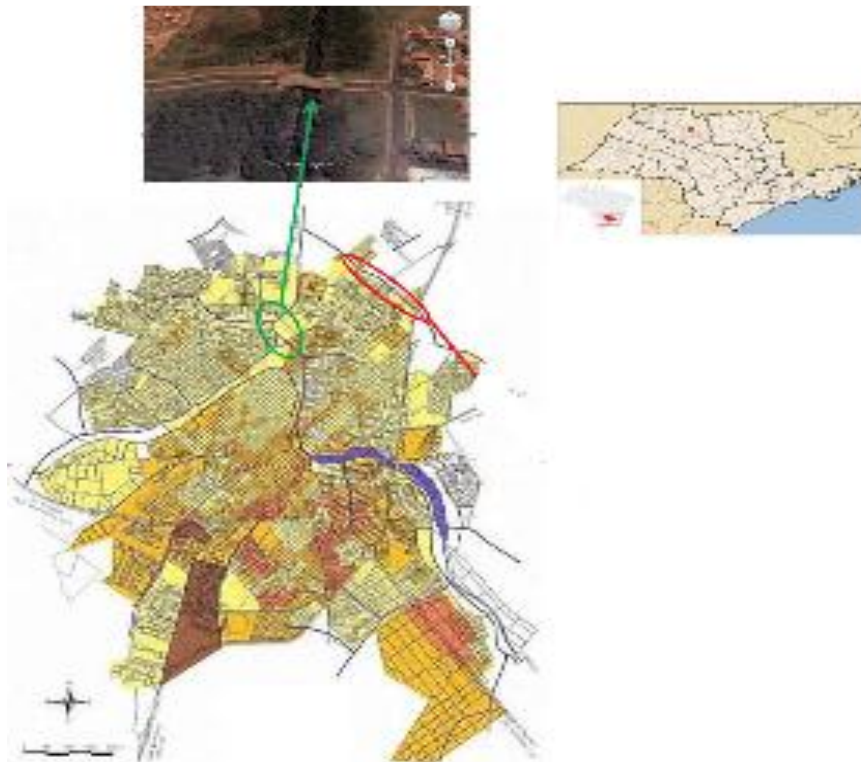
O presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades de enzimas relacionadas à detoxificação, EROD, BROD, PROD e GST, em resposta ao benzo[a]pireno, em baço, encéfalo, rins e testículos de *Phrynos geoffroanus*, nas concentrações de 100 µg/kg corporal, 500 µg/kg corporal, 1000 µg/kg corporal e grupo controle.

3. Materiais e Métodos

3.1 Origem das Amostras

Neste estudo, foram analisadas amostras de órgãos de *Phrynops geoffroanus* expostos ao benzo[a]pireno, a partir de material já coletado e estocado em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, provindos de experimento realizado anteriormente, no qual vinte machos adultos de *Phrynops geoffroanus*, foram capturados num mesmo período no afluente do Rio Preto (Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande - SP, $20^{\circ} 47' 49.9''\text{S}$; $49^{\circ} 23' 58.98''\text{O}$), em São José do Rio Preto-SP.

Figura 3. Mapa da localização geográfica da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande, representado pela seta verde, onde ocorreu a coleta dos animais (SILVA, 2015).



Fonte: SILVA, 2015

Apenas machos foram selecionados para o presente estudo, devido ao fato de, durante a captura estarem mais evidentes que as fêmeas, devido ao comportamento migratório da espécie para o gênero. Além de diminuir a possível influência hormonal nas atividades enzimáticas. Foi determinada a massa corporal e o tamanho de todos os animais coletados pelo comprimento curvilíneo máximo da

carapaça (CCCmáx), do ponto escudo nugal até o supracaudal (Figura 4). Uma vez que o CCCmáx é superior a 21cm para os adultos de *Phrynops geoffroanus*, esta medida foi então considerada para garantir a seleção de apenas indivíduos adultos (Tabela 1).

Figura 4. Medida do tamanho do animal, com base no comprimento curvilíneo da carapaça (CCCmáx) (SILVA, 2015).



Fonte: Silva, 2015

Tabela 1. Dados biométricos, em média \pm desvio-padrão, dos cágados machos adultos da espécie *Phrynops geoffroanus* utilizados no experimento.

Grupo	Peso (Kg)	Tamanho (cm)
Controle	2,070 \pm 0,34	31,66 \pm 1,65
Grupo 1	2,042 \pm 0,43	30,18 \pm 2,60
Grupo 2	2,042 \pm 0,19	31,18 \pm 1,33
Grupo 3	2,056 \pm 0,52	30,48 \pm 2,38

Após transportados para o Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, os animais foram aclimatados pelo período de 45 dias em tanques de plástico, preenchidos com água de poço artesiano, isenta de tratamento com cloro, com a temperatura controlada a 30 °C. Foram alimentados com ração para peixe, carne bovina e de peixe. A cada dois dias as águas eram trocadas e os tanques higienizados (SILVA, 2015).

3.2 Exposição ao Benzo[a]pireno

Após 45 dias de aclimação, os vinte animais foram então separados em quatro grupos, compostos por cinco indivíduos, dando origem a quatro grupos experimentais. O BaP foi diluído em óleo vegetal de soja e administrado aos animais por meio de sonda orogástrica, de forma a se obter um grupo controle (C, tratado somente com o óleo vegetal), e nos outros três grupos as concentrações administradas foram de 100, 500 e 1000 µg/kg corporal, correspondendo respectivamente aos grupos 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3). Sete dias após a exposição ao contaminante, os animais foram eutanasiados por decapitação após serem submetidos à super dose de anestésico Thiopental®, por via intravenosa, seguido de indução à hipotermia, decapitação e retirada do palastrão com serra circular, conforme estipulado pelas normas vigentes pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBAL/COBREA) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (SILVA, 2015).

3.3 Coleta de amostras de órgãos

Os tecidos, baço, encéfalo, rins e testículos foram coletados após óbito e armazenados em freezer a -80 °C, até o momento de preparo das amostras para então se proceder às análises bioquímicas (SILVA, 2015).

3.4 Análises bioquímicas

Com o objetivo de preparar as amostras para posteriores análises, os tecidos foram homogeneizados (1:4 m/v) em tampão Tris-HCl (0,2 mM, pH 7,5), contendo inibidor de protease (PMSF), centrifugadas a 9.000 x g por 20 minutos com temperatura de 3 °C, obtendo o sobrenadante. A fração sobrenadante foi então coletada e centrifugada novamente a 50.000 x g por uma hora, de forma a obter as frações citosólica e *pellet*. Para as análises de atividades de EROD, BROD e PROD, os pellets foram ressuspensos e homogeneizados com 100 µL de tampão Tris 100 mM, pH 7,5, contendo EDTA 1 mM ditiotreitól 1 mM, KCl 100 mM e 20% de glicerol.

Já a fração sobrenadante resultante, foi coletada para posterior análise de atividade enzimática de GST.

3.5 Análise de EROD, BROD e PROD

As atividades enzimáticas de EROD, BROD e PROD foram medidas, em réplica, a partir da fração microsomal (*pellet*), em leitor de microplacas por método fluorimétrico. O método consiste na formação de resorufina, que é fluorescente (excitação = 537 nm, emissão = 583 nm), catalisada pelas enzimas.

Foram adicionados aos poços tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,4, além de solução de 7-etoxiresorufina 332 μM (EROD), 7-benzilóxi-resorufina-O-desacetilase 330 μM (BROD) e 7-pentóxi-resorufina-O-desacetilase 350 μM (PROD), NADPH 10 mM e extrato microsomal. Os resultados estão expressos em $\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.6 Análise de GST

A atividade de GST foi avaliada pelo método de KEEN, HABIG E JAKOBY (1976), adaptado para leitor de microplacas. A amostra foi adicionada a um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5, 100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 100 mM de GSH 100 mM. O aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm. Os resultados foram expressos em glutathione S-transferase.mg proteína⁻¹.

3.7 Determinação da concentração de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976) em leitor de microplacas. Foi realizada uma curva de calibração, contendo concentrações determinadas de BSA, soroalbumina bovina, proteína padrão utilizado em quantificações de proteínas.

3.8 Análise Estatística

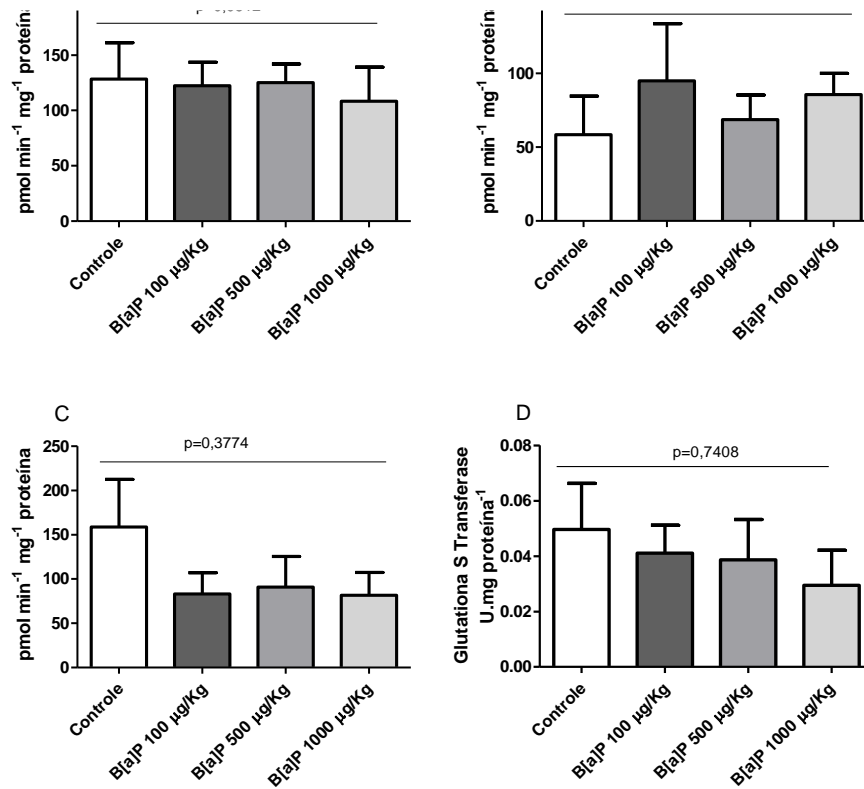
Os programas utilizados para realizar as análises estatísticas foram o Statistica 7.0 e BioEstat 5. Inicialmente foi verificada a distribuição normal (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Levene) dos dados. No caso de dados paramétricos, os parâmetros entre os diferentes tratamentos e concentrações foram comparados por análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Fisher LSD. Quanto aos dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas entre os grupos foram aceitas com $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Avaliação de atividades enzimáticas em amostras de baço

As análises de atividades de EROD, BROD, PROD e GST em amostras de baço demonstraram resultados sem diferença estatística significativa entre os grupos. Os valores de p obtidos foram de 0,9512 para EROD, 0,7650 para BROD, 0,3774 para PROD e 0,7408 para GST, conforme demonstra a Figura 5.

Figura 5. Média \pm desvio padrão da atividade de EROD (A), BROD (B), PROD (C) e GST (D) em baço de *Phrynos geoffroanus*, expostos a 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de Benzo[a]pireno. Não ocorreu diferença significativa para nenhuma das análises realizadas nesse tecido

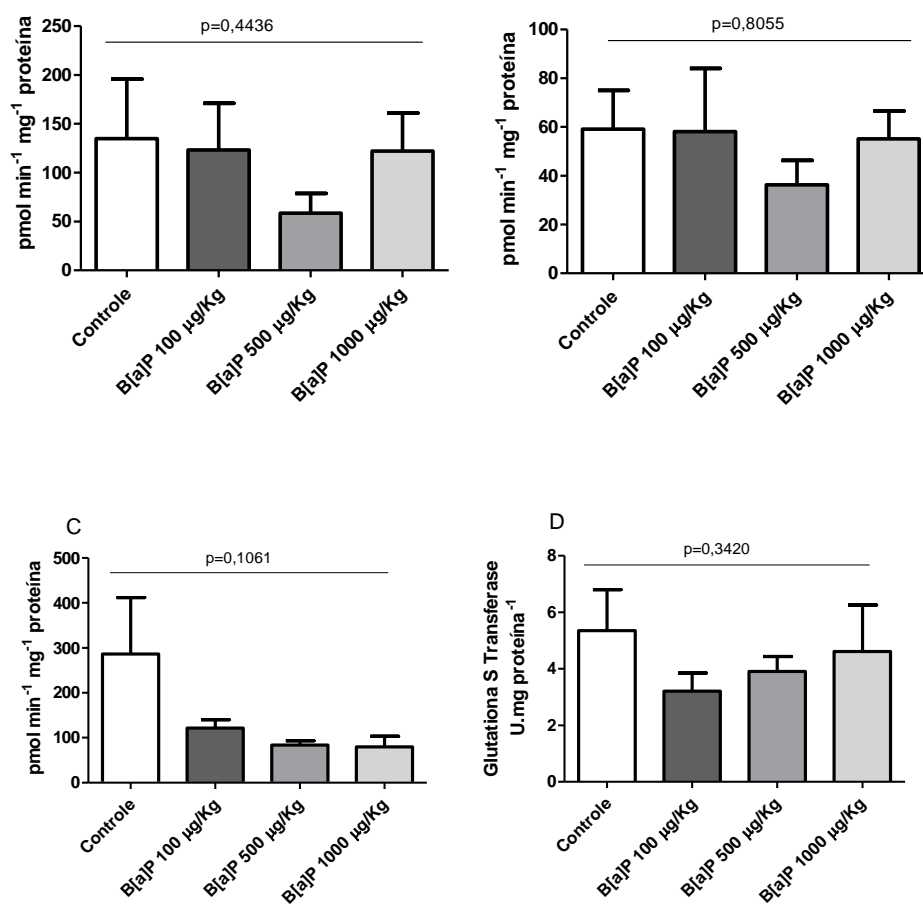


Fonte: Própria autoria

4.2 Avaliação de atividades enzimáticas em amostras de encéfalo

As análises de atividades de EROD, BROD, PROD e GST em amostras de encéfalo demonstraram resultados sem diferença estatística significativa entre os grupos. Os valores de p obtidos foram de 0,4436 para EROD, 0,8055 para BROD, 0,1061 para PROD e 0,3420 para GST, conforme demonstra a figura 6.

Figura 6. Média \pm desvio padrão da atividade de EROD (A), BROD (B), PROD (C) e GST (D) em encéfalo de *Phrynos geoffroanus*, expostos à 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de Benzo[a]pireno. Não ocorreu diferença significativa para nenhuma das análises realizadas nesse tecido.

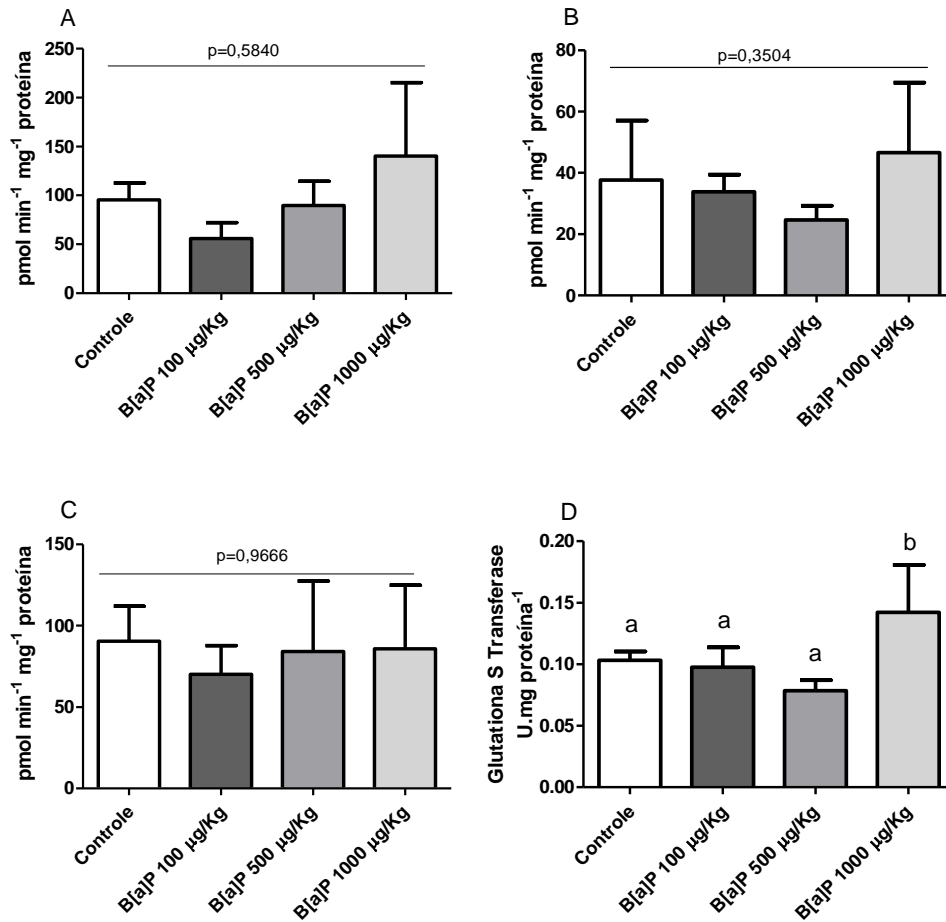


Fonte: Autoria própria.

4.3 Avaliação de atividades enzimáticas em amostras de rins

As análises de atividades de EROD, BROD e PROD em amostras de rins demonstraram resultados sem diferença estatística significativa entre os grupos. Os valores de p obtidos foram de 0,5840 para EROD, 0,3504 para BROD 0,9666 para PROD. Já a atividade de GST foi significativamente maior no grupo exposto à maior dose do BaP, em comparação com os demais grupos ($p=0,001$), conforme demonstra a Figura 7.

Figura 7. Média \pm desvio padrão da atividade de EROD (A), BROD (B), PROD (C) e GST (D) em rins de *Phrynos geoffroanus*, expostos à 100 $\mu\text{g/Kg}$, 500 $\mu\text{g/Kg}$ e 1000 $\mu\text{g/Kg}$ de Benzo[a]pireno. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

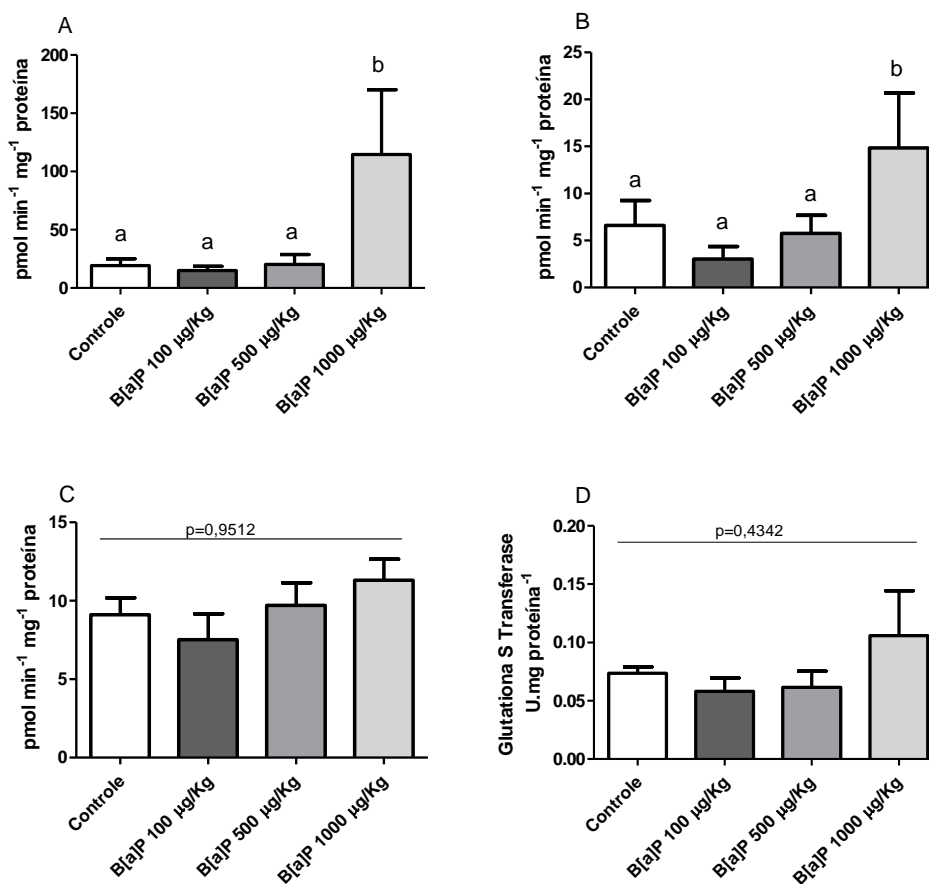


Fonte: Autoria própria.

4.4 Avaliação de atividades enzimáticas em amostras de testículos

As análises de atividades de PROD e GST em amostras de testículos demonstraram resultados sem diferença estatística significativa entre os grupos. Os valores de p obtidos foram de 0,9512 para PROD e 0,4342 para GST. Já as atividades de EROD e BROD foram significativamente maiores no grupo exposto à maior dose do BaP em comparação com os demais grupos ($p=0,0020$ e $0,0214$, respectivamente), conforme demonstra a Figura 8.

Figura 8. Média \pm desvio padrão da atividade de EROD (A), BROD (B), PROD (C) e GST (D) em testículos de *Phrynos geoffroanus*, expostos à 100 $\mu\text{g/Kg}$, 500 $\mu\text{g/Kg}$ e 1000 $\mu\text{g/Kg}$ de Benzo[a]pireno. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.



Fonte: Autoria própria.

5. Discussão

O presente trabalho visou avaliar as respostas de enzimas de biotransformação em baço, encéfalo, rins e testículos de *Phrynos geoffroanus* expostos a 100, 500 e 1000 µg/kg. O trabalho trata-se de complementação de dados previamente obtidos por nosso grupo nos mesmos animais, onde foram analisadas as mesmas enzimas, porém em fígado, coração, pulmão, pâncreas, intestino delgado e intestino grosso, (SILVA, 2015).

Os resultados obtidos indicaram que o tratamento com BaP não causou alteração nas atividades da EROD, BROD e PROD de nenhum dos órgãos aqui analisados, exceto nos testículos, que apresentou aumento da EROD e da PROD. Estes dados indicam que o BaP, nas concentrações testadas, não foram capazes de induzir a atividade dessas enzimas no baço, rins e encéfalo dos animais, o que pode indicar que o BaP, após absorvido no intestino e metabolizado pelo fígado, não seja capaz de alcançar esses órgãos ou, as concentrações nas quais chegam até estes órgãos são insuficientes para causar a indução das enzimas.

Dados anteriores haviam indicado que as enzimas EROD e BROD foram igualmente inalteradas em coração, pulmão e intestino grosso de *Phrynos geoffroanus*, e que a PROD havia sido inalterada no fígado, pulmão, intestino grosso e intestino delgado (SILVA, 2015).

É importante salientar que a EROD é indicativa da isoforma 1A do citocromo P450 na maioria dos vertebrados, sendo essa isoforma uma das mais responsivas a HPAs. Ainda que não tenha sido observada alteração na atividade dessa enzima nos tecidos citados, a atividade da EROD foi relatada significativamente mais alta em fígado, pâncreas e intestino delgado dos animais (SILVA, 2015). Em estudos com carpas e tilápias, os órgãos extra-hepáticos, baço e rins, demonstraram indução da atividade de EROD por exposição à HPA, porém numa razão de 20 e 8 vezes menor, respectivamente, em comparação a atividade encontrada no fígado destes animais (D. MARIONNET et al., 1997). Também foi relatado atividades de EROD induzida em cérebro de truta-arco-íris (ORTIZ-DELGADO et al., 2002).

As atividades da PROD e da BROD tem sido atribuídas às famílias 2 e 3 do citocromo P450 em mamíferos, porém não há ainda consenso sobre quais isoformas do P450 respondem pelas atividades da PROD e BROD em outros vertebrados, tais

como peixes e répteis. Mas sabe-se que essas enzimas são menos responsivas, do que a EROD em vertebrados, a HPAs (BURKE et al., 1985). No presente trabalho as atividades dessas duas enzimas também não apresentaram diferenças estatísticas, o que pode estar relacionado à sua baixa especificidade no metabolismo de HPAs. Entretanto, dados anteriores mostraram que a PROD aumentou no coração e no pâncreas, e que a BROD aumentou no fígado, pâncreas e intestino delgado dos animais expostos ao BaP, indicando que o BaP pode modular a atividade dessas enzimas nos animais, ainda que em tecidos específicos. No caso da BROD, os aumentos observados ocorreram nos mesmos órgãos nos quais a EROD aumentou, podendo estar relacionado ao metabolismo do BaP já no intestino e fígado, especialmente. Já para a atividade da PROD, o aumento no pâncreas e no coração pode demonstrar uma maior sensibilidade dessa enzima nesses órgãos à exposição do BaP (SILVA, 2015).

Como dito anteriormente nas amostras de testículos houve indução das atividades de EROD e BROD, ambos para o grupo exposto à maior concentração de BaP. Em mamíferos é conhecido que a atividade da EROD (CYP1A) é bastante expressiva, sendo considerado um órgão no qual promove muita ativação metabólica (HALL et al., 1989). Assim, o aumento da EROD visto no testículo indica sua grande sensibilidade ao BaP, possivelmente como forma de proteger o órgão, responsável pela produção de gametas, contra efeitos deletérios dos poluentes. Da mesma forma, o aumento da PROD pode estar relacionado à ativação da metabolização do BaP. Ainda que não se saiba quais isoformas respondem pela atividade da BROD em vertebrados não mamíferos, é sabido que em ratos e humanos a BROD está atribuída à família 3A dos citocromos P450, uma das famílias que mais estão envolvidas na metabolização de fármacos no organismo (HARTL et al., 2007; ARUKWE et al., 2008; HAGEMeyer et al., 2010.)

No presente estudo, a atividade da GST em baço, encéfalo e testículos de *Phrynos geoffroanus* ficou inalterada após exposição ao BaP. Por outro lado, nas amostras de rins a atividade de GST mostrou-se aumentada no grupo exposto à maior concentração de BaP. Os rins apresentam contribuição no processo de biotransformação para eliminação de xenobióticos por excreção, realizando a conjugação de metabólitos do BaP com a GSH, fato que justifica sua atividade aumentada neste órgão (OLIVEIRA, 2009). Da mesma forma, a atividade da GST foi

elevada em coração, pulmões, pâncreas, intestino delgado e intestino grosso dos animais, conforme observado por SILVA (2015). Esses dados indicam o importante papel da GST no processo de metabolização do BaP no organismo.

Em virtude da escassez de estudos que estabeleçam parâmetros a respeito de respostas enzimáticas a HPAs em répteis de uma forma geral, fica evidente a relevância dos resultados obtidos no presente projeto, de forma a caracterizar as respostas de biomarcadores de biotransformação neste grupo. Em conjunto com dados anteriores, pôde-se ampliar o conhecimento sobre as respostas distintas de diferentes órgãos à exposição ao BaP. Tais dados podem ser úteis na caracterização da suscetibilidade desses animais a HPAs, especialmente o BaP, e também levantar teorias a cerca dos mecanismos de adaptação e resistência destes animais à exposição de poluentes.

6. Conclusões

Neste estudo, foi revelado indução significativa de atividades enzimáticas de EROD e BROD em amostras de testículos, bem como de GST nas amostras de rins de *Phrynos geoffroanus*, em resposta à exposição ao HPA benzo[a]pireno. Os dados demonstram a sensibilidade e responsividade distinta de diferentes órgãos do organismo frente ao contaminante, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos de metabolização do BaP na espécie.

7. Referências Bibliográficas

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

ALMEIDA, E. A. et al. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 146, p. 588-600, 2007.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p 61-72, 2007.

ARUKWE, A. et al. 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.

BICKHAM, J. W. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v.463, p.33-51, 2000.

BRITES, V. L. C. **Hematologia, bioquímica do sangue, parasitologia, microbiologia, algas epizoárias e histopatologia de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudinata, Chelidae), expostos a diferentes influências antrópicas no rio Uberabinha, Minas Gerais.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, 2002.

BURKE, M. D. et al. Ethoxy-, pentoxy- and benzylloxyphenones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450. **Biochemistry Pharmacology**, v. 34, p. 33-7, 1985.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci Total Environ**, n 247, p. 295-311, 2000.

CAPPELINI, L. T. D. et al. **Environmental Technology**, v. 33, n. 20, p. 2299-2304, 2012.

COMITÊ DA BACIA HIDROGRÁFICA TURVO/GRANDE, UNIDADE DE GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS 15 (CBH-TG- UGRHI15). Relatório de situação dos recursos hídricos 2014, UGRHI – Turvo/Grande. Disponível em:<<http://www.comitetg.sp.gov.br/cbhtg/downloads/relatorios-de-situacao/category/31-ano-2014>>, download de Relatório de Situação dos Recursos Hídricos 2014 da UGRHI 15 - Ano base 2013. Acesso em janeiro de 2018.

D-MARIONNET, L. et al. 3-Methylcholanthrene-induced EROD activity and cytochrome P450 in immune organs of carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, 1997.

FERRIZZI, V. C. **Caracterização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em rios da bacia hidrográfica do Turvo/Grande**. 2011. 113 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/97764>>.

GODOI, A. F. et al. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. **J Chromatography**, p.49-53, 2004.

GUIMARÃES, J. R. P. F. Toxicologia das emissões veiculares de diesel: um problema de saúde ocupacional e pública. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 6, p. 82-94, 2004.

HAGEMeyer, C. E. et al. 7-Benzyloxyresorufin-Odealkylase activity as a marker for measuring cytochrome P450 CYP3A induction in mouse liver. **Anal Biochemistry**, v. 398, p. 104-11, 2010.

HALL, M. et al. Relative contribution of various forms of cytochrome P450 to the metabolism of benzo[a]pyrene by human liver microsomes. **Carcinogenesis**, c.10, p.1815-1821, 1989.

HARTL, M. G. et al. Hepatic biomarkers of sediment-associated pollution in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Mar Environ Res.**, v. 64, p. 191–208, 2007.

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

IARC; Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Polynuclear Aromatic Compounds, vol. 32-35, Parts 1-4, **IARC**, 1983 - 1995.

JÖNSSON, M. E. et al. The zebrafish gill model: Induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation. **Aquatic Toxicology**, v. 91, p. 62-70, 2009.

MANDAL, K; SINGH, B. Dissipation of fipronil granule formulation in sugarcane field soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 142 – 147, 2013.

MEYERS-SCHÖNE, L., WALTON, B. T. Turtles as monitors of chemical contaminants in the environment. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, v.135, p.93-153, 1994.

NETTO, A. D. P et al. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica. **Química Nova**, v.23, c.6, p.765-773, 2002.

OLIVEIRA, M. M. G. J. **Efeitos genotóxicos e bioquímicos de xenobióticos em animais aquáticos**. Dissertação (Doutorado) - Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, 2009.

ORTIZ-DELGADO, J. B et al. Expression, cellular distribution and induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in gilthead seabream, *Sparus aurata*, brain. **Aquatic Toxicology**, 2012.

PERFETTI, G. A. et al. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood by liquid chromatography with fluorescence detection. **J AOAC**, v.5, p.872-877, 1992.

PISONI, M. et al. DNA adducts, benzo[a]pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). **Environ. Res.**, v.96, p.163-175, 2004.

RASHED, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environ Int.**, v. 27, c. 1, p. 27-33, 2001.

RODRIGUES, M. T. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v.1, n.1, p.87-94, 2005.

RODRIGUES, A. C. F. **Estudo de variações bioquímicas e genotoxicidade induzidas por mistura de contaminantes em tilápia (*Oreochromis niloticus*), como biomarcadores de contaminação ambiental**. 2014. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2014.

ROMÉO, M., GIAMBÉRINI, L. History of Biomarkers, Ecological Biomarkers. **CRC Press**, c. 2, p. 15-44, 2012.

SILVA, M. I. A. **Estudo das alterações bioquímicas em sangue e diferentes órgãos de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) coletados em ambiente contaminado ou expostos ao benzo[a]pireno.** 2015. 115 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

TRAPIDO, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonia soil: contamination and profiles. **Environmental Pollution**, v.105, p.67-74, 1999.

TORREIRO-MELO et al. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. **Chemosphere**, n. 132, p. 17- 23, 2015.

VAN DER OOST, R. et al. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ Toxicology Pharmacology**, v.13, n.2, p.57-149, 2003.

VENANCIO, L. P. R. *et al.* Assessment of phase I and II of xenobiotic detoxification and somatic index associated with environmental interferences in *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in the northwest region of Sao Paulo state, Brazil. **In: XI Congreso Luso-Español de Herpetología /XV Congreso Español de Herpetología**, v.1., p.184 -184, 2010.

VENANCIO, L. P. R. *et al.*, Pollution-induced metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 2013.

VOGT, R. C. Tartarugas da Amazônia. 1ª Edição, **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)**. 2008.

WANG, Y. et al. Aquatic predicted no-effect concentration for three polycyclic aromatic hydrocarbons and probabilistic ecological risk assessment in Liaodong Bay of the Bohai Sea, China. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 21, 148–158, 2014.

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**, P.477, 1983.